

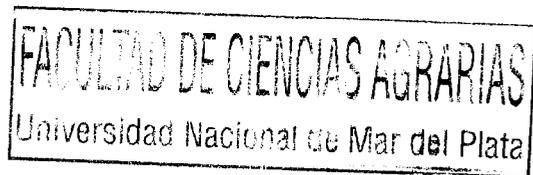
**INCIDENCIA DEL AMBIENTE Y EL TIPO DE HIBRIDO EN LA COMPOSICION Y LA
DUREZA DEL GRANO DE MAIZ**

Aníbal Cerrudo

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al Título de
Doctor en Ciencias Agrarias

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

Balcarce, Argentina
Junio de 2018



**INCIDENCIA DEL AMBIENTE Y EL TIPO DE HIBRIDO EN LA
COMPOSICION Y LA DUREZA DEL GRANO DE MAIZ**

Ing. Agr. Anibal Cerrudo, M.Sc.

Comité consejero:

A handwritten signature in black ink, appearing to be "F. Andrade", written over a horizontal dotted line.

Ing. Agr. Fernando H. Andrade, M.Sc., Ph.D

Director de Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to be "N. Izquierdo", written over a horizontal dotted line.

Ing. Agr. Natalia G. Izquierdo, M.Sc., Dr.

Codirector de Tesis

.....

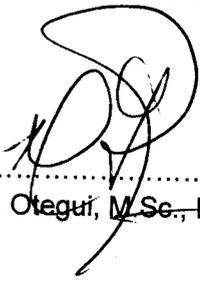
Ing. Agr. Alfredo Cirilo, M.Sc., Dr.

Asesor

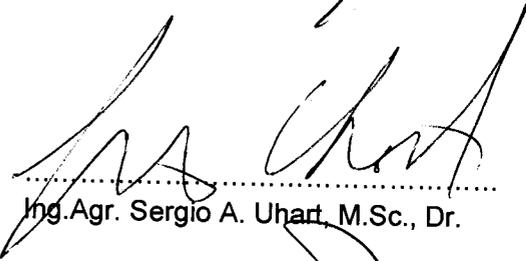
INCIDENCIA DEL AMBIENTE Y EL TIPO DE HIBRIDO EN LA COMPOSICION Y LA
DUREZA DEL GRANO DE MAIZ

Ing. Agr. Anibal Cerrudo, M.Sc.

Aprobada por el Jurado Evaluador:


.....
Ing. Agr. María E. Otegui, M.Sc., Dra.

Prof. Liliana IRIARTE, Mag
Secretaria de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMDP


.....
Ing. Agr. Sergio A. Uhart, M.Sc., Dr.


.....
Ing. Agr. José Beltrano, M.Sc., Dr.

Prof. Liliana IRIARTE, Mag
Secretaria de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMDP

AGRADECIMIENTOS

Para todos los que se esforcaron y se esfuerzan por que hoy exista la Universidad Pública en Argentina y para el Pueblo Argentino por sostenerla.

Para Fandroide, mi gran maestro, por enseñarme a hacer ciencia y por mil cosas más.

Para Pao, mi amor, y nuestros hijos, Inés, Julia y Hugo, por regalarme esos que tendrían que haber sido sus momentos todo este tiempo.

Gracias!

ÍNDICE GENERAL

Incidencia DEL AMBIENTE Y EL TIPO DE HIBRIDO EN LA COMPOSICION Y LA DUREZA DEL GRANO DE MAIZ	
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
a. Importancia y desafíos de la producción de maíz para la industria de molienda seca	2
b. Contribución del ambiente y del tipo de híbrido a la dureza del grano	3
c. Determinación de la dureza del grano de maíz en base a la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos	4
d. Zeínas y su asociación con la relación fuente-destino durante el período de llenado y la dureza del grano	6
e. Hipótesis	7
f. Objetivos	7
g. Estructura de la tesis	7
CAPÍTULO 1. CONTRIBUCION DEL AMBIENTE Y EL HIBRIDO A LA DUREZA DEL GRANO Y EL RENDIMIENTO DE MAIZ	9
1.1 Introducción	10
1.2.1 Cultivares, manejo de cultivos e información de los sitios	12
1.2.2 Mediciones	16
1.2.3 Análisis de datos	16
1.3 Resultados	18
1.3.1 Contribución del tipo de híbrido y el ambiente	18
1.3.2 Respuesta del tipo de híbrido al ambiente en el que crece el cultivo	20
1.3.3. Contribución del sitio y de las prácticas de manejo.	20
1.4 Discusión	27
CAPÍTULO 2. RELACIÓN FUENTE-DESTINO DURANTE EL PERÍODO DE LLENADO DE GRANOS COMO ESTIMADOR DE LA DUREZA DEL GRANO DE MAÍZ	33
2.1 Introducción	34
2.2 Materiales y Métodos	36
2.2.1 Relación fuente-destino durante el período de llenado de granos	36
2.2.2 Dureza de grano	38
2.2.3 Variables climáticas	38
2.2.4 Análisis de datos	38

2.3	Resultados	40
2.3.1	Caracterización climática de los ambientes.....	40
2.3.3	Análisis del efecto de la fecha de siembra sobre la relación de molienda en distintas localidades usando datos históricos de radiación y temperatura y el modelo de dureza 46	
2.4	Discusión	48
2.4.1	Crecimiento potencial como indicador de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos.....	48
2.4.2	Relación fuente-destino durante el período de llenado de granos como indicador del efecto del ambiente sobre la dureza de grano de maíz	48
2.4.3	Análisis del efecto de la interacción entre la fecha de siembra y el sitio sobre la dureza de granos	50
CAPÍTULO 3. ZEÍNAS Y SU ASOCIACION CON LA RELACIÓN FUENTE-DESTINO Y LA DUREZA DEL GRANO		53
3.1	Introducción.....	54
3.2	Materiales y Métodos	57
3.2.1	Contenido y concentración de proteína en grano	57
3.2.2	Contenido y concentración de zeínas.....	57
3.2.3	Análisis de datos	60
3.3	Resultados	61
3.3.1	Efecto del tipo de híbrido y el ambiente sobre la composición del grano.	61
3.3.2.	Relación fuente-destino y las fracciones de zeínas.	65
3.3.3	Zeínas y dureza del grano.....	68
CAPITULO 4 INTEGRACION FINAL Y CONCLUSIONES.....		75
REFERENCIAS		81

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Información de los experimentos incluyendo localidad, tipo de suelo, año de inicio del experimento, materia orgánica del suelo (M.O.), pH del suelo, cultivo antecesor (Antecesor), manejo de fecha de siembra (Siembra), fecha de siembra, de floración y de madurez fisiológica (Madurez), temperatura media (T_{med}) y radiación fotosintéticamente activa incidente diaria promedio (IPAR) durante la fase reproductiva del cultivo de maíz.	15
Tabla 2: Resumen ANOVA para los efectos del tipo de híbrido y el ambiente sobre la dureza de grano indicada por relación de molienda y el rendimiento. El ambiente surge de la combinación de localidades, fechas de siembra, manejo de fertilización y años.	19
Tabla 3: Dureza indicada por la relación de molienda y rendimiento de maíz para distintos ambientes conformados por la combinación de sitios (localidad-año), fechas de siembra temprana y tardía, fertilización control (Control) y suplementaria en pre-floración (Fert). Cada valor es el promedio de tres híbridos y tres repeticiones#.	25
Tabla 4: Resumen ANOVA para los efectos del sitio, la fecha de siembra y el manejo de la fertilización sobre la dureza de grano indicada por relación de molienda y el rendimiento.	26
Tabla 5: Concentración de proteína en grano (%) para híbridos de maíz de distinto tipo de grano (dentado, semi-dentado y colorado duro) sembrados en 10 sitios (combinación de localidad y año) en fecha de siembra temprana y tardía. Promedio de 3 repeticiones.	61
Tabla 6: Concentración en grano de zeína-2, zeína-1 y zeína-total para tres híbridos de maíz de tipo de grano contrastante (dentado, semi-dentado y colorado duro) sembrados en 10 sitios (combinación localidad y año) en fecha de siembra temprana y tardía. Promedio de tres repeticiones.	63
Tabla 7: Contenido por grano (mg) de zeína-2, zeína-1 y zeína-total para híbridos de maíz de tipo de grano contrastante (dentado, semi-dentado y colorado duro) sembrados en 10 sitios (combinación localidad y año) en fecha de siembra temprana y tardía.	64

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Mapa de Argentina indicando las localidades en las que se realizaron los experimentos. 12
- Figura 2: Relación de molienda para tres híbridos de maíz de distinto tipo de endosperma en función de la relación de molienda promedio para diferentes ambientes (sitios y manejos agronómicos). La relación de molienda media se calculó como el promedio de la relación de molienda para los tres híbridos en cada combinación de sitio, fecha de siembra y manejo de fertilización. Cada punto es el promedio de tres repeticiones. La línea punteada horizontal indica la relación de molienda requerida para alcanzar el grado de calidad superior en el estándar europeo Según Cirilo *et al.* (2011). Colorado duro*: $y=1,24\pm 0,08x-0,28$, $R^2=0,96$, $P<0,001$; semi-dentado: $y=0,87\pm 0,08x+0,29$, $R^2=0,90$, $P<0,001$; dentado: $y=0,89x\pm 0,1-0,01$, $R^2=0,85$, $P<0,001$. *El valor que sigue al símbolo \pm conforma el intervalo de confianza de la pendiente (95%). 19
- Figura 3: Rendimiento para tres híbridos de maíz de distinto tipo de endosperma en función del rendimiento medio para diferentes ambientes (sitios y manejos agronómicos). El rendimiento medio por ambiente se calculó como el promedio de rendimiento para los tres híbridos en cada combinación de sitio, fecha de siembra y manejo de fertilización. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones. Colorado duro*: $y=0,83\pm 0,07x+93,4$, $R^2=0,92$, $P<0,001$; semi-dentado: $y=1,1\pm 0,08x-99,8$, $R^2=0,96$, $P<0,001$; dentado: $y=1,07\pm 0,1x+6,3$, $R^2=0,95$, $P<0,001$. *El valor que sigue al símbolo \pm conforma el intervalo de confianza de la pendiente (95%). 19
- Figura 4: Incremento relativo en la dureza indicada por la relación de molienda en función del incremento relativo en rendimiento en respuesta a la fertilización suplementaria con N y S en pre-floración para diferentes localidades ($y=0,53x+2,27$, $R^2=0,33$, $P=0,0012$). La línea discontinua representa la relación 1:1. Cada valor representa el promedio de tres repeticiones. 23
- Figura 5: Respuesta de la eficiencia en el uso de la radiación (EUR) a la temperatura. 38
- Figura 6: Caracterización climática de los diferentes ambientes que conformaron la red experimental durante el período crítico de floración comprendido entre 200 °Cd previos a la floración y 250 °Cd posteriores a la misma (a, c, e, g) y el período de llenado efectivo de granos comprendido entre 250 °Cd y la madurez fisiológica (b, d, f, h). Las variables climáticas se presentan en función de la latitud de la localidad. a y b: temperatura media diaria promedio; c y d: radiación fotosintéticamente activa incidente diaria promedio; e y f: radiación fotosintéticamente activa incidente acumulada; g y h: crecimiento potencial acumulado. Fecha de siembra temprana (símbolos llenos) y tardía (símbolos vacíos). Localidades: Co: Corrientes, Pa: Paraná, Pe: Pergamino, Ba: Balcarce y Vi: Viedma. Años: 2008 a 2011. 41
- Figura 7: Crecimiento potencial acumulado en función de la radiación fotosintéticamente activa interceptada en diferentes ambientes que conformaron la red experimental durante el período crítico de floración comprendido entre 200 °Cd previos a la floración y 250 °Cd posteriores a la misma y el período de llenado efectivo de granos comprendido entre 250 °Cd y la madurez fisiológica. Los ambientes incluyen siembras tempranas y tardías en cinco localidades y cuatro años. Localidades: Corrientes, Paraná, Pergamino, Balcarce y Viedma. Años: 2008 a 2011. La línea discontinua une puntos con la máxima eficiencia en el uso de la radiación (4,2 g Mj⁻¹). Los símbolos grises corresponden a períodos de llenado de grano en fecha de siembra tardía en Balcarce y Viedma. 42
- Figura 9: a) Número de granos (NG) en función del crecimiento potencial acumulado durante el período crítico de floración, desde 200 °Cd antes de floración hasta 250 °Cd después de la misma ($NG=1,52x+1611$, $P<0,01$, $R^2=0,33$). b) Peso por grano en función del crecimiento potencial acumulado durante el período de llenado de granos, desde 250 °C después de

floración hasta madurez fisiológica (Peso por grano $y=0,041x+198,8$, $R^2=0,30$, $P<0,01$). Cada punto corresponde al promedio de tres híbridos y tres repeticiones. Se incluyen datos de fechas de siembra tempranas y tardías en cinco localidades y cuatro años. Localidades: Co: Corrientes, Paraná, Pergamino, Balcarce y Viedma. Años: 2008 a 2011. 43

Figura 10: Relación fuente-destino durante el período de llenado de granos en función de la latitud de la localidad. La relación fuente-destino fue estimada como el cociente entre el crecimiento potencial durante el período de llenado efectivo de los granos y el crecimiento potencial acumulado durante el período crítico de floración. Los símbolos llenos y vacíos corresponden a fechas de siembra tempranas y tardías respectivamente, Localidades: Co: Corrientes, Pa: Paraná, Pe: Pergamino, Ba: Balcarce y Vi: Viedma. Años: 2008 a 2011. . 44

Figura 11: Relación de molienda en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para tres híbridos de maíz de distinto tipo de endosperma (colorado duro, semi-dentado y dentado). La relación fuente-destino fue estimada como el cociente entre el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 250 °Cd pasada la floración y la madurez fisiológica y el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 200 °Cd previos a la floración y 250 °Cd posteriores a la misma. Los datos se generaron en una red de experimentos que incluyó cinco localidades, fechas de siembra temprana y tardía durante cuatro años. Modelos por híbrido (\pm intervalo de confianza de la pendiente): colorado duro $y=4,4\pm 0,9x-0,3$, $P<0,001$, $R^2=0,66$, $\sum(\text{residuos})^2=9,1$; semi-dentado $y=3,1\pm 0,8x+0,34$, $P<0,01$, $R^2=0,61$, $\sum(\text{residuos})^2=6,3$; dentado $y=2,7\pm 1,1x+0,54$, $P<0,01$, $R^2=0,49$, $\sum(\text{residuos})^2=5,3$ 44

Figura 12: Relación de molienda en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para tres híbridos de maíz de distinto tipo de granos (colorado duro, semi-dentado y dentado). La relación fuente-destino fue estimada como el cociente entre el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 250 °Cd pasada la floración y la madurez fisiológica y el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 200 °Cd previos a la floración y 250 °Cd posteriores a la misma. Los datos se generaron en una red de experimentos que incluyó cinco localidades, fechas de siembra temprana y tardía durante cuatro años. Modelo único (\pm intervalo de confianza de la pendiente) $y=3,4\pm 0,8x+0,18$; $P<0,01$, $R^2=0,39$, $\sum(\text{residuos})^2=55,6$ 45

Figura 13: Relación fuente-destino durante el período de llenado de granos en función de la fecha de siembra para Corrientes, Paraná, Pergamino y Balcarce. Promedio para el período 1987-2017. La relación fuente-destino fue estimada como la relación entre el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 250 °Cd pasada la floración y la madurez fisiológica y el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 200 °Cd previos a la floración y 250 °Cd posteriores a la misma. Las barras verticales indican la desviación estándar. 46

Figura 14: Relación de molienda promedio para la serie 1987-2017 (a-d) y probabilidad de alcanzar el grado de calidad superior (e-h) en función de la fecha de siembra para cuatro localidades (Corrientes, Paraná, Pergamino y Balcarce) y 3 híbridos de distinto tipo de endosperma (colorado, semi-dentado y dentado). Las barras verticales indican la desviación estándar. La línea segmentada horizontal indica el valor de relación de molienda por sobre el que se considera grano de calidad superior para la industria de molienda seca según Cirilo *et al.* (2011). 47

Figura 15: Relación de molienda en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos ajustada por el número de granos para tres híbridos de maíz. La relación fuente-destino fue estimada como la relación entre el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 250 °Cd pasada la floración y madurez fisiológica y el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 200 °Cd previos a la floración y 250 °Cd posteriores a la misma ajustado por el número de granos fijados por

- cada híbrido. Los datos se generaron en una red de experimentos que incluyó cinco localidades, fechas de siembra temprana y tardía durante cuatro años. $y = 3,9x \pm 0,62 + 0,12$; $P < 0,01$; $R^2 = 0,68$; $\sum(\text{Residuales})^2 = 30,3$ 50
- Figura 16: Imagen obtenida mediante microscopio electrónico de un endosperma de maíz en desarrollo que ilustra paredes celulares (CW), gránulos de almidón (SG) y cuerpos proteicos (PB). Adaptado de Sabelli y Larkins (2009). 54
- Figura 17: Modelo de desarrollo de cuerpos proteicos en el endosperma de maíz. El cuerpo proteico más inmaduro es el de la izquierda y el desarrollo es de izquierda a derecha. Con letras griegas se indican la localización de las distintas fracciones de zeínas determinadas por inmuno-localización (adaptado de Shewry *et al.*, 2002). 55
- Figura 18: Cromatograma correspondiente a un perfil de zeínas de grano de maíz. El eje y- corresponde a la absorbancia a 210 nm expresado en unidades de absorbancia. El eje x- representa el tiempo de retención expresado en minutos. La fracción zeína-2 que incluye a las γ - y β -zeínas y la fracción zeína-1 que incluye a las α - y δ -zeínas de acuerdo a Wilson (1991), se indican con áreas grises entre líneas punteadas. 58
- Figura 19: Relación entre la biomasa de zeína estimada por el método Kjendhal y el área del cromatograma (mUA) para extractos de zeínas provenientes de grano de maíz de distinta concentración de proteína. $y = 2,1 \cdot 10^{-4}x$, $R^2 = 0,95$, $P < 0,0001$ 60
- Figura 20: Concentración de zeína-total, zeína-1 y zeína-2 en función de la concentración de proteína en grano. Los datos corresponden a 3 híbridos sembrados en distintos sitios (localidad-año) en fecha de siembra temprana y tardía, y tres repeticiones. zeína total: $y = 0,23 \pm 0,03 + 0,66x$, $P < 0,0001$, $R^2 = 0,29$; zeína-1: $y = 0,21 \pm 0,02 - 0,11x$, $P < 0,0001$, $R^2 = 0,48$; zeína-2: $P = 0,46$ 62
- Figura 21: Contenido de zeína-1 (grises) y zeína-2 (rojos) por grano en función del peso por grano para siembras tempranas (símbolos oscuros) y siembras tardías (símbolos claros), para tres híbridos de distinto tipo de grano (triángulo hacia arriba: colorado duro; círculo: semi-dentado y triángulo hacia abajo: dentado). Las líneas al origen unen puntos con igual concentración de zeínas. Cada punto corresponde a una repetición. Ajuste modelos, zeína-1: $y = 0,03x - 1,97$, $R^2 = 0,6$, $P > 0,0001$; zeína-2 siembra temprana: $y = 0,019x - 2,54$, $R^2 = 0,4$, $P < 0,0001$; zeína-2 siembra tardía: $y = 0,012x - 0,25$, $R^2 = 0,46$, $P < 0,0001$ 65
- Figura 22: Concentración (a) y contenido (b) de zeína total en grano en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para tres híbridos de maíz de textura de grano contrastante. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones. Modelos ajustados por híbrido, concentración: dentado $y = 4,2 - 1,01x$, $R^2 = 0,53$, $P < 0,001$; semi-dentado $y = 4,2 + 0,62x$, $R^2 = 0,16$, $P < 0,12$; colorado duro $P = 0,93$ y contenido: dentado $P = 0,74$, semi-dentado $P = 0,49$, colorado duro $P = 0,14$ 66
- Figura 23: Concentración (a) y contenido (b) de zeína-2 en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para tres híbridos de maíz. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones. Modelos ajustados por híbrido, concentración: dentado $y = 1,43 - 0,41x$, $R^2 = 0,39$, $P < 0,01$, semi-dentado $y = 2,02 - 0,70x$, $R^2 = 0,77$, $P < 0,01$; colorado duro $y = 1,89 - 0,83x$, $R^2 = 0,40$, $P < 0,01$ y contenido: dentado $P = 0,24$, semi-dentado $P = 0,19$, colorado duro $P = 0,94$ 67
- Figura 24: Concentración (a) y contenido (b) de zeína-1 en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para tres híbridos de maíz. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones. Modelos ajustados por híbrido, concentración: dentado $y = 2,7 - 0,53x$, $R^2 = 0,29$, $P < 0,05$, semi-dentado $P = 0,79$, colorado duro $y = 1,89 + 0,49x$, $R^2 = 0,17$, $P < 0,1$ y contenido dentado $P = 0,86$, semi-dentado $P = 0,17$ y colorado duro $y = 4,1 + 2,69x$, $R^2 = 0,21$, $P < 0,1$ 67
- Figura 25: Relación de zeínas (zeína-1/zeína-2) en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para tres híbridos de maíz. Cada punto corresponde al

- promedio de tres repeticiones. Ajuste de modelos: dentado $P=0,28$, semi-dentado $y=0,67+1,12x$, $R^2=0,51$, $P<0,01$, colorado duro $y=0,68+1,08x$, $R^2=0,57$, $P<0,01$ 68
- Figura 26: Relación de molienda en función de la concentración de (a) zeína-2, (b) zeína-1 y (c) zeína total para tres tipo de híbrido de maíz: dentado (blanco), semi-dentado (gris) colorado duro (negro) y distintos ambientes conformados por la combinación de localidades, fechas de siembra y años. D-F: Residuales de la relación de molienda en función de los residuales de la concentración de zeína resultantes de sustraer la media de los tres híbridos en cada ambiente (d) zeína-2, (e) zeína-1 y (f) zeína total. G-I: Residuales de la relación de molienda en función de los residuales de la concentración de zeína resultantes de sustraer la media de todos los ambientes para cada híbrido (g) zeína-2, (h) zeína-1 y (i) zeína total. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones. La línea continua indica que el modelo de regresión es significativo al 0,01. 69
- Figura 27: Relación de molienda en función de la relación de zeínas-1/zeínas-2 (Z-1/Z-2) para tres híbrido de maíz: dentado (blanco), semi-dentado (gris) colorado duro (negro) y distintos ambientes conformados por la combinación de localidades, años y fechas de siembra. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones. 70

RESUMEN

En esta tesis se presenta y discute evidencia acerca de cómo el ambiente en que se desarrolla el cultivo y el tipo de híbrido empleado se relacionan con la dureza del grano de maíz (indicada por la relación de molienda) y cuál es el rol de las zeínas en el establecimiento de dichas relaciones. El primer objetivo fue evaluar la contribución del tipo de híbrido y del ambiente sobre la dureza del grano para el área maicera argentina. Se dispuso una red experimental combinando localidades x años (sitios) sobre una transecta norte-sur, dos fechas de siembra, dos manejos de fertilización y tres híbridos comerciales representativos del rango disponible de dureza de grano. El ambiente (i.e., la combinación entre cada sitio, fecha de siembra y manejo de la fertilización) explicó la mayor parte (77%) de la variación en dureza. Asimismo, el sitio y el manejo de la fecha de siembra fueron los principales factores ambientales que contribuyeron a la determinación de la dureza de grano. El segundo objetivo fue generar un modelo predictivo de la dureza del grano de maíz basado en la integración de variables ambientales. La relación fuente-destino estimada como el cociente entre el crecimiento potencial acumulado durante el período de llenado de granos y el crecimiento potencial acumulado alrededor de la floración explicó la mayor parte de la variación registrada en la relación de molienda de la red experimental. Dicho indicador fue útil para analizar la probabilidad de alcanzar niveles de dureza adecuados para la industria en distintas localidades y bajo distintas fechas de siembra. Se determinó que la ventana de siembra para producir grano de calidad superior se reduce con el incremento en la latitud. A continuación, en un tercer objetivo, se propuso estudiar la base de los mecanismos que subyacen a la asociación entre la relación fuente-destino y la dureza del grano de maíz. La dureza del grano de maíz se atribuye principalmente a la interacción de distintas fracciones de zeínas. El rol de las zeínas se ha establecido en gran medida utilizando distintos híbridos. No había estudios del efecto de la relación fuente-destino sobre dicha asociación entre la composición de zeínas y dureza de grano. La tesis pudo establecer asociaciones funcionales entre la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos y la concentración de zeínas y además se estableció que estas asociaciones son dependientes del tipo de híbrido. Sin embargo, los resultados encontrados indican que el efecto de la relación fuente-destino sobre la dureza de grano no estaría determinado por su efecto sobre la composición de las zeínas. Se propone entonces que el efecto de la relación fuente-destino sobre la dureza de grano podría estar ligado a aspectos estructurales del grano a mayor escala que la composición de la malla proteica que conforman las zeínas. La información generada es relevante para el diseño de sistemas de cultivo orientados a producir granos de calidad acorde al requerimiento de la industria de molienda seca. Futuros trabajos deberán identificar características estructurales del grano implicadas en el establecimiento del efecto del ambiente sobre la dureza del mismo.

Palabras clave: fuente; destino; relacion de molienda; composición del grano.

ABSTRACT

In this thesis I present and discuss evidence on how the crop environment and the hybrid are related to maize kernel hardness (indicated by the coarse-to-fine ratio) and the role of the zeins in the establishment of such relationships. The first objective was to evaluate the contribution of the hybrid type and the environment to kernel hardness of Argentine maize production area. An experimental network was set up combining locations x year (site) on a north-south transect, two sowing dates, two fertilization treatments and three commercial hybrids representative of the available range of kernel hardness. The environment (i.e., the combination between each site, sowing date and management of fertilization) explained most (77%) of the variation in kernel hardness. Also, the site and the sowing date management were the main environmental factors that contributed to the kernel hardness determination. The second objective was to generate a predictive model of corn kernel hardness based on the integration of environmental variables. The source-sink ratio estimated as the quotient between the accumulated potential growth during the grain filling period and the accumulated potential growth around flowering explained most of the variation recorded in the coarse-to-fine ratio of the experimental network. This environmental indicator was useful to analyze the probability of attaining a hardness level suitable for the industry in different locations and under different sowing dates. It was determined that the sowing window to produce superior quality grain is progressively reduced with the increase in latitude. Next, in a third objective, the thesis covered the study of the mechanisms that underlie the association between this source-sink ratio and the hardness of maize kernel. Maize kernel hardness is attributed mainly to the interaction of different fractions of zeins. The role of zeins has been established to a large extent using different hybrids. There were no studies on the effect of the source-sink ratio on this association between zein composition and kernel hardness. Functional associations between the source-sink ratio during the period of grain filling and the concentration of zeins were established. It was further established that these associations are dependent on the hybrid type. However, the results found indicate that the effect of the source-sink ratio on kernel hardness would not be determined by its effect on zein composition. It is then proposed that the effect of the source-sink ratio on kernel hardness could be linked to structural aspects of the kernel at a larger scale than the composition of the protein matrix that make up the zeins. The information generated is relevant for the design of cropping systems oriented to produce kernel quality according to the requirements of the dry milling industry. Future works should identify structural characteristics of the grain involved in establishing the effect of the environment on this trait.

Keywords: Source; sink; milling ratio; kernel composition

INTRODUCCIÓN GENERAL

a. Importancia y desafíos de la producción de maíz para la industria de molienda seca

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los principales cereales cultivados en el mundo. Actualmente, la producción global anual de este grano alcanza las 850 millones de toneladas, lo que representa un 34% de la producción total de cereales (FAO, 2018). En este contexto, Argentina produce anualmente alrededor de 30 millones de toneladas de grano de maíz (Miniagri, 2018).

El maíz se consume en distintas formas, ya sea tal como surge de la planta o luego de sucesivas transformaciones industriales que le van agregando valor. La industria de molienda seca, en particular, transforma grano de maíz en trozos para copos y barras de cereal, sémolas para expandidos, sémolas para cervecería, harina para polenta, harina fina y harina zootécnica (Orthofer *et al.*, 2003). El valor del grano puede ser incrementado hasta cinco veces en dicho proceso de transformación industrial (Capello, 2011). La industria de molienda seca en Argentina se caracteriza por su atomización, existiendo más de setenta molinos ubicados en ocho provincias, que generan vínculos con una importante cantidad de localidades (MAIZAR, 2017). De esta manera, el agregado de valor al grano puede realizarse en las proximidades de las zonas de cultivo impulsando la generación de empleo y el desarrollo de los territorios de influencia de los productores agropecuarios. Sin embargo, el principal destino del grano de maíz producido en Argentina es la exportación sin agregado de valor, destinándose al mercado internacional alrededor del 60% de lo producido (Capello, 2011). Por otro lado, del maíz consumido internamente, el 85% se destina a la alimentación animal, mientras que un 10% se destina a alimentación humana, del cual tan sólo un 13% es procesado por la industria de molienda seca (Rossi y Calzada, 2015). De esta manera, solo el 0,5% del grano de maíz producido en Argentina es procesado por la industria de molienda seca. Partiendo de niveles de industrialización relativamente bajos en la actualidad, se proyecta que la demanda de maíz procesado por la industria de molienda seca se va a incrementar a una tasa de 2,6% anual durante los próximos años (Capello, 2011; Lezcano, 2012), lo que representa una oportunidad para aumentar el valor de la producción nacional de maíz y contribuir al desarrollo de los territorios. En tal sentido, el Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva de Argentina recomienda para los próximos años focalizar el esfuerzo en el aprovechamiento de la materia prima que ofrece el maíz para obtener productos de alto valor agregado. Asimismo, se ha establecido como política pública la promoción de las exportaciones de productos

industrializados de maíz y el apoyo a la inserción internacional de las empresas de la cadena de maíz (Miniagri, 2017).

La industria de molienda seca demanda granos que rindan una alta proporción de fracciones gruesas durante la molienda (Lee *et al.*, 2007). El rendimiento de fracciones gruesas se asocia directamente con la dureza del grano. Dicha dureza puede expresarse como la resistencia mecánica del grano a la acción del molino (Wu, 1992; Holding y Larkins, 2006). Además, la dureza es determinante del requerimiento de energía durante la molienda y afecta varias propiedades nutritivas del grano y sus derivados (Paulsen *et al.*, 2003). La relación de molienda del grano es uno de los indicadores de dureza más utilizados (Fox y Manley, 2009). Este indicador se obtiene del cociente entre el peso de las fracciones gruesas y las finas después de someter el grano a un proceso estandarizado de molienda y tamizado. Un alto valor de relación de molienda es un atributo típico de un grano duro y se asocia con un alto rendimiento de fracciones gruesas durante la molienda seca.

Esta tesis profundizará en el entendimiento de los factores determinantes de la dureza del grano. La tesis propone estudiar la incidencia del ambiente y del tipo de híbrido sobre la dureza del grano de maíz indicada por la relación de molienda del mismo. Luego, se buscará elaborar un modelo predictivo del efecto del ambiente sobre la dureza de grano basado en las condiciones de crecimiento en la etapa reproductiva del cultivo. Por último, se estudiará el rol que cumple la composición de la fracción proteica del grano en la determinación de la dureza del mismo. A continuación, en los puntos b, c, y d se presentan los antecedentes referidos a estas tres partes centrales de la tesis.

b. Contribución del ambiente y del tipo de híbrido a la dureza del grano

Durante la primera mitad del siglo pasado Argentina cultivó casi exclusivamente híbridos de maíz que producían grano de alta dureza y altos rendimientos de fracciones gruesas durante la molienda seca. En dicho período, los programas argentinos de mejoramiento de maíz tenían como objetivo tanto la dureza del grano como el rendimiento. Más tarde, los esfuerzos de mejoramiento se centraron sólo en el rendimiento. La introducción progresiva de germoplasma de tipo dentado aumentó el rendimiento (Luque *et al.*, 2006) pero simultáneamente redujo la dureza del grano cosechado (Eyhérabide *et al.*, 2004; Cirilo *et al.*, 2011). En concordancia, la dureza se ha atribuido casi exclusivamente al tipo de híbrido (Alexandre *et al.*, 1991; Dombrink-Kurtzman y Bietz, 1993; Robutti *et al.*, 1997; Robutti, Borrás, Ferreres y Bietz, 2000;

Duarte *et al.*, 2005). Sin embargo, trabajos más recientes indican que el ambiente en el que se desarrolla el cultivo sería otro factor determinante en la dureza de grano (Governatori y Uhart, 1998; Cirilo *et al.*, 2011; Blandino *et al.*, 2013; Gerde *et al.*, 2016; Tamagno *et al.*, 2016).

El ambiente cobra relevancia al poner en consideración el rango de condiciones climáticas a las que se expone el cultivo en el área maicera argentina (Aramburu Merlos *et al.*, 2015). Asimismo, el manejo agronómico determina el ambiente en el que se desarrolla el cultivo en un lugar y un momento determinado. En concordancia, reportes previos muestran que la fecha de siembra (Cirilo *et al.*, 2011) y el manejo de la fertilización también afectan la dureza del grano de maíz (Governatori y Uhart, 1998; Gerde *et al.*, 2016). Además, de los resultados de estos trabajos, se desprende que la respuesta de la dureza al ambiente es dependiente del tipo de híbrido considerado. Conocer el rol del ambiente y el híbrido en la determinación de la dureza del grano será de utilidad en el diseño de estrategias de cultivo para producir grano de dureza acorde a la demandada por la industria de molienda seca. Por otro lado, la estrategia de producción orientada a dureza del grano deberá también considerar al rendimiento del cultivo (Tamagno *et al.*, 2015).

En este contexto, la tesis tiene como objetivo inicial evaluar la contribución del tipo de híbrido y del ambiente sobre la dureza del grano (indicada por la relación de molienda) y sobre el rendimiento de maíz para ambientes representativos del área maicera argentina. Donde el término ambiente hace referencia a las condiciones en las que crece el cultivo y que resultan de la combinación entre el sitio y el manejo agronómico del cultivo. Donde el término sitio hace referencia a una localidad en una estación de crecimiento determinada.

Además de conocer la contribución del ambiente sobre la dureza de grano de maíz, sería de gran utilidad contar con herramientas que ayuden a estimar la dureza alcanzable en un ambiente determinado. Surge así la necesidad de desarrollar modelos que permitan integrar los efectos del ambiente sobre la dureza del grano en el cultivo de maíz.

c. Determinación de la dureza del grano de maíz en base a la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos

La condición fisiológica del cultivo durante la etapa de llenado de granos es determinante en el establecimiento de la dureza del grano (Cirilo *et al.*, 2011). Particularmente, el balance que se da entre la fuente de asimilados y la demanda de

estos últimos por granos durante el período de llenado (relación fuente-destino) ha sido asociado positivamente con la dureza del grano de maíz (Governatori y Uhart, 1998; Cirilo *et al.*, 2011). Estos trabajos utilizaron como indicador de la relación fuente-destino al cociente entre la biomasa acumulada entre floración y madurez fisiológica y el número de granos en la cosecha. La relación fuente-destino estimada de esta manera no sólo describe el efecto del ambiente, sino el efecto combinado del ambiente y el híbrido utilizado (Echarte *et al.*, 2004). Dicho método, tampoco considera al peso potencial de los granos para la determinación de la demanda de los mismos durante el período de llenado (Echarte *et al.*, 2006; Gambín y Borrás, 2010). Por último, condiciones ambientales que lleven a una reducción marcada en la capacidad de los destinos reproductivos (e.g. reducido número de granos) pueden llevar al retro-control negativo de la fotosíntesis durante el llenado de granos y, por lo tanto, a una subestimación de la fuente disponible durante ese período (Tollenaar y Daynard, 1982). En este contexto, sería útil contar con un indicador que caracterice el balance entre la fuente de asimilados y la demanda de los destinos reproductivos durante el llenado de granos que no esté influenciado por el genotipo y que no sea afectado por escenarios en que la falta de destinos en relación a la fuente lleven que ocurra retro-control negativo de fotosíntesis. Este indicador, en última instancia, permitirá caracterizar al ambiente y sería útil para estimar y comparar la dureza de grano alcanzable en distintos ambientes.

Los componentes de la demanda de los destinos reproductivos, el número de granos y el peso potencial de los mismos, se establecen alrededor del período crítico de floración, y en ausencia de limitaciones hídricas y nutricionales, se asocian directamente con el crecimiento potencial acumulado por el cultivo durante este período (Gambín y Borrás, 2010; Cerrudo *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017). Por otro lado, el crecimiento potencial acumulado desde el inicio del período de llenado efectivo del grano hasta la madurez fisiológica es un indicador de la fuente disponible para abastecer la demanda de los destinos reproductivos (Uhart y Andrade, 1991).

Esta tesis tiene como objetivo generar un modelo predictivo de la dureza del grano de maíz basado en la integración de variables ambientales determinantes del balance entre la fuente de asimilados y la demanda de los destinos reproductivos durante el período de llenado de granos. Este modelo será de utilidad para evaluar el efecto del ambiente resultante de distintos sitios y manejos agronómicos. Además, considerando que la dureza del grano depende de su composición química, la comprensión del rol del ambiente en el establecimiento de la dureza del grano requerirá del estudio del efecto del ambiente sobre la dicha composición.

d. Zeínas y su asociación con la relación fuente-destino durante el período de llenado y la dureza del grano

La fracción proteica del grano ha sido indicada como el componente más importante en la determinación de la dureza del grano de maíz (Lopes y Larkins, 1991; Yuan y Flores, 1996; Robutti, Borrás, Bietz, 2000; Gerde *et al.*, 2016). La mayor parte de la proteína del endosperma corresponde a prolaminas llamadas zeínas que forman cuerpos proteicos esféricos que a su vez se aglomeran en una malla rígida que soporta los amiloplastos (Chandrashekar y Mazhar, 1999). Las diferentes fracciones de zeína no se distribuyen de manera homogénea en el cuerpo proteico. La fracción zeína-2 se localiza en la periferia de los mismos y favorece la formación de puentes di-sulfuro que dan firmeza a la malla proteica. En tanto que la fracción zeína-1 conforma el interior de los cuerpos proteicos rellenando espacios libres y aportando a la estabilidad mecánica de dicha malla (Mazhar y Chandrashekar, 1995).

Son escasos los trabajos que estudiaron el efecto del ambiente, y en particular el efecto de la relación fuente-destino durante el llenado de granos, sobre la composición del grano de maíz. El estudio del efecto del ambiente sobre la composición de las fracciones de zeínas será de utilidad para comprender la incidencia del ambiente en la determinación de la dureza del grano de maíz.

La relación fuente-destino durante el período de llenado de granos afecta la concentración de las proteínas en el grano de maíz (Uhart y Andrade, 1995; Borrás *et al.*, 2002) y, como consecuencia, podría afectar la dureza del mismo a través del efecto sobre la concentración de la fracción de zeínas. La relación fuente-destino afecta, también, la dinámica de la acumulación de proteínas (Woo *et al.*, 2001). Por lo tanto, el ambiente en el que se desarrolla el cultivo además de afectar la concentración de zeína total podría afectar de manera diferencial la concentración de las distintas fracciones de zeínas, ya que éstas no se sintetizan simultáneamente durante el período llenado de granos (Lopes y Larkins, 1991; Woo *et al.*, 2001). La alteración de la cantidad relativa de zeína-1 y zeína-2 podría afectar las propiedades mecánicas de la malla proteica y, por consiguiente, la dureza del grano de maíz (Gerde *et al.*, 2016).

Esta tesis tiene como objetivo final establecer asociaciones i) entre la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos y la concentración de las fracciones de zeínas en grano y ii) entre la concentración de las fracciones de zeína y la dureza de grano.

Considerando la información previamente presentada se han elaborado las siguientes hipótesis y objetivos.

e. Hipótesis

- i. Considerando la diversidad de ambientes en los que se cultiva maíz en Argentina y la variabilidad genética disponible para dureza de grano, el efecto del ambiente sobre la dureza de grano es mayor que el efecto del tipo de híbrido.
- ii. La respuesta en la dureza de grano ante variaciones en el ambiente es mayor para un híbrido dentado que para uno colorado duro.
- iii. La relación fuente-destino durante el período de llenado de granos estimada como el cociente entre el crecimiento potencial acumulado durante el período de llenado de granos y el crecimiento potencial acumulado durante el período crítico de floración se asocia positivamente con la relación de molienda de maíz.
- iv. Las alteraciones en la relación fuente-destino durante el período de llenado de los granos de maíz afectan la concentración de zeína total y la relación entre sus fracciones componentes.
- v. El efecto de la relación fuente-destino durante el período de llenado de los granos sobre la dureza de grano está asociado con su efecto sobre la concentración de zeína total y la relación entre sus fracciones componentes.

f. Objetivos

- i. Evaluar la contribución del tipo de híbrido y del ambiente sobre la dureza del grano (indicada por la relación de molienda) y sobre el rendimiento de maíz en el área maicera argentina.
- ii. Generar un modelo predictivo de la dureza del grano de maíz basado en la integración de variables ambientales determinantes de la relación entre la fuente de asimilados y los destinos reproductivos durante el período de llenado de granos.
- iii. Establecer asociaciones entre la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos y la concentración de las fracciones de zeínas en grano, y entre la concentración de las fracciones de zeína y la dureza de grano.

g. Estructura de la tesis

Este trabajo de tesis consta de 4 capítulos. En el Capítulo 1 se analiza la contribución del tipo de híbrido y del ambiente a la determinación de la dureza del grano de maíz indicada por la relación de molienda en el área maicera argentina. Se presentan datos

de una red experimental en la que se evaluaron tres híbridos, que exploran el rango de variabilidad genética disponible en cuanto a tipo de grano, en distintos ambientes conformados por la combinación de la localidad, el año, la fecha de siembra y el manejo de la fertilización. Del análisis de la información generada surge que la variación en radiación y temperatura entre los distintos ambientes fue relevante en la determinación de la dureza del grano. Se plantea entonces la utilidad de generar un modelo que integre los efectos de estas variables ambientales sobre la dureza del grano de maíz y permita estimar la dureza alcanzable en un ambiente determinado.

Esta tarea se aborda en el Capítulo 2 en el que se propone una aproximación novedosa para obtener un indicador que integra el efecto de la radiación y la temperatura sobre el balance entre la fuente de asimilados y la demanda de los destinos reproductivos durante el período de llenado (relación fuente–destino). Se establecen, luego, asociaciones funcionales entre la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos y la dureza del grano indicada por la relación de molienda para distintos tipos de híbridos. El modelo se utiliza para estimar el efecto de la fecha de siembra sobre la dureza de grano en distintas localidades. El Capítulo 3 propone avanzar en la comprensión sobre los mecanismos subyacentes a la asociación entre la relación fuente-destino durante el período de llenado y la dureza del grano. Para esto se analiza el efecto de la relación fuente-destino sobre la composición del grano y particularmente sobre la concentración de las fracciones de zeínas identificadas en trabajos previos como determinantes de la dureza del grano de maíz. Finalmente, en el Capítulo 4 se efectúa un juicio de valor de los resultados en relación a la verificación de las hipótesis y objetivos planteados, se discute el alcance de los resultados obtenidos en relación a lo previamente conocido, se visualiza el posible impacto de la tesis sobre potenciales aplicaciones de los resultados y se plantean nuevas hipótesis para futuras investigaciones.

CAPÍTULO 1: CONTRIBUCION DEL AMBIENTE Y EL HIBRIDO A LA DUREZA DEL GRANO Y EL RENDIMIENTO DE MAIZ¹

¹ El contenido de este capítulo fue publicado en Cerrudo, A., Martínez, D., Izquierdo N., Cirilo, A., Reinoso, L., Valentinuz, O., Balbi, C., Andrade, F. Environment, Management, and Genetic Contributions to Maize Kernel Hardness and Grain Yield. 2017. Crop Sci. 57:2788–2798.

1.1 Introducción

La industria de molienda seca de maíz demanda granos que rindan una alta proporción de fracciones gruesas en la molienda (Lee *et al.*, 2007). El rendimiento de fracciones gruesas se asocia directamente con la dureza del grano (Wu, 1992; Holding y Larkins, 2006). La dureza del grano de maíz se ha asociado principalmente con el tipo de híbrido. Sin embargo, estudios más recientes indican que las condiciones ambientales en que crece el cultivo también afectan la dureza del grano de maíz (Governatori y Uhart, 1998; Cirilo *et al.*, 2011a; Blandino *et al.*, 2013; Tamagno *et al.*, 2015; Abdala *et al.*, 2018).

El ambiente en el que crece el cultivo resulta de la combinación del lugar, la estación de crecimiento y el manejo agronómico. Así, el efecto del ambiente sobre la dureza podría ser incluso más relevante que el del tipo de híbrido si consideramos la amplitud del área en que se cultiva maíz. En Argentina, el área de cultivo de maíz se extiende aproximadamente desde 25° a 40° S (Aramburu Merlos *et al.*, 2015) abarcando desde climas sub-tropicales hasta templados (Hall *et al.*, 1992; Caffera y Berbery, 2006). Por otro lado, el manejo agronómico también contribuye a generar variación en el ambiente para un cultivo que se desarrolla en un lugar y un momento determinado. La siembra tardía de maíz se ha convertido en una práctica frecuente en la Argentina, actualmente más de la mitad del maíz se cultiva en siembra tardía (Bolsa de Cereales, 2017). Los productores implementan fechas de siembra tardía para reducir el riesgo de ocurrencia de estrés hídrico durante el período crítico para el rendimiento (Maddonni, 2012; Mercau y Otegui, 2014) que se ubica alrededor de la floración (Andrade, Uhart y Frugone, 1993). El retraso de la siembra traslada la ocurrencia del llenado de granos a momentos de menor temperatura y menor radiación solar incidente (Cirilo y Andrade, 1994; Bonelli *et al.*, 2016) y por consiguiente provoca un deterioro de las condiciones para el crecimiento durante dicha etapa en la que se determina la dureza del grano de maíz (Cirilo *et al.*, 2011). Por otro lado, la disponibilidad de nutrientes y el manejo de la fertilización son también factores determinante de la dureza del grano de maíz (Governatori y Uhart, 1998; Duarte *et al.*, 2005; Gerde *et al.*, 2016; Tamagno *et al.*, 2016).

El efecto del ambiente sobre la dureza del grano de maíz ha sido previamente reportado. No obstante, los trabajos son escasos y no se ha cuantificado la contribución de factores ambientales respecto a la contribución del tipo de híbrido sobre la variación en la dureza de grano (Cirilo *et al.*, 2011; Gerde *et al.*, 2016; Tamagno *et al.*, 2016; Abdala *et al.*, 2018). Conocer y cuantificar el rol del ambiente y del tipo de híbrido sobre la dureza del grano será de utilidad en el diseño de estrategias de cultivo orientadas a

producir grano para abastecer la futura demanda de la industria de molienda seca. En esta línea, un carácter poco estudiado es la respuesta de la dureza de grano ante cambios en el ambiente para distintos tipos de híbrido (i.e., colorado duro, semi-dentado, dentado). Al respecto, Cirilo *et al.* (2011) encontraron una menor respuesta en la dureza ante variaciones en el ambiente para un híbrido de tipo colorado duro comparando con uno de tipo semi-dentado. No obstante, este último trabajo evaluó la respuesta de la dureza al ambiente para un rango relativamente acotado de híbridos y ambientes. La respuesta de un genotipo al ambiente se puede evaluar como la pendiente de la relación entre el desempeño del genotipo y el desempeño medio de un conjunto de genotipos en diversos ambientes. En este tipo de análisis, ampliamente utilizado para analizar la productividad, el desempeño medio de todos los híbridos evaluados en cada ambiente se utiliza como un indicador del ambiente o índice ambiental (Finlay y Wilkinson, 1963; Tollenaar y Lee, 2002; Di Matteo *et al.*, 2016).

La relación de molienda es un indicador adecuado de la dureza del grano de maíz (Robutti *et al.*, 1997; Fox y Manley, 2009; Blandino *et al.*, 2013). La relación de molienda se obtiene como cociente entre el peso de las fracciones gruesas y las finas después de someter una muestra de grano a un proceso de molienda y tamizado estandarizados (Pomeranz *et al.*, 1986). Un valor alto de relación de molienda es un atributo típico de granos duros y se asocia con altos rendimientos de fracciones gruesas durante la molienda seca. La relación de molienda se convierte así en una variable de gran utilidad para el estudio de la dureza del grano de maíz.

Según se comentó antes, la calidad del grano determina gran parte del valor del maíz para la industria molinera, no obstante como indica el trabajo de Tamagno *et al.* (2015), el rendimiento en grano determina gran parte de su valor para el productor agropecuario. Por lo tanto, para ser exitosas, las estrategias de producción orientadas a la dureza del grano deberán considerar sus efectos sobre el rendimiento del cultivo.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la contribución del tipo de híbrido y del ambiente sobre la dureza del grano (indicada por la relación de molienda) y sobre el rendimiento de maíz para el área maicera argentina.

Las hipótesis que se pusieron a prueba en este capítulo son:

- i) Considerando la diversidad de ambientes en los que se cultiva maíz en Argentina y la variabilidad genética disponible para dureza de grano, el efecto del ambiente sobre la dureza de grano es mayor que el efecto del tipo de híbrido.
- ii) La respuesta en la dureza de grano ante variaciones en el ambiente es mayor para un híbrido dentado que para uno colorado duro.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Cultivares, manejo de cultivos e información de los sitios

Dieciséis experimentos se llevaron a cabo en cinco localidades situadas a lo largo del área maicera argentina durante las campañas 2007-08 (2008), 2008-09 (2009), 2009-10 (2010), y 2010-11 (2011). Los experimentos se realizaron en las estaciones experimentales de INTA Viedma (40°49' S, 63°00' O), Balcarce (37°50' S, 58°15' O), Pergamino (33°53' S, 60°34' O) y Paraná (31°43' S, 60°32' O), y en el campo experimental de la Universidad Nacional del Nordeste en Corrientes (27°27' S, 58°49' O; Figura 1). Los detalles del suelo y el clima de cada experimento se presentan en la Tabla 1.

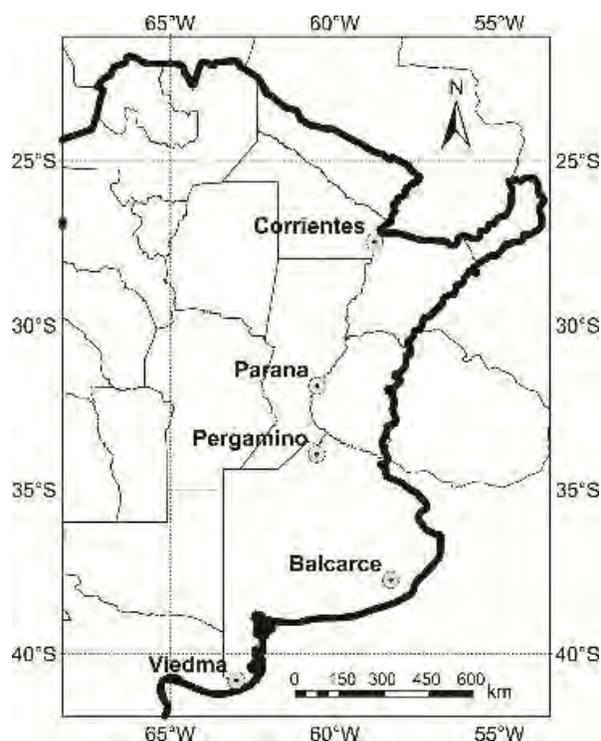


Figura 1 Mapa de Argentina indicando las localidades en las que se realizaron los experimentos.

Cada experimento se diseñó en bloques completos aleatorizados con arreglo en parcelas divididas con tres repeticiones. Los tratamientos incluyeron dos fechas de siembra que constituyeron la parcela principal, y dos niveles de fertilización y tres híbridos que bajo un arreglo factorial conformaron las sub-parcelas. En todos los experimentos se evaluó una fecha de siembra temprana y una tardía con la excepción de Corrientes 2010 y 2011, y Paraná 2011 donde sólo se evaluó la fecha de siembra temprana (Tabla 1). El manejo de la fertilización consistió en un tratamiento control,

orientado a maximizar el rendimiento en grano, y un tratamiento de fertilización suplementaria que recibió una re-fertilización con N y S en pre-floración.

Cada sitio experimental se laboreó con una pasada de rastra de disco en invierno y una pasada de rastra de disco y vibro-cultivador en primavera. Los cultivos antecesores se presentan en la

Tabla 1. La concentración de fósforo extractable (Bray II) en los primeros 20 cm de suelo fue ≥ 18 mg kg⁻¹ antes de la siembra en todos los experimentos. Adicionalmente, en todos los experimentos se incorporó 150 kg ha⁻¹ de superfosfato de calcio en pre-siembra de los cultivos. La concentración de azufre en los primeros 20 cm de suelo fue siempre ≥ 6 mg SO₄-S kg⁻¹ siendo la excepción Pergamino 2008 donde la concentración de SO₄-S fue 2 mg kg⁻¹. La disponibilidad de azufre generalmente no limita el rendimiento en grano de maíz en Argentina (Pagani *et al.*, 2009).

La fertilización para el tratamiento control consistió en la aplicación de N en forma de urea en el estado de seis hojas desarrolladas (Ritchie *et al.*, 1989). La dosis de nitrógeno se definió intentando maximizar el rendimiento en cada localidad y fue derivada de modelos desarrollados localmente (Melchori *et al.*, 1996; Sainz Rozas *et al.*, 2000; Mistrogino y Valentinuz, 2004). Las dosis de urea en el tratamiento control aportaron entre 60 y 90 kg N ha⁻¹. La urea se aplicó en bandas y fue inmediatamente incorporada con riego. El tratamiento de fertilización suplementaria recibió una fertilización adicional 100 kg N ha⁻¹ y 40 S kg ha⁻¹ para lo que se incorporó una mezcla de urea y sulfato de amonio en el estado 5 a 7 días antes de la floración (Ritchie *et al.*, 1989). La fertilización se realizó en este momento para minimizar las pérdidas por lixiviación y asegurar la provisión de nutrientes durante la etapa de llenado de granos. La mezcla se aplicó en bandas y fue incorporada inmediatamente con riego.

Tabla 1: Información de los experimentos incluyendo localidad, tipo de suelo, año de inicio del experimento, materia orgánica del suelo (M.O.), pH del suelo, cultivo antecesor (Antecesor), manejo de fecha de siembra (Siembra), fecha de siembra, de floración y de madurez fisiológica (Madurez), temperatura media (T_{med}) y radiación fotosintéticamente activa incidente diaria promedio (IPAR) durante la fase reproductiva del cultivo de maíz.

Localidad	Suelo	Año	pH	M.O. %	Antecesor	Siembra	Fecha de siembra	Floración	Madurez	T_{med} °C	IPAR MJm ⁻² d ⁻¹
Corrientes	Udipsament fino franco hypertermico	2010	-	-	Maíz	Temprana	4 Oct 09	10 Dic 09	25 Ene 10	27.1	11.3
		2011	5.5	1.4	Maíz	Temprana	14 Sep 10	6 Dic 10	21 Ene 11	26.0	11.2
Paraná	Argiudol fino térmico aquico	2008	6.6	2.8	Maíz	Temprana	18 Oct 07	28 Dic 07	16 Feb 08	24.9	11.9
						Tardía	10 Dic 07	17 Feb 08	14 Abr 08	22.2	8.8
		2009	6.5	2.5	Maíz	Temprana	10 Oct 08	16 Dic 08	3 Feb 09	25.2	11.8
						Tardía	5 Ene 09	2 Mar 09	24 Abr 09	22.1	8.7
		2010	6.8	2.8	Maíz	Temprana	5 Oct 09	17 Dic 09	4 Feb 10	25.3	11.4
						Tardía	9 Dic 09	9 Feb 10	5 Abr 10	23.3	9.3
2011	6.6	2.5	Maíz	Temprana	18 Oct 10	28 Dic 10	15 Feb 11	25.3	11.8		
Pergamino	Argiudol típico franco arcilloso limoso	2008	6.3	2.5	Maíz	Temprana	17 Oct 07	30 Dic 07	25 Feb 08	23.8	11.6
						Tardía	13 Dic 07	11 Feb 08	12 Abr 08	21.0	9.1
		2009	6.8	2.5	Maíz	Temprana	22 Oct 08	24 Dic 08	18 Feb 09	24.0	12.1
						Tardía	15 Dic 08	13 Feb 09	18 Abr 09	21.9	9.3
		2010	7.1	2.5	Maíz	Temprana	6 Oct 09	21 Dic 09	19 Feb 10	23.8	11.4
						Tardía	15 Dic 09	15 Feb 10	12 Abr 10	20.1	9.5
2011	7.3	2.3	Maíz	Temprana	13 Oct 10	1 Ene 11	1 Mar 11	22.4	11.7		
Balcarce	Argiudol típico franco arcilloso	2008	5.9	5.6	Maíz	Temprana	18 Oct 07	15 Ene 08	20 Mar 08	20.3	9.7
						Tardía	11 Dic 07	21 Feb 08	26 Abr 08	17.7	7.6
		2009	6.1	5.6	Maíz	Temprana	20 Oct 08	8 Ene 09	20 Mar 09	21.8	11.2
						Tardía	8 Dic 08	15 Feb 09	30 Abr 09	19.1	8.2
		2010	6.17	5.5	Trigo	Temprana	15 Oct 09	6 Ene 10	20 Mar 10	20.7	10.7
						Tardía	9 Dic 09	15 Feb 10	23 Abr 10	17.0	8.0
2011	6.1	5.5	Soja	Temprana	18 Oct 10	11 Ene 11	15 Mar 11	21.2	11.2		
Viedma	Gypsiustert aridico fino limoso arcilloso	2010	7.9	4.5	Pastura	Temprana	22 Oct 09	15 Ene 10	28 Mar 10	20.5	10.9
						Tardía	14 Dic 09	16 Feb 10	21 Abr 10	17.6	8.3
		2011	8.2	4.4	Maíz	Temprana	23 Nov 10	1 Feb 11	10 Abr 11	20.3	10.1
						Tardía	10 Dic 10	12 Feb 11	16 Abr 11	19.3	9.1

Se evaluaron tres híbridos de maíz que cubren el rango de durezas de grano disponible localmente, que están adaptados a toda el área maicera de Argentina y que fueron ampliamente adoptados por los productores argentinos. Los híbridos evaluados fueron i) el colorado duro M522 (de Dow Agrosiences Argentina), que presentó los mayores niveles de dureza de grano entre 20 híbridos argentinos previamente evaluados por Eyherabide *et al.* (2004) y también caracterizado como duro por Tamagno *et al.* (2016); ii) el semi-dentado Cóndor (de Syngenta Argentina), que presentó un nivel intermedio de dureza cuando fue caracterizado por Eyhérabide *et al.* (2004) y fue caracterizado como semi-dentado por Cirilo *et al.* (2011); iii) el híbrido dentado DK190 (de Monsanto Argentina) caracterizado como blando por Tamagno *et al.* (2015). Los híbridos M522, Cóndor y DK190 fueron liberados en 2002, 2000 y 2003 respectivamente (INASE, 2017) y presentan una fenología similar (Tamagno *et al.*, 2015) y una madurez relativa de 123, 121 y 120, respectivamente.

Los experimentos fueron sembrados a mano utilizando dos o tres semillas por golpe y raleados a $7,5 \text{ pl m}^{-2}$ en el estado de 3 hojas expandidas. Las unidades experimentales consistieron de 5 hileras de 10,0 m de largo espaciadas 0,7 m (35 m^2). Se efectuó riego complementario para mantener el contenido de agua por encima del 50% de la capacidad de almacenaje de agua útil en el primer metro de suelo durante toda la estación de crecimiento. Las malezas fueron controladas por una combinación de herbicidas pre- y post-emergentes que variaron con el sitio y el año. Las parcelas fueron desmalezadas a mano para controlar malezas que escaparon al control químico.

1.2.2 Mediciones

El momento de ocurrencia de los estadios de desarrollo reproductivo (Ritchie *et al.*, 1989) se determinó recorriendo las parcelas a intervalos de 3-5 días. La floración se registró como la fecha en que el 50% de las plantas presentaban al menos un estigma visible. La madurez fisiológica se registró como la fecha en la que el 50% de las plantas presentaban, en la porción central de la espiga, granos que se encontraban en el estadio 0,75 línea de leche o más avanzado (Hunter *et al.*, 1991). La cosecha se realizó después de ocurrida la madurez fisiológica. Al momento de la cosecha el contenido de humedad de grano fue siempre menor a 250 g kg^{-1} . En cada parcela, se recolectaron manualmente las espigas de una superficie entre 5,0 y $7,0 \text{ m}^2$. Las espigas fueron deschaladas y secadas a temperatura ambiente hasta un contenido de humedad de grano 140 y 160 g kg^{-1} antes de ser trilladas con una máquina estática. El grano se pesó y su contenido de humedad se determinó utilizando el medidor de humedad Tesma A-79 (Tesma SAIC). El rendimiento en grano se calculó considerando un contenido de humedad de 0 g kg^{-1} .

La relación de molienda fue determinada por duplicado para cada parcela según el método descrito por Pomeranz *et al.* (1986). Una muestra de 50 g de granos enteros fue molida por 15 segundos en un molino de laboratorio (Seedboro Equipment Company). Los granos molidos fueron, luego, tamizados a máxima velocidad por 60 s en un tamizador (Chopin) equipado con tamices circulares con aperturas de malla de 1,0 y 0,5 mm. Las cantidades de material retenidas por los tamices de 1,0 mm y 0,5-mm fueron pesadas en forma separada. La relación de molienda se determinó como el cociente entre el peso de la fracción gruesa y el peso de la fracción fina.

1.2.3 Análisis de datos

Los datos fueron analizados utilizando estadística descriptiva, ANOVA y modelos de regresión lineal pertenecientes a los programas R (De Mendiburu, 2009) y Prism 5

(2009). En primer lugar se analizó el efecto del híbrido, el ambiente y su interacción sobre la relación de molienda y el rendimiento de los cultivos. Cada combinación de localidad y año se consideró como un sitio. Cada combinación de sitio, fecha de siembra y manejo de la fertilización fue considerada un ambiente. Adicionalmente, se estimó la contribución de cada fuente de variación a la variabilidad total como el cociente entre la suma de cuadrados de dicha fuente de variación y la suma de cuadrados total tal como se describe en Chenu (2015).

Un segundo análisis se llevó a cabo para evaluar la respuesta de la dureza (indicada por la relación de molienda) y del rendimiento a la variación en las condiciones ambientales para los distintos tipos de híbridos. La respuesta de dichas variables fueron estimadas por la pendiente del modelo de regresión entre la relación de molienda o el rendimiento de cada híbrido y el promedio de la relación de molienda o el rendimiento de los tres híbridos en cada ambiente como describieron Finlay and Wilkinson (1963). Las diferencias en la respuesta entre híbridos fueron evaluadas mediante la comparación de los intervalos de confianza de las pendientes de los modelos de regresión.

Un tercer análisis se realizó para evaluar la contribución de los distintos factores que conformaron el ambiente sobre la dureza de grano y el rendimiento de maíz. El análisis de varianza se realizó a través de los sitios para evaluar el efecto de la fecha de siembra, la fertilización y sus interacciones sobre dichas variables. Los sitios Corrientes (2010 y 2011) y Paraná (2011) no se incluyeron en el análisis por no disponer en ellos de siembra tardía. Para este análisis, los híbridos fueron agrupados debido a la baja proporción de la variabilidad explicada por la interacción (no cruzada) entre el tipo de híbrido y el ambiente. El test de diferencia mínima significativa de Fisher se utilizó para comparar las medias de los tratamientos. Las pendientes de los modelos de regresión lineal fueron evaluadas a través de un test-t (Steel y Torrie, 1960).

1.3 Resultados

Las fechas de floración y madurez fisiológica (Tabla 1) no fueron afectadas por el híbrido o el manejo de la fertilización en ningún experimento ($P \geq 0,091$). Se logró un amplio rango de condiciones ambientales (Tabla 1) mediante: i) localidades situadas sobre una transecta norte-sur a través de la región productora de maíz en Argentina, abarcando desde climas sub-tropicales hasta templados, ii) variación interanual, iii) fechas de siembra contrastantes combinadas con la variación en la oscilación térmica y radiativa de cada localidad y iv) diferentes manejos de fertilización. Esta diversidad de ambientes en conjunto con el uso de distintos tipos de híbridos resultaron en niveles de relación de molienda que variaron entre 2,0 y 7,0 g g⁻¹ y rendimientos que variaron entre 494 y 1391 g m⁻² (Figura 2 y Figura 3).

1.3.1 Contribución del tipo de híbrido y el ambiente

El tipo de híbrido y el ambiente (i.e., la combinación entre cada sitio, fecha de siembra y manejo de la fertilización) y sus interacciones presentaron efecto sobre la dureza indicada por la relación de molienda y sobre el rendimiento en grano (Tabla 2). El tipo de híbrido explicó el 22% y 8% de la variación de la relación de molienda y el rendimiento, respectivamente. Por su parte, el ambiente explicó el 64 y el 77% de la variación total para la relación de molienda y el rendimiento, respectivamente. La interacción entre el tipo de híbrido y el ambiente, en cambio explicó una pequeña proporción de la variabilidad registrada en ambas variables ($\leq 7\%$).

El ordenamiento de los híbridos en cuanto a relación de molienda y rendimiento en grano fue consistente a través de los ambientes (Figura 2 y Figura 3). La relación de molienda del híbrido colorado duro fue siempre mayor o igual que aquella del híbrido semi-dentado, mientras que la relación de molienda para este último fue siempre mayor o igual a aquella del híbrido de tipo dentado. En promedio, la relación de molienda para el híbrido colorado duro fue un 8% superior a la del híbrido semi-dentado, y la relación de molienda del híbrido semi-dentado fue un 7% superior a la del híbrido dentado. La tendencia opuesta se observó para el rendimiento en grano (Figura 3). En promedio el rendimiento en grano del híbrido colorado duro fue un 8% inferior al del híbrido semi-dentado y el rendimiento del híbrido semi-dentado fue un 7% menor al del híbrido dentado.

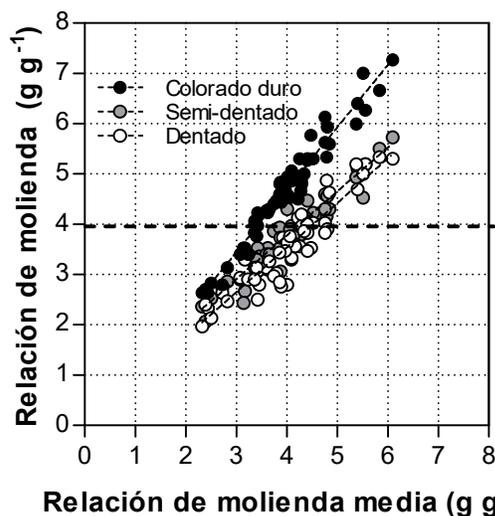


Figura 2: Relación de molienda para tres híbridos de maíz de distinto tipo de endosperma en función de la relación de molienda promedio para diferentes ambientes (sitios y manejos agronómicos). La relación de molienda media se calculó como el promedio de la relación de molienda para los tres híbridos en cada combinación de sitio, fecha de siembra y manejo de fertilización. Cada punto es el promedio de tres repeticiones. La línea punteada horizontal indica la relación de molienda requerida para alcanzar el grado de calidad superior en el estándar europeo según Cirilo *et al.* (2011). Colorado duro*: $y=1,24\pm 0,08x-0,28$, $R^2=0,96$, $P<0,001$; semi-dentado: $y=0,87\pm 0,08x+0,29$, $R^2=0,90$, $P<0,001$; dentado: $y=0,89x\pm 0,1-0,01$, $R^2=0,85$, $P<0,001$. * El valor que sigue al símbolo \pm conforma el intervalo de confianza de la pendiente (95%).

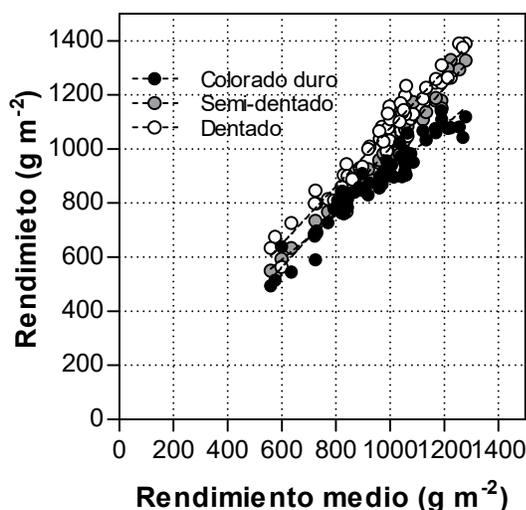


Figura 3: Rendimiento para tres híbridos de maíz de distinto tipo de endosperma en función del rendimiento medio para diferentes ambientes (sitios y manejos agronómicos). El rendimiento medio por ambiente se calculó como el promedio de rendimiento para los tres híbridos en cada combinación de sitio, fecha de siembra y manejo de fertilización. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones. Colorado duro*: $y=0,83\pm 0,07x+93,4$, $R^2=0,92$, $P<0,001$; semi-dentado: $y=1,1\pm 0,08x-99,8$, $R^2=0,96$, $P<0,001$; dentado: $y=1,07\pm 0,1x+6,3$, $R^2=0,95$, $P<0,001$. * El valor que sigue al símbolo \pm conforma el intervalo de confianza de la pendiente (95%).

Tabla 2: Resumen ANOVA para los efectos del tipo de híbrido y el ambiente sobre la dureza de grano indicada por relación de molienda y el rendimiento. El ambiente surge de la combinación de localidades, fechas de siembra, manejo de fertilización y años.

Fuente de variación	gl [¶]	Relación de molienda				Rendimiento			
		Sc	P > F	LSD [†]	sc/sct (%)	sc	P > F	LSD	ss/sct (%)
Ambiente (A)	57	378	**	-	64	1666555160	**	-	77
Híbrido (H)	2	128	**	-	22	166431783	**	-	8
A x H	114	44	**	0,79	7	133312156	**	867	6
Residual	348	42			7	202847372			9
Total		592				2169146471			

** Significativo al 0,01 de probabilidad.

¶ gl: grados de libertad; sc: suma de cuadrados, sct: suma de cuadrados total.

† Diferencia mínima significativa para P ≤ 0,01.

1.3.2 Respuesta del tipo de híbrido al ambiente en el que crece el cultivo

La variación en la relación de molienda ante cambios en el ambiente del cultivo fue mayor para el híbrido colorado duro comparando con el semi-dentado y el dentado (Figura 2). Así, la pendiente del modelo de regresión entre la relación de molienda y la media ambiental de la relación de molienda fue mayor para el híbrido colorado duro comparando con el semi-dentado y dentado (1,24 vs. 0,89 y 0,87, respectivamente; P<0,001; Figura 2).

Por otro lado, para rendimiento, el híbrido colorado duro fue el que presentó la menor respuesta al ambiente (Figura 3). La pendiente del modelo de regresión entre el rendimiento en grano y el rendimiento medio para cada ambiente fue más baja para el colorado duro comparando con el semi-dentado y dentado (0,83 vs. 1,07 y 1,10, respectivamente; P<0,001; Figura 3). Por último, la dureza indicada por la relación de molienda no estuvo asociada al rendimiento del ambiente (P=0,12).

1.3.3. Contribución del sitio y de las prácticas de manejo.

Al analizar la contribución de los factores que conformaron el ambiente (sitio, fecha de siembra y manejo de la fertilización) sobre la dureza y el rendimiento (

Tabla 4) surge que la fertilización tuvo efecto sobre ambas variables ($P \leq 0,001$, Tabla 3 y

Tabla 4). No obstante, el manejo de la fertilización explicó sólo alrededor del 1% de la variabilidad observada en la red experimental (

Tabla 4). En promedio, la fertilización suplementaria en pre-floración incrementó la relación de molienda en un 5% comparando con el tratamiento control (Tabla 3). Las respuestas a la fertilización suplementaria de la relación de molienda y el rendimiento estuvieron asociadas ($R^2=0,32$, $P=0,001$, Figura 4), y esta asociación no difirió de la función 1:1 ($P=0,037$). El sitio, la fecha de siembra y su interacción también afectaron la relación de molienda y el rendimiento.

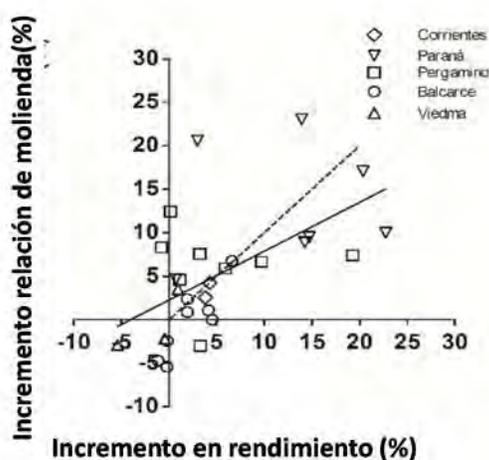


Figura 4: Incremento relativo en la dureza indicada por la relación de molienda en función del incremento relativo en rendimiento en respuesta a la fertilización suplementaria con N y S en pre-floración para diferentes localidades ($y=0,53x+2,27$, $R^2=0,33$, $P=0,0012$). La línea discontinua representa la relación 1:1. Cada valor representa el promedio de tres repeticiones.

A diferencia del manejo de la fertilización, el sitio y la fecha de siembra explicaron más de la mitad de la variación observada en la dureza de grano (64%) y rendimiento (74%). En siembras tempranas, las diferencias en la relación de molienda obtenida entre sitios fue relativamente baja (Tabla 3) y los valores de relación de molienda obtenidos se acercaron, en general, a los niveles exigidos por la industria de molienda seca (4 g g^{-1} ; Cirilo *et al.*, 2011). La relación de molienda siempre se redujo con el atraso en la fecha de siembra en Viedma y en Balcarce, excepto en 2008. En promedio, el retraso en la siembra redujo la relación de molienda un 27 y 29% en Viedma y Balcarce, respectivamente (Tabla 3). En cambio en bajas latitudes el efecto de la fecha de siembra sobre la relación de molienda fue menor y poco consistente (Tabla 3 y

Tabla 4). En bajas latitudes, la relación de molienda estuvo generalmente por encima de los requerimientos de la industria sin importar la fecha de siembra.

Tabla 3: Dureza indicada por la relación de molienda y rendimiento de maíz para distintos ambientes conformados por la combinación de sitios (localidad-año), fechas de siembra temprana y tardía, fertilización control (Control) y suplementaria en pre-floración (Fert). Cada valor es el promedio de tres híbridos y tres repeticiones[#].

Sitio		Siembra	Relación de molienda (g g ⁻¹)			(Rendimiento g m ⁻²)		
Localidad	Año		Control	Fert	Promedio	Control	Fert	Promedio
Paraná	2008	Temprana	3,87	4,23	4,05	924	1060	992
Paraná	2008	Tardía	4,27	4,47	4,37	998	1005	1002
Paraná	2009	Temprana	4,10	4,80	4,45	599	721	660
Paraná	2009	Tardía	3,40	4,10	3,75	560	576	568
Paraná	2010	Temprana	4,00	4,40	4,20	844	1035	940
Paraná	2010	Tardía	3,47	4,27	3,87	635	724	680
Pergamino	2008	Temprana	3,60	3,90	3,75	1085	1077	1081
Pergamino	2008	Tardía	4,50	4,80	4,65	962	1055	1008
Pergamino	2009	Temprana	5,83	6,10	5,97	1044	1056	1050
Pergamino	2009	Tardía	5,57	5,40	5,48	961	993	977
Pergamino	2010	Temprana	4,40	4,73	4,57	1133	1169	1151
Pergamino	2010	Tardía	4,30	4,83	4,57	887	888	887
Pergamino	2011	Temprana	4,07	4,37	4,22	1064	1269	1166
Pergamino	2011	Tardía	3,40	3,60	3,50	998	1056	1027
Balcarce	2008	Temprana	3,13	3,17	3,15	1121	1168	1145
Balcarce	2008	Tardía	2,40	2,40	2,40	970	1014	992
Balcarce	2009	Temprana	4,43	4,73	4,58	975	1040	1008
Balcarce	2009	Tardía	4,20	4,30	4,25	807	822	815
Balcarce	2010	Temprana	5,50	5,37	5,43	1191	1189	1190
Balcarce	2010	Tardía	2,83	2,70	2,77	839	830	835
Balcarce	2011	Temprana	3,77	3,80	3,78	1255	1279	1267
Balcarce	2011	Tardía	2,47	2,33	2,40	1001	998	1000
Viedma	2010	Temprana	4,92	5,15	5,04	1244	1266	1255
Viedma	2010	Tardía	3,43	3,33	3,38	771	729	750
Viedma	2011	Temprana	3,83	3,97	3,90	1213	1224	1218
Viedma	2011	Tardía	3,07	3,00	3,03	992	988	990
		Promedio	3,93	4,14		953	1000	

[#] Los resultados del ANOVA y los valores de diferencia mínima significativa se presentan en la Tabla 4.

Por otro lado, el rendimiento en grano se redujo en todas las localidades al retrasar la fecha de siembra siendo la excepción Paraná en 2008 y Pergamino en 2008 y 2009 (Tabla 3). La reducción en rendimiento por el atraso en la fecha de siembra fue en promedio 29, 21, 12, y 13% para Viedma, Balcarce, Pergamino, y Paraná, respectivamente.

Tabla 4: Resumen ANOVA para los efectos del sitio, la fecha de siembra y el manejo de la fertilización sobre la dureza de grano indicada por relación de molienda y el rendimiento.

Fuente de Variación	Relación de molienda					Rendimiento			
	gl [✳]	Sc	P > F	LSD [†]	sc/sct (%)	Sc	P > F	LSD	sc/sc (%)
Sitio (S) #	12	222	**	-	40	849966974	**	-	41,2
Fecha de siembra (FS)	1	52	**	-	9	466301344	**	-	22,6
Manejo fertilización (MF)	1	5,3	**	0,24	1	23198616	**	38,9	1,1
S x Bloque	13	2,3	ns [‡]	-	0,4	16396825	ns	-	0,8
S x FS	12	86	**	0,62	15	202307453	**	140,2	9,8
FS x MF	1	0,1	ns	-	0,02	5483122	ns	-	0,3
S x MF	12	6,6	ns	-	1	24920144	ns	-	1,2
S x FS x MF	12	1,4	ns	-	0,3	12405857	ns	-	0,6
Residual	403	185			33	461172796			22,4
Total		561				2062153131			

** Significativo al 0,01 de probabilidad

‡ ns: no significativo.

✳ gl: grados de libertad; sc, suma de cuadrados; sct: suma de cuadrados total.

† Diferencia mínima significativa para $P \leq 0,01$.

Corrientes 2009 y 2010, y Paraná 2010 no fueron incluidos en el análisis por contar solo con la fecha de siembra temprana.

1.4 Discusión

La mayor parte de los trabajos previos que estudiaron la dureza del grano de maíz se centraron en el efecto del híbrido (Robutti, Borrás, Ferrer, Percibaldi, 2000; Duarte *et al.*, 2005; Gerde *et al.*, 2016). Recientemente, comenzó a explorarse el efecto del ambiente sobre dicha variable de calidad (Gubernatory y Uhart, 1998; Cirilo *et al.*, 2011a; Tamagno *et al.*, 2015; Abdala *et al.*, 2018). Esta tesis extiende estos estudios al combinar híbridos representativos del rango de variabilidad disponible en tipo de granos en un amplio rango de condiciones ambientales lograda con sitios y prácticas de manejo de cultivo contrastantes (

Tabla 1, Figura 2 y Figura 3).

La dureza de grano indicada por la relación de molienda fue afectada consistentemente por el tipo de híbrido a través de dicho rango de ambientes. Los máximos valores de relación de molienda se alcanzaron siempre con el híbrido colorado duro (Tabla 2; Figura 2). La diferencia en la relación de molienda entre el híbrido colorado duro y el dentado fue similar a aquella reportada entre el grupo de híbridos más duros y el grupo de híbridos más blandos estudiados por Eyhéabide *et al.* (2004). Además, los resultados de esta tesis concuerdan con estudios más recientes que comparan la dureza de grano para distintos híbridos de maíz (Cirilo *et al.*, 2011; Gerde *et al.*, 2016; Tamagno *et al.*, 2016).

Por otro lado, del análisis de los datos generados surgió que la respuesta de la relación de molienda al ambiente depende del tipo de híbrido y que dicha respuesta fue máxima para el híbrido colorado duro (Figura 2). Estos resultados no apoyan la idea general de que los híbridos de grano más duro presentan mayor estabilidad en dureza de grano ante cambios en el ambiente, también indicada por Cirilo *et al.* (2011). No obstante, de acuerdo a las normas de comercialización vigentes la relación de molienda debe ser superior a $4,0 \text{ g g}^{-1}$ para que el grano sea clasificado como de máxima calidad para la industria de molienda seca (Cirilo *et al.*, 2011). Considerando este nivel umbral de dureza, el híbrido colorado duro hubiese alcanzado la máxima calidad en el 64% de los ambientes evaluados, mientras que el semi-dentado en el 28%, y el dentado tan solo en el 16% de dichos ambientes (Figura 2). Por lo tanto, el híbrido con el grano más duro presentó la mayor respuesta en dureza de grano al ambiente pero es el que con mayor frecuencia alcanzó el requerimiento de dureza de la industria de molienda seca.

El rendimiento del híbrido colorado duro fue consistentemente menor comparando con el híbrido dentado y semi-dentado (Figura 3), lo que es concordante con varios reportes (Brun y Dudley, 1989; Eyhéabide *et al.*, 2004; Luque *et al.*, 2006; Cirilo *et al.*, 2011). Asimismo, la brecha de rendimiento entre el híbrido colorado duro y el dentado es consistente con los resultados de Tamagno *et al.* (2015) quienes indican que la productividad de híbridos colorados duros se ubicó alrededor del 80% respecto a la lograda por híbridos dentados. Estos autores concluyeron que la principal causa de esta penalidad en el rendimiento para los híbridos de tipo colorado radica en el establecimiento de un menor número de granos.

El ambiente fue la principal fuente de variación para la relación de molienda y el rendimiento (67 y 74% de la suma de cuadrado total, respectivamente; Tabla 3). Destacándose de esta manera el efecto del sitio y el manejo agronómico por sobre el

efecto del tipo de híbrido en la determinación de la dureza del grano de maíz. Entre los factores que conformaron el ambiente, el manejo de la fertilización tuvo un efecto menor sobre la relación de molienda y el rendimiento comparando con el efecto del sitio/año y el manejo de la fecha de siembra (Tabla 3 y

Tabla 4). De esta manera y en línea con lo esperado el tratamiento control de fertilización suministró los nutrientes necesarios para maximizar el rendimiento en gran parte de los ambientes evaluados. Los ambientes con mayor respuesta a la re-fertilización correspondieron en general a Paraná y Pergamino que presentan suelos con baja M.O. (Tabla1). En lo que respecta a la dureza, estos resultados están en línea con los reportados por otros trabajos realizados en climas templados y tropicales que muestran que el incremento en la disponibilidad de nitrógeno puede incrementar la dureza del grano de maíz pero que la magnitud del efecto está influenciada por la capacidad del suelo de proveer nutrientes al cultivo (Bauer y Carter, 1986; Kniep y Mason, 1991; Governatori y Uhart, 1998; Tamagno *et al.*, 2014; Tamagno *et al.*, 2016; Gerde *et al.*, 2016; Duarte *et al.*, 2005). En este trabajo las máximas respuestas se observaron en las localidades situadas a menor latitud con suelos con bajo contenido de materia orgánica.

Las respuestas de la relación de molienda y el rendimiento al incremento en la fertilización fueron comparadas en un intento de establecer posibles diferencias en el requerimiento de fertilización para maximizar ambas variables (Figura 4). Una respuesta más que proporcional para la relación de molienda respecto al rendimiento indicaría que el nivel de fertilización para maximizar la dureza es mayor que el requerido para maximizar el rendimiento como recientemente sugirieron Gerde *et al.* (2016). Las respuestas a la fertilización suplementaria para ambas variables estuvieron directa pero débilmente asociadas y el modelo de regresión no difirió de la función 1:1. Este análisis, en principio, no indica requerimientos diferenciales en la fertilización para maximizar la dureza y el rendimiento. No obstante, futuros estudios serán necesarios para avanzar en el entendimiento de los umbrales de fertilización para dureza y rendimiento.

La mayor parte de la variación en la relación de molienda y el rendimiento fue debida al efecto combinado del sitio y la fecha de siembra (Tabla 3 y

Tabla 4). La respuesta de la dureza y el rendimiento a la fecha de siembra fue dependiente del sitio. En altas latitudes el retraso en la fecha de siembra generalmente redujo la relación de molienda muy por debajo de los niveles requeridos por la industria (i.e., Balcarce y Viedma; Tabla 3 y

Tabla 4). En dichas latitudes, sin embargo, los requerimientos de la industria fueron frecuentemente alcanzados en fechas de siembra temprana que en promedio a través de los años alcanzaron una relación de molienda de 4,23 y 4,65 g g⁻¹ para Balcarce y Viedma, respectivamente, en tanto que el efecto de la fecha de siembra perdió relevancia y consistencia en las localidades ubicadas en bajas latitudes. De esta manera, el retraso de la fecha de siembra como estrategia para estabilizar el rendimiento de maíz (Maddonni, 2012) no siempre será compatible con el logro de los niveles de dureza demandados por la industria de molienda seca. Dicha interacción entre la fecha de siembra y la localidad sobre la dureza del grano puede ser una de las causas de la alta concentración de producción de maíz para la industria de molienda seca en la región central y norte de Argentina que permiten producir granos de alta dureza en una amplia ventana de fecha de siembra amplia comparando con la región sur en la producción de granos de alta dureza es menos probable y sólo se logra en fecha de siembra temprana.

Las evidencias recogidas indican que el efecto del ambiente sobre la dureza de granos es mayor al del tipo de híbrido lo que llevó a **no rechazar la primera hipótesis** que proponía que **considerando la diversidad de ambientes en los que se cultiva maíz en Argentina y la variabilidad genética disponible para dureza de grano, el efecto del ambiente sobre la dureza de grano es mayor que el efecto del tipo de híbrido**. Por otro lado, la respuesta en la dureza indicada por la relación de molienda ante variaciones en el ambiente fue mayor para el híbrido colorado duro respecto a los híbridos semi-dentado y dentado lo que llevó al **rechazo de la segunda hipótesis** que proponía **que la respuesta en la dureza de grano ante variaciones en el ambiente es mayor para un híbrido dentado que para uno colorado duro**.

De esta manera, en este capítulo se confirmó la consistencia del efecto del tipo de híbrido sobre la dureza del grano de maíz y por otro lado se destacó la relevancia del efecto del ambiente en el que se desarrolla el cultivo sobre esta variable. Así la elección del sitio y el manejo agronómico del cultivo deberán ser considerados en conjunto con el tipo de híbrido en el diseño de estrategias orientadas a producir maíz de alta dureza. Surge aquí también la necesidad de avanzar en nuestra capacidad de entender y predecir el efecto del ambiente sobre la dureza del grano de maíz que será abordado en el Capítulo 2.

**CAPÍTULO 2: RELACIÓN FUENTE-DESTINO DURANTE EL PERÍODO DE
LLENADO DE GRANOS COMO ESTIMADOR DE LA DUREZA DEL GRANO DE MAÍZ**

2.1 Introducción

En el capítulo anterior se destacó el rol del ambiente en la determinación de la dureza del grano de maíz. Se propone ahora avanzar en la capacidad de estimar el efecto del ambiente sobre esta variable de calidad del grano. La obtención de un modelo que integre el efecto del ambiente sobre la dureza de grano será de gran utilidad para el diseño de estrategias productivas orientadas a obtener grano de un nivel de dureza determinado (Boote *et al.*, 1996). Entre los factores que conformaron el ambiente en la red de experimentos realizada, el sitio (localidad/año) y la fecha de siembra fueron los que presentaron mayor efecto sobre la dureza del grano indicada por la relación de molienda. La demanda de agua de los cultivos fue abastecida por las precipitaciones y riego complementario, por lo que la radiación y la temperatura surgen como las principales variables implicadas en el efecto del ambiente sobre la dureza del grano. De esta manera, la integración del efecto de dichas variables puede ser el punto de partida para el modelado del efecto del ambiente sobre la dureza del grano de maíz.

La dureza del grano está relacionada con su composición (Chandrashekar y Mazhar, 1999) y la composición termina por definirse durante la etapa de llenado de granos (Cirilo y Andrade, 1998). En concordancia, trabajos previos indicaron que la dureza del grano se asoció de manera directa y positiva con la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos (Governatori and Uhart, 1998; Cirilo *et al.*, 2011). La relación fuente-destino es una variable que intenta describir el balance entre la fuente y la demanda de asimilados en un período determinado del cultivo (Uhart y Andrade, 1991). De esta manera, la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos puede ser de utilidad para vincular el ambiente con la dureza del grano de maíz.

Los trabajos hasta hoy publicados, utilizaron el crecimiento del cultivo durante el llenado de granos como estimador de la fuente de asimilados y el número de granos fijados como el estimador de la demanda de los destinos reproductivos. La relación fuente-destino estimada de esta manera no resulta en un indicador del efecto del ambiente, sino del efecto combinado del ambiente y el híbrido utilizado. Esto es consecuencia de que el número de granos fijados en una determinada condición ambiental es dependiente del genotipo (Echarte *et al.*, 2004). Además, ante una eventual limitación por destinos reproductivos que pueda provocar el retrocontrol de la fotosíntesis y así a una reducción en el crecimiento acumulado durante el llenado de granos (Tollenaar y Daynard, 1982) el mencionado método llevaría a una subestimación de la fuente y, por lo tanto, de la relación fuente-destino durante dicho período.

En esta tesis se propone un método para estimar la relación fuente-destino durante el período de llenado granos que no es afectado por otras características del híbrido más que su ciclo. Este método contempla el efecto de factores ambientales que actúan sobre el estado fisiológico del cultivo en los momentos en que se determina la fuente de asimilados y la demanda de los destinos reproductivos durante el período de llenado de granos. Este indicador de la relación entre la fuente de asimilados y la demanda de los destinos reproductivos en un ambiente determinado permitirá estimar y comparar la dureza del grano posible de alcanzar en distintos ambientes surgidos de la combinación de distintas localidades, años y prácticas de manejo.

El estado fisiológico del cultivo de maíz alrededor de floración se relacionó estrechamente con el número de granos fijados y con el peso potencial de los mismos en trabajos previos (Claassen y Shaw, 1970; Otegui y Bonhomme, 1998; Gambín y Borrás, 2010; Cerrudo *et al.*, 2013). De esta manera, la capacidad fotosintética del cultivo durante el período crítico puede ser considerada como un indicador de la demanda que tendrán los destinos reproductivos durante el período de llenado de granos. Por otro lado, la capacidad fotosintética desde el final del período crítico hasta madurez fisiológica puede ser considerada como un indicador de la fuente de asimilados para abastecer a la demanda previamente establecida.

En ausencia de limitaciones hídricas y nutricionales, la capacidad fotosintética del cultivo surge principalmente del efecto combinado de la radiación solar interceptada y la temperatura (Loomis y Williams, 1963; Gifford y Evans, 1981). En dichas condiciones, el crecimiento potencial estimado en función de la radiación y la temperatura imperantes en determinada etapa del cultivo es un buen indicador de la capacidad fotosintética del cultivo durante la misma.

El segundo objetivo de esta tesis es generar un modelo para estimar la dureza del grano de maíz basado en la integración de variables ambientales determinantes de la relación entre la fuente de asimilados y la capacidad de los destinos reproductivos durante el período llenado de granos. La hipótesis a poner a prueba establece que la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos estimada como el cociente entre el crecimiento potencial acumulado durante el período de llenado de granos y el crecimiento potencial acumulado durante el período crítico de floración se asocia directamente con la relación de molienda de maíz.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Relación fuente-destino durante el período de llenado de granos

La fuente de asimilados durante el período de llenado efectivo de los granos se determinó como el crecimiento potencial acumulado desde final del período crítico de floración hasta la madurez fisiológica. En tanto que, la demanda del destino reproductivo durante el período de llenado de granos para un ambiente determinado fue estimada como el crecimiento potencial acumulado durante el período crítico de floración. La relación fuente-destino durante el período de llenado de granos se calculó entonces como:

$$\frac{\text{Fuente}}{\text{Destino}} = \frac{\text{Crecimiento potencial acumulado entre } 250^{\circ}\text{Cd desde floración y madurez fisiológica}}{\text{Crecimiento potencial acumulado entre } -200^{\circ}\text{Cd y } 250^{\circ}\text{Cd desde floración}} \text{ eq. 1}$$

El crecimiento potencial acumulado en dichas etapas se determinó en base al efecto de la temperatura sobre el desarrollo, y el efecto de la temperatura y la radiación sobre el crecimiento del cultivo como se detalla a continuación.

2.2.1.1 Desarrollo

En un trabajo complementario (Cerrudo *et al.*, 2013) se determinó para híbridos de ciclo similar a los aquí evaluados que el período crítico en el que se determina el número y el peso potencial de los granos está comprendido entre 200 °Cd previos a floración y 250 °Cd posteriores a dicho momento. De esta manera, la ubicación y duración del período crítico de floración se determinó, para cada ambiente, cómo el período comprendido desde 200 °Cd antes de la fecha de floración hasta 250 °Cd pasada la misma. En tanto que, la ubicación y duración del llenado efectivo de los granos se determinó como el período comprendido desde 250 °Cd pasada la floración hasta la madurez fisiológica del cultivo (Tabla 1, página 16). El método de cálculo empleado se resume en la siguiente ecuación 2:

$$TT = \sum_1^d \frac{(t \text{ max} - t \text{ min})}{2} - tb \quad (\text{eq. 2})$$

Donde TT es la duración en unidades de tiempo térmico de una determinada etapa, $t \text{ max}$ es la temperatura máxima diaria, $t \text{ min}$ es la temperatura mínima diaria, tb es la temperatura por debajo del cual la tasa de desarrollo es nula (i.e., temperatura base, $tb=8^{\circ}\text{C}$) y d es la duración de la etapa en días. Para valores $t \text{ max}>35^{\circ}\text{C}$ se consideró $t \text{ max} = 35^{\circ}\text{C}$ y para valores $t \text{ min}<tb$ se consideró $t \text{ min}=tb$ (Gilmore and Rogers, 1958; McMaster and Wilhelm, 1997; Tsimba *et al.*, 2013).

2.2.1.2 Crecimiento potencial

El crecimiento potencial del cultivo en base diaria se calculó según la ecuación 3.

$$\text{Crecimiento Potencial (g m}^{-2}\text{)} = \text{PARinc} \times \text{FRint} \times \text{EUR} \quad (\text{eq. 3})$$

Donde, para cada día, PARinc es la radiación fotosintéticamente activa incidente (Mj m⁻²), FRint es la fracción de PARinc interceptada por el cultivo y EUR es la eficiencia de uso de la radiación (g MJ⁻¹). La EUR se estimó en función de la temperatura media diaria según:

$$\begin{aligned} \text{EUR (g m}^{-2}\text{)} &= 0,27 \times \text{tmed} - 1,8 && \text{Para tmed} < 22,2 \text{ }^\circ\text{C} \\ \text{EUR (g m}^{-2}\text{)} &= 4,2 && \text{Para } 35,0 \text{ }^\circ\text{C} \leq \text{tmed} \leq 22,2 \text{ }^\circ\text{C} \\ \text{EUR (g m}^{-2}\text{)} &= -0,42 \times \text{tmed} + 18,9 && \text{Para tmed} > 35,0 \text{ }^\circ\text{C} \end{aligned}$$

Donde *tmed* es la temperatura media diaria ((*tmax*+*tmin*)/2). El intervalo de aplicación de esta función fue [0 g MJ⁻¹; 4,2 g MJ⁻¹] como valores máximos y mínimos de EUR (Figura 5). La función para temperaturas menores a 22,2 °C corresponde a la relación propuesta por Andrade, Uhart y Cirilo (1993). Para temperaturas superiores a 22,2 °C y hasta 35,0 °C la EUR se mantuvo máxima y constante. Desde 35,0 °C en adelante la EUR se redujo hasta alcanzar 0 (cero) con 45,0 °C. Estas últimas dos funciones son similares a las que se utilizan en las versiones originales de CERES-Maize 3.5 y 4.0 (Lopez-Cedrón, 2005).

El valor que tomó la fracción de radiación interceptada fue 1,0. Dicho valor surge de considerar que al comienzo del período crítico (200 °Cd antes de floración) un cultivo de maíz de ciclo intermedio sembrado en una densidad de 7,5 pl m⁻² en surcos espaciados a 0,7 m y sin restricciones hídricas ni nutricionales alcanzaría a interceptar más del 95% de la radiación solar incidente (Andrade, 1995; Uhart y Andrade, 1995). En concordancia, en los experimentos realizados en Pergamino y Balcarce, siempre se midieron niveles de fracción de radiación interceptada próximos a 0,95 al inicio del período.

El crecimiento potencial acumulado durante una determinada etapa surgió de la integración del crecimiento diario durante la misma.

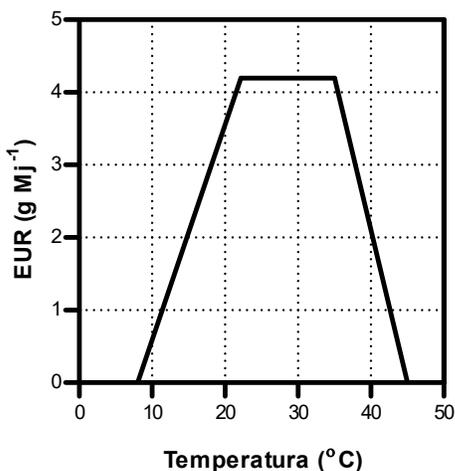


Figura 5: Respuesta de la eficiencia en el uso de la radiación (EUR) a la temperatura.

2.2.2 Dureza de grano

Tal como se describió en el Capítulo 1, la relación de molienda se utilizó como un indicador de la dureza del grano de maíz. Solo se utilizaron datos de tratamientos que recibieron fertilización suplementaria con N y S por provenir de cultivos que crecen en condiciones de crecimiento más cercanas a las potenciales (i.e., crecimiento sólo limitado por radiación y temperatura).

2.2.3 Variables climáticas

La temperatura máxima y mínima del aire en base diaria se registró en estaciones meteorológicas instaladas a no más de 500 m de cada sitio experimental. La radiación fotosintéticamente activa incidente en base diaria se obtuvo de la base de datos NASA-POWER (<http://power.larc.nasa.gov/>). Evaluaciones recientes de los datos de radiación solar de NASA-POWER indican un ajuste muy bueno con la radiación medida con radiómetro (Wart *et al.*, 2013) e incluso mejor que las estimaciones basadas en la heliofanía (Aramburu Merlos *et al.*, 2015).

2.2.4 Análisis de datos

Los datos se analizaron mediante regresiones lineales y los parámetros de los modelos de regresión fueron comparados utilizando el programa Prism 5 para Windows (2009). Se ajustaron modelos lineales para analizar asociaciones entre la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos y la dureza alcanzada en cada ambiente.

Los modelos ajustados entre la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos y la relación de molienda se utilizaron para analizar el efecto del atraso de la fecha de siembra sobre la dureza en distintas localidades. Para esto se utilizaron los datos de radiación fotosintéticamente activa incidente diaria de la base de datos NASA-

POWER (<http://power.larc.nasa.gov/>), y de temperatura mínima y máxima medidas en casilla meteorológica de la serie 1987-2017 correspondientes a Corrientes, Paraná, Pergamino y Balcarce. En base a los datos de desarrollo relevados en los experimentos se estimó la ocurrencia de la floración como el día en que los cultivos acumularon 900°Cd desde de siembra. En tanto que la ocurrencia de la madurez fisiológica se determinó como el día en que el cultivo acumuló 840 °Cd desde la floración o el día en que la temperatura mínima fue menor a 3°C (helada agro-meteorológica). Para cada localidad, en todo el rango de fechas de siembra explorado se determinó la probabilidad de alcanzar un valor de relación de molienda acorde a un grano de calidad superior para la industria de molienda seca (Cirilo *et al.*, 2011). Dicha probabilidad se computó como el cociente entre la cantidad de años en los que se logró una relación de molienda mayor o igual a 4,0 g g⁻¹ y la serie histórica analizada (30 años).

2.3 Resultados

2.3.1 Caracterización climática de los ambientes.

La red experimental permitió explorar un amplio rango de condiciones climáticas. La Figura 6 describe variables relacionadas con la temperatura y la radiación incidente para el período crítico de floración (-200 °Cd a 250 °Cd desde floración) y para el período de llenado de granos (250 °Cd post-floración hasta madurez fisiológica). La temperatura durante la floración y el llenado de granos tendió a descender con el aumento en latitud de la localidad. Además, el atraso en la fecha de siembra expuso al llenado de granos a menores temperaturas en todas las localidades (Figura 6a y b). La radiación incidente diaria varió relativamente menos que la temperatura ante cambios en la latitud. No obstante, la radiación incidente en las fechas de siembra tempranas se incrementó con el aumento en la latitud durante el período crítico de floración pero se redujo en el período de llenado efectivo de los granos. El atraso en la fecha de siembra, por otra parte, llevó a reducciones en la radiación incidente diaria en ambos períodos considerados en todas las localidades (Figura 6c y d).

La radiación acumulada en una etapa integra la radiación incidente diaria y la duración de dicha etapa que es controlada por la temperatura. Los valores de radiación acumulada máximos se observaron en las localidades ubicadas a mayor latitud y en fechas de siembra temprana. Estas situaciones combinaron alta radiación incidente diaria con una larga duración de etapas como consecuencia de la menor temperatura imperante. En general, el retraso en la fecha de siembra redujo la radiación acumulada, lo que se explicó por una reducción más que proporcional en la radiación incidente diaria respecto al incremento en la duración de la etapa como consecuencia del descenso de la temperatura. En Balcarce y Viedma en particular, la radiación acumulada durante la etapa de llenado de granos se redujo marcadamente por retrasos en la fecha de siembra debido a que además de la caída en la radiación incidente diaria, se redujo la duración del período por efecto de heladas tempranas (Figura 6e y f).

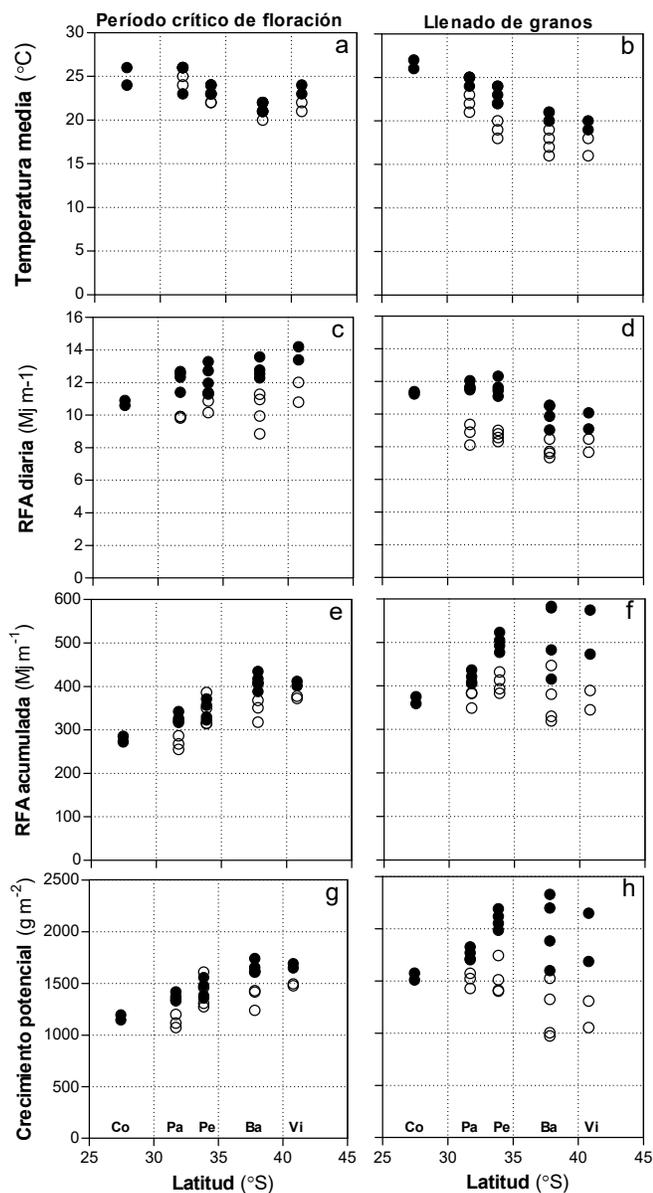


Figura 6: Caracterización climática de los diferentes ambientes (localidades y años) que conformaron la red experimental durante el período crítico de floración (200 °Cd previos a la floración y 250 °Cd posteriores a la misma, a, c, e, g) y el período de llenado efectivo de granos (entre 250 °Cd y la madurez fisiológica, b, d, f, h). Las variables climáticas se presentan en función de la latitud de la localidad. a y b: temperatura media diaria promedio; c y d: radiación fotosintéticamente activa incidente diaria promedio; e y f: radiación fotosintéticamente activa acumulada; g y h: crecimiento potencial acumulado. Fecha de siembra temprana (símbolos llenos) y tardía (símbolos vacíos). Co: Corrientes, Pa: Paraná, Pe: Pergamino, Ba: Balcarce y Vi: Viedma. Años: 2008 a 2011.

2.3.2 Relación fuente-destino durante el período de llenado de granos

El crecimiento potencial contempla, además de la radiación acumulada, el efecto de temperatura sobre la eficiencia en el uso de la radiación (Figura 6g y h). El crecimiento potencial en cada etapa se asoció estrechamente ($R^2=0,86$; $P<0,01$) con la radiación incidente acumulada en la misma (Figura 7). Por lo tanto, para el rango de ambientes explorado, el impacto de la temperatura sobre el crecimiento potencial acumulado se debió más al efecto sobre la duración de las etapas que al efecto sobre la eficiencia en el uso de la radiación interceptada. Los puntos que se alejan de la línea que indica máxima eficiencia en el uso de la radiación (i.e., $4,2 \text{ g Mj}^{-1}$) corresponden en su mayoría a la etapa de llenado de granos en siembras tardías en las localidades ubicadas a mayor latitud (Balcarce y Viedma), en los que la EUR no alcanza el máximo como consecuencia de las bajas temperaturas.

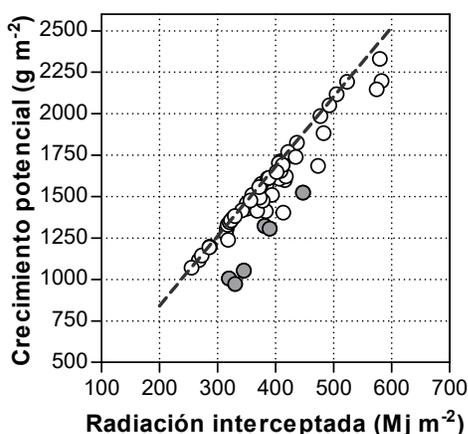


Figura 7: Crecimiento potencial acumulado en función de la radiación fotosintéticamente activa interceptada en diferentes ambientes que conformaron la red experimental durante el período crítico de floración comprendido entre 200 °Cd previos a la floración y 250 °Cd posteriores a la misma y el período de llenado efectivo de granos comprendido entre 250 °Cd post-floración y la madurez fisiológica. Los ambientes incluyen siembras tempranas y tardías en cinco localidades (Corrientes, Paraná, Pergamino, Balcarce y Viedma) y cuatro años (2008 a 2011). La línea discontinua une puntos con la máxima eficiencia en el uso de la radiación ($4,2 \text{ g Mj}^{-1}$). Los símbolos grises corresponden a períodos de llenado de grano en fecha de siembra tardía en Balcarce y Viedma.

El número de granos medidos por unidad de área se asoció directamente con el crecimiento potencial acumulado en el período crítico alrededor de floración ($P<0,01$; Figura 9

). El peso por grano, en tanto, se asoció con el crecimiento potencial acumulado durante el llenado de granos ($P<0,01$; Figura 8).

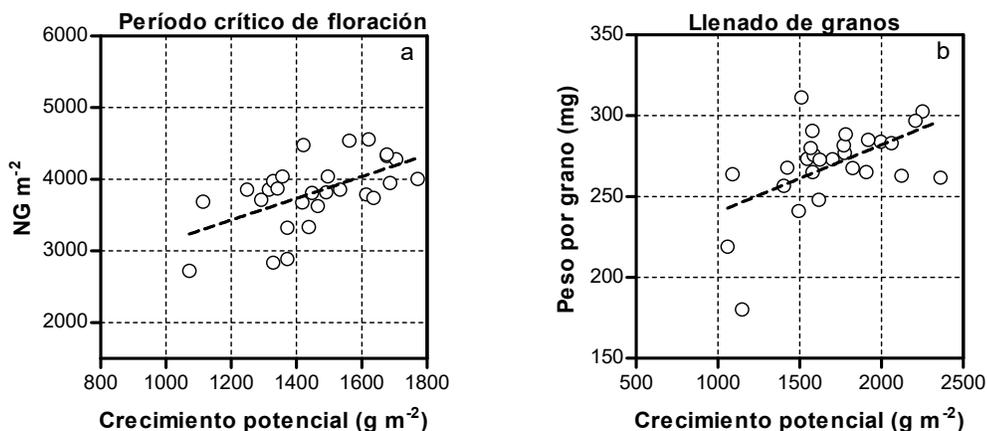


Figura 8: a) Número de granos (NG) en función del crecimiento potencial acumulado durante el período crítico de floración, desde 200 °Cd antes de floración hasta 250 °Cd después de la misma ($NG=1,52x+1611$, $P<0,01$, $R^2=0,33$). b) Peso por grano en función del crecimiento potencial acumulado durante el período de llenado de granos, desde 250 °Cd después de floración hasta madurez fisiológica ($\text{Peso por grano } y=0,041x+198,8$, $R^2=0,30$, $P<0,01$). Cada punto corresponde al promedio de tres híbridos y tres repeticiones. Se incluyen datos de fechas de sie

mbrá tempranas y tardías en cinco localidades (Corrientes, Paraná, Pergamino, Balcarce y Viedma) y cuatro años: (2008 a 2011).

La relación fuente-destino durante el período de llenado de granos estimada como la relación entre el crecimiento potencial acumulado durante dicho período y el crecimiento acumulado alrededor de la floración varió entre $0,65 \text{ g g}^{-1}$ y $1,57 \text{ g g}^{-1}$ (Figura 9). Los máximos valores para esta variable se registraron en latitudes medias a bajas. Por otro lado, el atraso en la fecha de siembra redujo marcadamente la relación fuente-destino en las localidades ubicadas a mayor latitud.

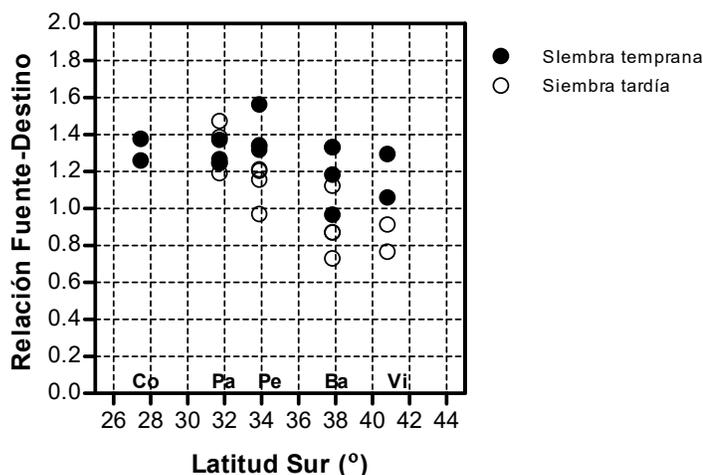


Figura 9. Relación fuente-destino durante el período de llenado de granos en función de la latitud de la localidad. La relación fuente-destino fue estimada como el cociente entre el crecimiento potencial durante el período de llenado efectivo de los granos y el crecimiento potencial acumulado durante el período crítico de floración. Los símbolos llenos y vacíos corresponden a fechas de siembra tempranas y tardías respectivamente. Co: Corrientes, Pa: Paraná, Pe: Pergamino, Ba: Balcarce y Vi: Viedma. Años: 2008 a 2011.

La dureza de grano indicada por la relación de molienda se asoció lineal y positivamente con la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para los tres híbridos evaluados (Figura 10). La respuesta de la relación de molienda a los cambios en la relación fuente-destino tendió a ser mayor para el híbrido colorado duro comparando con los otros dos genotipos ($P=0,062$). La inclusión de los tres híbridos en un modelo único también resultó en una relación directa entre estas variables (Figura 11) pero la bondad del ajuste fue sensiblemente menor a la lograda con los modelos ajustados por híbrido. De hecho, la sumatoria de residuales del modelo único fue un 40% superior que la misma para los tres modelos individuales.

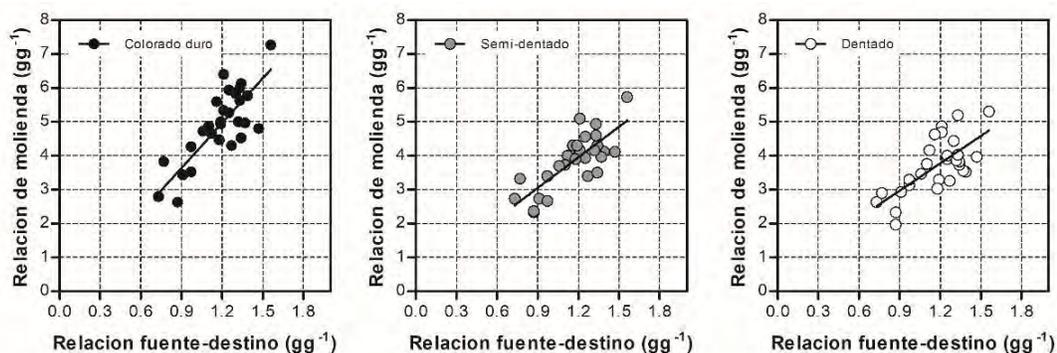


Figura 10: Relación de molienda en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para tres híbridos de maíz de distinto tipo de endosperma (colorado duro,

semi-dentado y dentado). La relación fuente-destino fue estimada como el cociente entre el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 250 °Cd pasada la floración y la madurez fisiológica y el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 200 °Cd previos a la floración y 250 °Cd posteriores a la misma. Los datos se generaron en una red de experimentos que incluyó cinco localidades, fechas de siembra temprana y tardía durante cuatro años. Modelos por híbrido (\pm intervalo de confianza de la pendiente): colorado duro $y=4,4\pm 0,9x-0,3$, $P<0,001$, $R^2=0,66$, $\sum(\text{residuos})^2=9,1$; semi-dentado $y=3,1\pm 0,8x+0,34$, $P<0,01$, $R^2=0,61$, $\sum(\text{residuos})^2 = 6,3$; dentado $y=2,7\pm 1,1x+0,54$, $P<0,01$, $R^2=0,49$, $\sum(\text{residuos})^2 = 5,3$.

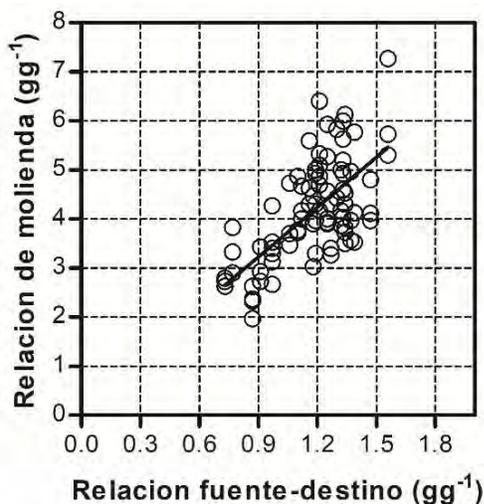


Figura 11: Relación de molienda en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para tres híbridos de maíz de distinto tipo de granos (colorado duro, semi-dentado y dentado). La relación fuente-destino fue estimada como el cociente entre el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 250 °Cd pasada la floración y la madurez fisiológica y el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 200 °Cd previos a la floración y 250 °Cd posteriores a la misma. Los datos se generaron en una red de experimentos que incluyó cinco localidades, fechas de siembra temprana y tardía durante cuatro años. Modelo único (\pm intervalo de confianza de la pendiente) $y=3,4\pm 0,8x+0,18$; $P<0,01$, $R^2=0,39$, $\sum(\text{residuos})^2 = 55,6$.

2.3.3 Análisis del efecto de la fecha de siembra sobre la relación de molienda en distintas localidades usando datos históricos de radiación y temperatura y el modelo de dureza

La relación fuente-destino durante el período de llenado de granos estimada con los datos históricos de radiación y temperatura presentó diferencias mínimas entre localidades en fechas de siembra tempranas. Sin embargo, las diferencias en dicha relación fuente-destino entre localidades se incrementaron a medida que se atrasó la fecha de siembra (Figura 12). La relación fuente-destino tendió a mantenerse ante el atraso en la fecha de siembra en las localidades ubicadas a bajas latitudes (Corrientes y Paraná), mientras que en las localidades ubicadas a mayor latitud (Pergamino y Balcarce) el atraso de la fecha de siembra fue acompañado de una progresiva reducción en dicha relación. Por otro lado, la variabilidad en la relación fuente-destino se incrementó con el atraso en la fecha de siembra en las localidades ubicadas a mayor latitud.

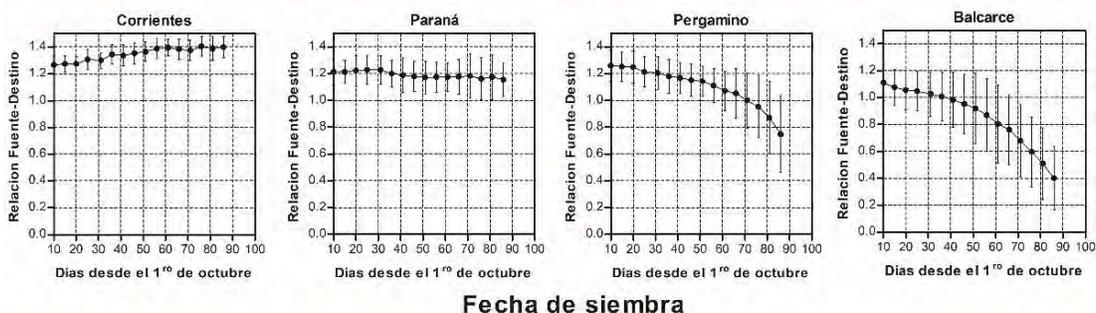


Figura 12: Relación fuente-destino durante el período de llenado de granos en función de la fecha de siembra para Corrientes, Paraná, Pergamino y Balcarce. Promedio para el período 1987-2017. La relación fuente-destino fue estimada como la relación entre el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 250 °Cd pasada la floración y la madurez fisiológica y el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 200 °Cd previos a la floración y 250 °Cd posteriores a la misma. Las barras verticales indican la desviación estándar.

A partir de la relación fuente-destino estimada con los datos históricos de radiación y temperatura para cada localidad se estimó la relación de molienda para cada híbrido (Figura 13) utilizando para esto los modelos antes descritos (Figura 9). La relación de molienda para el híbrido colorado duro en Corrientes y Paraná se ubicó por encima del umbral para ser considerado grano de calidad superior, con más de 90% de probabilidad en todo el rango de fechas de siembra explorado. Sin embargo, en dichas localidades los híbridos de grano más blando no siempre lograron el grado de calidad superior. En Pergamino, el comportamiento de los distintos tipos de híbridos fue similar al de las

localidades ubicadas más al norte hasta fechas de siembra de mitad de noviembre, momento a partir del cual la probabilidad de alcanzar grano de calidad superior comenzó a reducirse sensiblemente (Figura 13g). En Balcarce, en tanto, solo el híbrido colorado duro en siembras tempranas alcanzó el grado de calidad superior para la industria de molinenda seca, pero con una probabilidad que nunca llegó al 90% (Figura 13h).

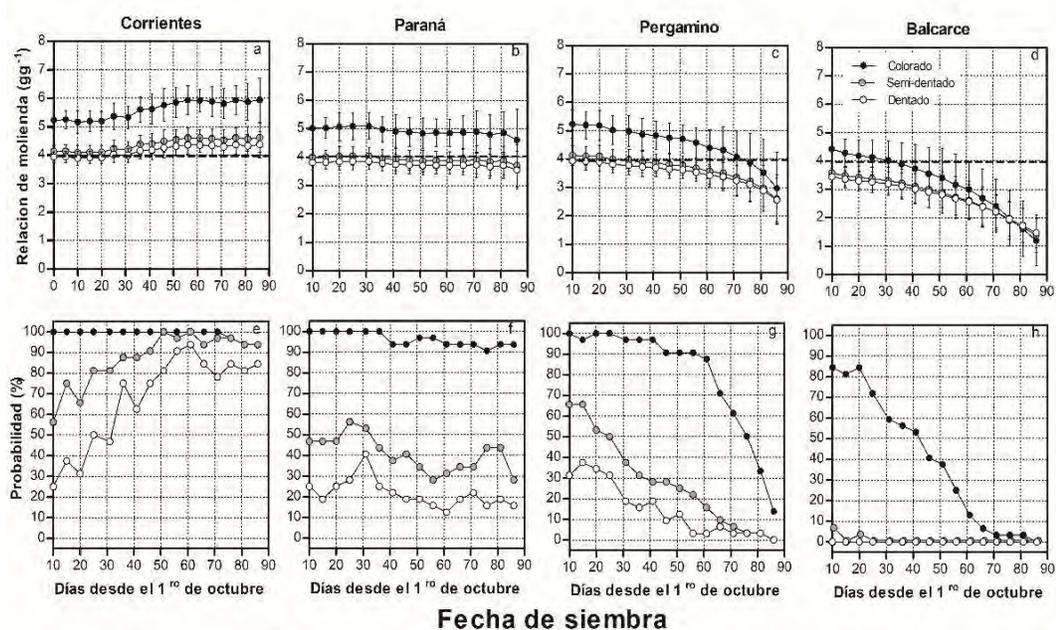


Figura 13: Relación de molinenda promedio para la serie 1987-2017 (a-d) y probabilidad de alcanzar el grado de calidad superior (e-h) en función de la fecha de siembra para cuatro localidades (Corrientes, Paraná, Pergamino y Balcarce) y 3 híbridos de distinto tipo de endosperma (colorado, semi-dentado y dentado). Las barras verticales indican la desviación estándar. La línea segmentada horizontal indica el valor de relación de molinenda por sobre el que se considera grano de calidad superior para la industria de molinenda seca según Cirilo *et al.* (2011).

2.4 Discusión

2.4.1 Crecimiento potencial como indicador de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos

El cociente entre el crecimiento potencial acumulado durante el período de llenado de granos y el crecimiento potencial acumulado alrededor de la floración se utilizó como indicador del balance entre la fuente fotosintética y la demanda de los destinos reproductivos durante el período de llenado de granos en maíz (Figura 10). Este indicador de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos no fue afectado por caracteres del híbrido excepto el ciclo y se obtuvo a partir de datos de radiación y temperatura que actualmente están disponibles para la mayor parte del área bajo cultivo (Aramburu Merlos *et al.*, 2015). Además, al basarse en el crecimiento potencial, que es función de la radiación y la temperatura, este método no presenta problemas de sub-estimación de la fuente por retrocontrol de la fotosíntesis ante falta de destinos reproductivos durante el llenado de granos.

Por otro lado, el modelo propuesto consideró que la eficiencia en el uso de la radiación fue afectada solo por la temperatura y que los cultivos interceptaron el 100% de la radiación incidente. Dichas consideraciones limitan su utilidad a ambientes en los que los cultivos crecen en condiciones cercanas a las potenciales. Sin embargo, la ocurrencia de sucesos de estrés hídrico, térmico u otros estreses de tipo biótico y deficiencias nutricionales limita frecuentemente al crecimiento de los cultivos en el área maicera argentina. De esta manera, la utilidad del modelo propuesto podría extenderse incorporando el efecto de estreses hídricos, térmicos o bióticos y deficiencias nutricionales sobre la capacidad del cultivo para interceptar radiación y sobre la eficiencia en el uso de la misma para producir biomasa.

2.4.2 Relación fuente-destino durante el período de llenado de granos como indicador del efecto del ambiente sobre la dureza de grano de maíz

El indicador propuesto para la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos explicó la mayor parte de la variación registrada en la relación de molienda de la red experimental ensayada a través del área maicera argentina. La dureza se asoció positivamente con la relación fuente-destino en los tres híbridos evaluados, siendo concordante con lo propuesto por trabajos previos (Governatori y Uhart, 1998, Cirilo *et al.*, 2011). Como era de esperarse, de acuerdo a los resultados presentados en el capítulo anterior, para un nivel de fuente-destino dado el híbrido colorado duro presentó siempre mayor relación de molienda. Además, la respuesta en dureza ante la variación en la relación fuente-destino tendió a ser mayor para el híbrido colorado

comparando con el semi-dentado y el dentado (Figura 10). De esta manera, además de conocer la relación fuente-destino, es necesario conocer la respuesta de la dureza de cada híbrido a la relación fuente-destino para poder estimar la dureza alcanzable. Es claro que las diferencias en dureza de grano entre híbridos radican en diferencias en la composición del mismo (Robutti *et al.*, 1997; Gerde *et al.*, 2016). No obstante, poco se conoce sobre las causas de dichas diferencias. Al respecto, cuando se calculó la relación fuente-destino ajustando el destino por el número de granos fijados para cada híbrido, dicha relación se asoció con la dureza de granos mediante un modelo de regresión único para los tres híbridos (Figura 14). La bondad del ajuste de este último modelo fue incluso superior a la lograda con los modelos ajustados por híbridos (Figura 10). Los mecanismos detrás de las diferencias en la determinación del número de grano entre tipos de híbridos fueron abordados por Tamagno *et al.* (2015). Por otro lado, los resultados aquí presentados indican que por lo menos una parte de la correlación negativa entre rendimiento y dureza que se presenta al comparar tipos de híbridos podría responder al balance entre la fuente de asimilados y la demanda de los mismos durante el período de llenado de granos. De esta manera, la mejora en el rendimiento por incrementos en la demanda reproductiva del cultivo (Echarte *et al.*, 2004; Luque *et al.*, 2006; Di Matteo *et al.*, 2016) conllevó a una reducción en la dureza del grano. Esto es novedoso ya que hasta ahora la reducción en la dureza observada en el maíz argentino se adjudicó principalmente a la inclusión de germoplasma dentado (Cirilo *et al.*, 2011; Tamagno *et al.*, 2015). Sin embargo, según los resultados de esta tesis, el mejoramiento genético por mayor rendimiento del germoplasma colorado duro podría resultar en reducciones en dureza de grano incluso sin la introgresión de germoplasma dentado.

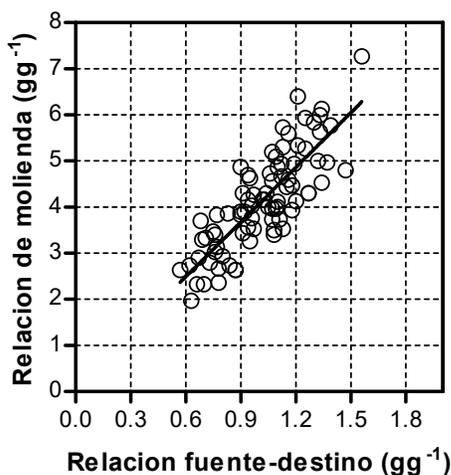


Figura 14: Relación de molienda en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos relativizada al número de granos para tres híbridos de maíz. La relación fuente-destino fue estimada como la relación entre el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 250 °Cd pasada la floración y madurez fisiológica y el crecimiento potencial acumulado durante el período comprendido entre 200 °Cd previos a la floración y 250 °Cd posteriores a la misma ajustado por el número de granos fijados por cada híbrido. Los datos se generaron en una red de experimentos que incluyó cinco localidades, fechas de siembra temprana y tardía durante cuatro años. $y = 3,9x \pm 0,62 + 0,12$; $P < 0,01$; $R^2 = 0,68$; $\sum(\text{Residuos})^2 = 30,3$.

Alrededor de un tercio de la variación registrada en la relación de molienda no pudo ser explicada por la relación fuente-destino durante el llenado de granos (Figura 14). Parte de este error se puede deber al efecto de otros factores ambientales determinantes de la dureza aparte de la fuente-destino. Al respecto, recientemente Mayer *et al.* (2016) han demostrado que la dureza del grano de maíz es afectada por eventos de estrés térmico durante el llenado de los granos lo que puede ser relevante sobre todo en siembras tempranas en localidades ubicadas en bajas latitudes. Asimismo, Martínez *et al.* (2017) reportaron efecto de la temperatura nocturna sobre el contenido relativo de amilopectina y amilosa del almidón. La relación entre dichos componentes es determinante de la compresibilidad de los gránulos de almidón y consecuentemente de la dureza del grano de maíz (Dombrink-Kurtzman y Knutson, 1997). La incorporación de relaciones funcionales que contemplen la respuesta de la dureza a éstas y otras variables seguramente mejorará la capacidad predictiva del efecto del ambiente sobre la dureza de grano de maíz.

2.4.3 Análisis del efecto de la interacción entre la fecha de siembra y el sitio sobre la dureza de granos

El modelo antes descrito resultó útil para analizar el efecto de la fecha de siembra, el sitio y el tipo de híbrido sobre la dureza del grano de maíz a partir de series históricas de datos de radiación y temperatura registrados en las localidades de la transecta

evaluada. Así, el análisis de la interacción entre la fecha de siembra, la localidad y el híbrido sobre la dureza presentado en el Capítulo 1 pudo extenderse para un período de 30 años.

En fechas de siembra tempranas, la relación fuente-destino durante el llenado de granos fue relativamente alta y similar entre localidades (Figura 12) pudiéndose lograr grano de calidad superior para la industria a lo largo de la transecta explorada (Figura 13). No obstante, a medida que la latitud de la localidad se incrementó el retraso en la fecha de siembra produjo una caída anticipada de la relación fuente-destino durante el llenado de granos (Figura 12). La ventana de siembra para producir grano de calidad superior se redujo abruptamente con el incremento en la latitud. Así, la probabilidad de alcanzar dicho estándar de calidad decrece marcadamente a partir de siembras de mediados de noviembre en Pergamino y ante el mínimo retraso en la fecha de siembra en Balcarce (Figura 13g y h). La siembra tardía como estrategia orientada a la estabilización e incremento del rendimiento en ambientes propensos a estrés hídrico podría atentar contra el logro de alta calidad para la molienda seca en localidades ubicadas a altas latitudes.

En lo que respecta a la elección del híbrido, la probabilidad de lograr una producción de granos de dureza superior se reduce cuando se compara al híbrido semi-dentado o dentado contra el colorado duro (Figura 13). No obstante, la magnitud de dicha reducción depende de la localidad y la fecha de siembra. Así, mientras que en Corrientes el requerimiento de dureza impuesto por la industria se podría alcanzar en la mayor parte de los años con el híbrido dentado de mayor potencial de rendimiento, en Balcarce este nivel de dureza sólo se alcanza con el híbrido colorado duro que presenta menor potencial de rendimiento (Tamagno *et al.*, 2015).

La información presentada en este capítulo demostró que la dureza de grano indicada por la relación de molienda se asoció directamente con el cociente entre el crecimiento potencial acumulado durante el período de llenado de granos y el crecimiento potencial acumulado durante el período crítico de floración. De esta manera no se pudo rechazar la hipótesis que se ponía a prueba que indicaba que **la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos estimada como el cociente entre el crecimiento potencial acumulado durante el período de llenado de granos y el crecimiento potencial acumulado durante el período crítico de floración se asocia positivamente con la relación de molienda de maíz.**

Hasta aquí se demostró que el ambiente es determinante de la dureza del grano de maíz y que el efecto del ambiente sobre la dureza es mediado por la relación entre la fuente de asimilados y la demanda de los granos durante el período de llenado de granos. Dicho ambiente hace referencia a las condiciones en las que se desarrolla y crece el cultivo que en esta tesis surgieron de la combinación de distintas localidades, años y fechas de siembra. En el Capítulo 3 se propone estudiar la base de los mecanismos que subyacen a la asociación entre la relación fuente-destino y la dureza del grano de maíz.

**CAPÍTULO 3: ZEÍNAS Y SU ASOCIACION CON LA RELACIÓN FUENTE-DESTINO
Y LA DUREZA DEL GRANO**

3.1 Introducción

La dureza del grano de maíz se relaciona con su composición química. La dureza de grano ha sido tradicionalmente asociada con las proteínas endospermáticas de reserva, las zeínas (Lopes and Larkins, 1991; Yuan and Flores, 1996; Robutti, Borrás, Ferreres y Biets, 2000; Fox and Manley, 2009; Gerde *et al.*, 2016, 2017). Las zeínas se clasifican en α -, β -, γ - y δ -zeínas (Esen, 1987; Wallace *et al.*, 1990), siendo las α - y γ -zeínas las fracciones mayoritarias en el grano (Lending y Larkins, 1989). En el endosperma, las zeínas se ensamblan en cuerpos proteicos que a su vez se aglomeran conformando una malla rígida que contiene a los amiloplastos (Figura 15; Chandrashekar y Mazhar, 1999; Sabelli y Larkins, 2009). Las distintas fracciones de zeínas no se distribuyen de manera homogénea en cada cuerpo proteico. Las fracciones γ - y β -zeína, que presentan una alta proporción de aminoácidos azufrados, se localizan en la periferia del cuerpo proteico (Geetha *et al.*, 1991; Holding y Larkins, 2006) favoreciendo la formación de puentes di-sulfuro que otorgan firmeza a la malla proteica. Las fracciones de α - y δ -zeínas, en tanto, rellenan los espacios libres en el interior de los cuerpos proteicos contribuyendo a la estabilidad mecánica de la malla proteica (Robutti *et al.*, 1997; Chandrashekar and Mazhar, 1999). Las α - y δ -zeínas son solubles en alcohol y en conjunto se las denomina zeínas-1. Las γ - y β -zeínas, en tanto, requieren de alcohol más un agente reductor para ser solubilizadas y extraídas del endosperma y se las ha denominado zeínas-2 (Larkins *et al.*, 1984).

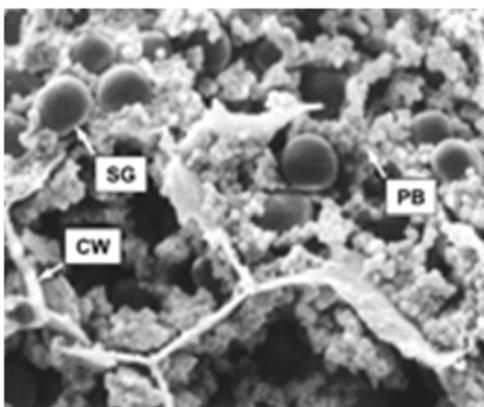


Figura 15: Imagen obtenida mediante microscopio electrónico de un endosperma de maíz en desarrollo que ilustra paredes celulares (CW), gránulos de almidón (SG) y cuerpos proteicos (PB). Reproducido de Sabelli y Larkins (2009).

Al inicio los cuerpo proteicos están conformados casi exclusivamente por zeínas-2 (γ - y β -zeínas) y en una etapa posterior se rellenan con las fracciones correspondientes a la zeína-1 (α - y δ -zeínas; Figura 16). De hecho, la síntesis de las distintas fracciones

de zeínas no es simultánea (Woo *et al.*, 2001). Inmediatamente después de la floración sólo se expresan genes correspondientes a la síntesis de zeínas-2. La expresión de genes para la síntesis de zeínas-1 comienza en estadios de desarrollo más avanzados del llenado de granos.

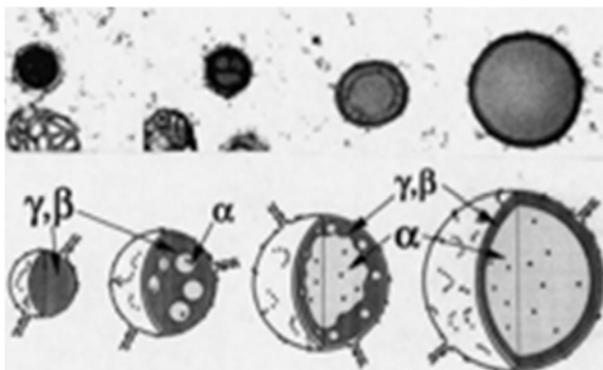


Figura 16: Modelo de desarrollo de cuerpos proteicos en el endosperma de maíz. El cuerpo proteico más inmaduro es el de la izquierda y el desarrollo es de izquierda a derecha. Con letras griegas se indican la localización de las distintas fracciones de zeínas determinadas por inmunolocalización (reproducido de Shewry and Halford, 2002).

Basándonos en el conocimiento previo, inferimos que el efecto de la relación entre la fuente y la demanda de asimilados en el período de llenado de granos sobre la dureza del grano está mediado por la concentración de las fracciones de zeínas. La concentración de proteína del grano de maíz surge principalmente de la relación entre la acumulación de proteína y la acumulación de almidón que es el componente mayoritario del grano. La tasa a la que se acumula el almidón y la duración de este proceso son relativamente estables en maíz y dependientes principalmente de la temperatura (Jones y Simmons, 1983). Ante condiciones de crecimiento en las que la producción de asimilados es insuficiente para abastecer a la demanda de los granos, la tasa de acumulación de almidón se mantiene a expensas de la movilización de reservas desde el tallo (Uhart y Andrade, 1991). Solo en casos de desbalances severos en los que las reservas resulten insuficientes (ej. períodos de estrés prolongados), se reduce la duración del período de acumulación de almidón (Jones y Simmons, 1983). La mencionada estabilidad en la tasa y duración de la acumulación de almidón indica que la variación en la concentración de proteína en grano ante cambios en la relación fuente-destino durante el período de llenado se origina por cambios en la acumulación de proteínas (Borrás *et al.*, 2002). El ambiente, además de afectar la concentración de zeína total podría afectar de manera diferencial a las distintas fracciones de zeínas, ya que como se mencionó antes, no se sintetizan de forma simultánea.

Por antes mencionado, el efecto de ambiente sobre la dureza del grano de maíz puede ser mediado por su efecto sobre la concentración de zeína total y sobre la relación entre sus fracciones componentes (zeínas-1 / zeínas-2). El estudio del efecto de la relación fuente-destino sobre el contenido de zeínas y sus fracciones en el grano de maíz permitirá avanzar en el entendimiento del efecto del ambiente sobre la dureza de grano.

El objetivo de este capítulo es establecer asociaciones entre i) la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos y la concentración de las fracciones de zeínas en grano, y ii) entre la concentración de las fracciones de zeína y la dureza de grano. Se pondrán a prueba las hipótesis que establecen que las alteraciones en la relación fuente-destino durante el período de llenado de los granos de maíz afectan la concentración de zeína total y la relación entre sus fracciones componentes, y que el efecto de la relación fuente-destino durante el período de llenado de los granos sobre la dureza de grano está asociado con su efecto sobre la concentración de zeína total y la relación entre sus fracciones componentes.

3.2 Materiales y Métodos

Para responder a estos objetivos se utilizaron muestras de grano de la red de experimentos presentada en el Capítulo 1 de esta tesis. Para estas muestras se disponía de una estimación de la dureza de grano indicada por la relación de molienda. Por otro lado, los ambientes que conformaron la red experimental (combinación de localidades, años y fechas de siembra) estaban caracterizados por la relación fuente-destino durante el llenado de granos (Capítulo 2).

3.2.1 Contenido y concentración de proteína en grano

Para la determinación de la concentración y el contenido de proteína en grano se molieron 20 g de grano a un tamaño de partícula menor a 1-mm. Luego se determinó el contenido de nitrógeno total de la muestra por el método Kjeldahl. El contenido de proteína de la muestra se estimó multiplicando el contenido de nitrógeno por 6,25. Los valores se expresan en base seca. La concentración de proteína se estimó como el cociente entre el contenido de nitrógeno y el peso de la muestra analizada. El contenido de proteína por grano se estimó como el producto de la concentración de proteína y el peso por grano.

3.2.2 Contenido y concentración de zeínas

Para determinar el contenido y la concentración de la zeína total y sus fracciones se molieron 15 granos a 1400 rpm por 30 s en un molino Laboratory Mill 3600 (Falling Number, Huddinge, Suiza). Posteriormente las muestras se molieron a alta velocidad durante 30 s en un molino de impacto refrigerado por agua Analyzer MC-II (Control Química, Bs. As., Argentina). La zeína total ($\text{Zeína-T} = \text{Zeína-1} + \text{Zeína-2}$) se extrajo con una solución alcohólica etanol/agua (70:30 v/v), 0,5 % p/v de acetato de sodio y 0,2 % v/v de ditiotreitol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), a temperatura ambiente. Para esto se pesaron 200 mg de la muestra previamente molida en balanza analítica electrónica, se colocaron en tubos de polipropileno con 3 ml de solución extractora que se agitaron 20 s a intervalos de 5 min con agitador tipo vórtex durante 2 h. La suspensión extraída se centrifugó a 3000 g durante 30 min en una centrifuga Sorvall GLC-2B (Du Pont Instruments, Wilmington, DE, USA). Luego se filtró el sobrenadante con filtro de celulosa de 0,22 μm de tamaño de poro a viales de HPLC. Las zeínas fueron analizadas después de 48 h para asegurar la reducción completa de los enlaces di-sulfuro (Paulis y Bietz, 1986).

La cuantificación de zeínas fue realizada mediante análisis por RP-HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión - Fase Reversa). Se estimó el área de los picos

del cromatograma correspondientes a las zeínas-2 conformado por los picos de β - y γ -zeínas y a las zeínas-1 conformado por los picos correspondientes a las α - y δ -zeínas (Robutti *et al.*, 1997). La suma del área de zeína-1 y zeína-2 conformó el área de zeína total.

La cromatografía líquida de alta presión fase reversa (RP-HPLC) se realizó por medio de un cromatógrafo Hewlett-Packard 1050 con una columna Vydac C18 a 60°C (4,6 x 250 mm, partículas de 5 μ m, poros de 300 Å). La composición de los solventes de corrida fue: solvente A: agua + ácido trifluoroacético al 0,1% v/v; solvente B: acetonitrilo + ácido trifluoroacético al 0,1% v/v. La separación de las proteínas se llevó a cabo mediante un gradiente lineal modificado durante 50 min. comenzando con 28% y terminando con 60,5% del solvente B, seguido por una elución isocrática de 10 min. a 60,5% del mismo solvente. Durante la corrida cromatográfica el flujo fue de 1 ml min⁻¹ y la temperatura se mantuvo constante a 60°C. El volumen de inyección fue de 10 μ l. La detección se realizó por absorbancia a 210 nm (Paulis y Bietz, 1986; Robutti *et al.*, 1997). Los cromatogramas fueron integrados manualmente utilizando el programa Chem Station 3.0 (Hewlett-Packard) para obtener el área correspondiente a las fracciones zeína-2 y zeína-1 (Figura 17). La humedad del grano fue determinada por diferencia de pesada de una alícuota de 50 granos secados por 24 h a 105 °C.

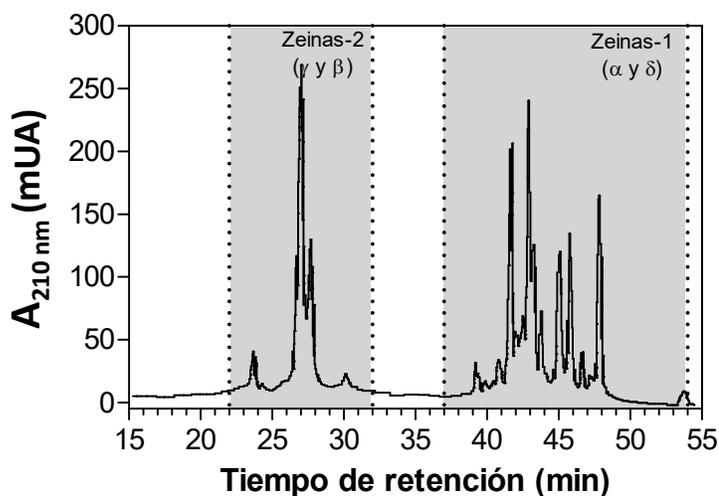


Figura 17: Cromatograma correspondiente a un perfil de zeínas de grano de maíz. El eje y-corresponde a la absorbancia a 210 nm expresado en unidades de absorbancia. El eje x-representa el tiempo de retención expresado en minutos. La fracción zeína-2 que incluye a las γ - y β -zeínas y la fracción zeína-1 que incluye a las α - y δ -zeínas de acuerdo a Wilson (1991), se indican con áreas grises entre líneas punteadas.

Complementariamente, mediante el método antes descrito se extrajeron zeínas sobre muestras de grano con concentración de proteína variable. Para cada extracto, se estimó el área de zeínas utilizando la técnica de cromatografía antes descrita y se estimó, también, el contenido de zeína-total (proteína) a través de la cuantificación del N reducido por el método de Kjendhal. Luego se ajustó la función entre el área bajo la curva del cromatograma y la cantidad de zeína total (e.g., proteína, Figura 18). Esta función se utilizó para estimar el peso de las fracciones de zeínas a partir del área bajo los picos de zeínas del cromatograma. De esta manera se pudo estimar el contenido y la concentración de zeínas de las muestras.

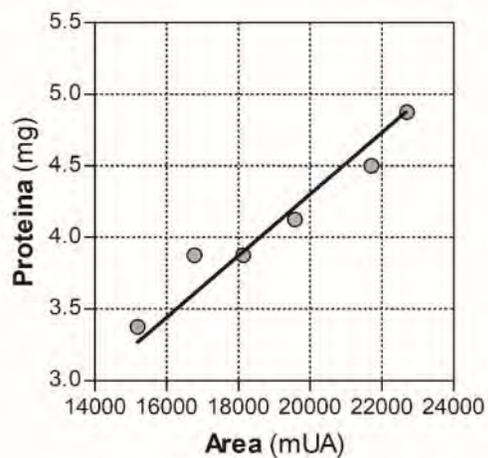


Figura 18: Relación entre la biomasa de zeína estimada por el método Kjendhal y el área del cromatograma (mUA) para extractos de zeínas provenientes de grano de maíz de distinta concentración de proteína. $y=2,1 \cdot 10^{-4}x$, $R^2=0,95$, $P<0,0001$.

3.2.3 *Análisis de datos*

Los datos de contenido y concentración de zeínas fueron sometidos al análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa R (De Mendiburu, 2009) y se llevaron adelante análisis de regresión entre variables por medio del programa Prism 5.0 (GraphPad, 2007).

3.3 Resultados

3.3.1 Efecto del tipo de híbrido y el ambiente sobre la composición del grano.

La combinación de híbridos, sitios (localidad/año) y fechas de siembra generó un rango de concentraciones de proteína en grano desde alrededor de 8% hasta más de 12% (Tabla 5; Figura 19). La concentración de proteína en grano presentó interacciones entre el híbrido, el sitio y la fecha de siembra (Tabla 5). A pesar del efecto de la interacción, el híbrido colorado duro presentó siempre mayor o igual concentración de proteína respecto al híbrido semi-dentado y ambos presentaron siempre mayor o igual concentración de proteína que el híbrido dentado (Tabla 5). En promedio, la concentración de proteína fue 10,0% para el híbrido colorado duro, 9,7% para el semi-dentado y 9,2% para el dentado.

El atraso en la fecha de siembra redujo la concentración de proteína en grano en el híbrido colorado duro, excepto en Balcarce 2010 y Paraná 2010. En cambio, esta práctica de manejo en general incrementó o mantuvo la concentración de proteína en grano en el híbrido dentado, excepto en Balcarce 2010.

Tabla 5: Concentración de proteína en grano (%) para híbridos de maíz de distinto tipo de grano (dentado, semi-dentado y colorado duro) sembrados en 10 sitios (combinación de localidad y año) en fecha de siembra temprana y tardía. Promedio de 3 repeticiones.

Sitio	Fecha Siembra	Proteína en grano (%)		
		Dentado	Semi-dentado	Colorado duro
Balcarce2010	Temprana	8,2	8,9	9,8
Balcarce2010	Tardía	9,5	9,4	9,7
Balcarce2011	Temprana	9,8	10,8	10,9
Balcarce2011	Tardía	9,3	9,7	9,7
Corrientes2010	Temprana	9,5	11,9	10,9
Corrientes2011	Temprana	10,5	10,8	12,0
Paraná2010	Temprana	8,4	9,1	9,8
Paraná2010	Tardía	9,6	10,0	10,0
Paraná2011	Temprana	11,1	11,5	11,8
Pergamino2010	Temprana	8,8	9,8	10,7
Pergamino2010	Tardía	9,3	9,6	9,6
Pergamino2011	Temprana	9,8	12,0	11,1
Pergamino2011	Tardía	10,4	10,4	10,5
Viedma2010	Temprana	9,0	9,7	9,8
Viedma2010	Tardía	9,2	9,0	9,5
Viedma2011	Temprana	9,2	9,3	9,3
Viedma2011	Tardía	9,1	8,9	8,9
Sitio	<0,0001			
Fecha de siembra (FS)	0,0785			
Hib	<0,0001			
Sitio:FS	0,016			
Sitio:Hib	<0,0001			
Sitio:Hib:FS	0,03 (0,30)			

El valor entre paréntesis representa la diferencia significativa mínima ($p=0.01$)

En concordancia con lo presentado para la concentración de proteína, la combinación entre híbridos, sitios y fechas de siembra generó un amplio rango de concentraciones de zeína (Figura 19). La concentración de zeína-1 se asoció directamente con la

concentración de proteína en grano ($P < 0,01$), en tanto que concentración de zeína-2 resultó independiente de esta última ($P = 0,46$).

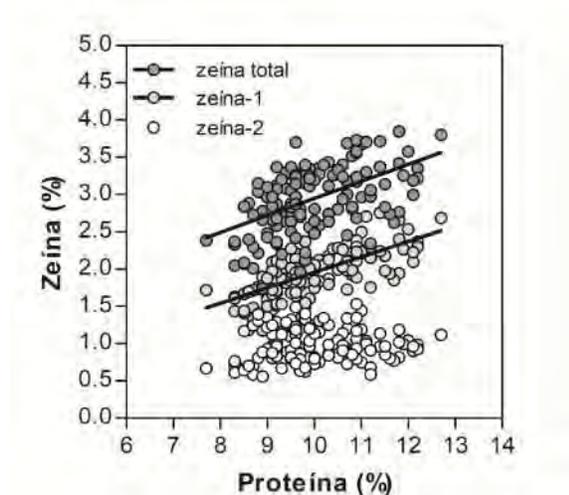


Figura 19: Concentración de zeína-total, zeína-1 y zeína-2 en función de la concentración de proteína en grano. Los datos corresponden a 3 híbridos sembrados en distintos sitios (localidad-año) en fecha de siembra temprana y tardía, y tres repeticiones. zeína total: $y = 0,23 \pm 0,03 + 0,66x$, $P < 0,0001$, $R^2 = 0,29$; zeína-1: $y = 0,21 \pm 0,02 - 0,11x$, $P < 0,0001$, $R^2 = 0,48$; zeína-2: $P = 0,46$.

La concentración de las distintas fracciones de zeínas presentó interacción entre el híbrido, el sitio y la fecha de siembra ($P = 0,035$, $P < 0,0001$ y $P = 0,0002$ para zeína-2, zeína-1 y zeína total, respectivamente). En general, el híbrido colorado duro mostró mayor concentración de zeína-2 respecto al híbrido semi-dentado. El híbrido semi-dentado, en tanto, mostró generalmente mayor concentración de zeína-2 comparando con el híbrido dentado, excepto por la fecha de siembra temprana de Balcarce (Tabla 5). Las diferencias en concentración de zeína-2 entre híbridos fueron concordantes con las diferencias en el contenido de dicha fracción en el grano (

Tabla 6). Así, el híbrido colorado duro presentó siempre mayor contenido de zeína-2 por grano comparando con los otros dos híbridos de textura más blanda (excepto en la fecha de siembra tardía de Balcarce 2010) y el híbrido semi-dentado presentó siempre mayor o igual contenido de zeína-2 por grano comparando con el híbrido dentado. El retraso en la fecha de siembra generalmente incrementó la concentración de zeína-2 en grano, pero afectó escasamente su contenido por grano (

Tabla 6; Figura 20). El efecto del sitio sobre la concentración de zeína-2 fue menos consistente comparando con el efecto del híbrido y de la fecha de siembra (

Tabla 6).

Tabla 6: Concentración en grano de zeína-2, zeína-1 y zeína-total para tres híbridos de maíz de tipo de grano contrastante (dentado, semi-dentado y colorado duro) sembrados en 10 sitios (combinación localidad y año) en fecha de siembra temprana y tardía. Promedio de tres repeticiones.

Sitio	Fecha Siembra	Zeína-2 (%)			Zeína-1 (%)			Zeína total (%)		
		Dentado	Semi-dentado	Colorado duro	Dentado	Semi-dentado	Colorado duro	Dentado	Semi-dentado	Colorado duro
Corrientes2010	Temprana	0,7	1,0	1,0	1,6	2,3	2,2	2,3	3,3	3,2
Corrientes2011	Temprana	1,0	1,2	1,3	2,1	2,7	3,2	3,1	3,8	4,4
Paraná2010	Tardía	1,0	1,0	1,2	2,2	2,4	2,3	3,1	3,4	3,5
Paraná2010	Temprana	0,8	1,0	1,0	1,7	1,7	2,2	2,5	2,7	3,2
Paraná2011	Temprana	0,9	0,9	1,2	2,2	2,7	2,7	3,1	3,6	3,8
Pergamino2010	Tardía	1,1	1,3	1,3	2,4	2,3	2,5	3,4	3,6	3,8
Pergamino2010	Temprana	0,8	1,0	1,2	1,8	2,1	2,8	2,6	3,1	4,0
Pergamino2011	Tardía	1,1	1,4	1,5	2,4	2,5	2,5	3,5	4,0	4,0
Pergamino2011	Temprana	0,8	1,2	1,2	1,9	2,8	2,5	2,8	3,9	3,7
Balcarce2010	Tardía	1,1	1,5	1,6	2,5	2,3	2,3	3,6	3,8	3,8
Balcarce2010	Temprana	0,8	1,0	1,2	2,0	1,7	2,3	2,7	2,7	3,6
Balcarce2011	Tardía	0,9	1,5	1,4	2,3	2,4	2,3	3,2	3,9	3,8
Balcarce2011	Temprana	0,9	1,4	1,7	2,3	2,8	2,6	3,2	4,2	4,3
Viedma2010	Tardía	1,0	1,5	1,3	2,2	2,0	2,2	3,2	3,4	3,5
Viedma2010	Temprana	0,8	0,5	0,8	2,0	2,9	3,0	2,8	3,5	3,8
Viedma2011	Tardía	1,4	1,4	1,6	1,8	2,0	2,0	3,3	3,4	3,6
Viedma2011	Temprana	1,2	1,4	1,4	2,1	2,2	2,2	3,3	3,6	3,6
<i>Sitio</i>		<0,0001			<0,0001			0,0001		
<i>Fecha siembra(FS)</i>		0,079			0,487			<0,0001		
<i>Híbrido (Hib)</i>		<0,0001			<0,0001			<0,0001		
<i>sitio:FS</i>		0,016			<0,0001			0,0001		
<i>sitio:Hib</i>		<0,0001			<0,0001			0,0001		
<i>Fs:Hib</i>		0,093			<0,0001			<0,0001		
<i>Sitio:Hib:FS</i>		0,0002	(0,19)		<0,0001	(0,30)		0,035	(0,43)	

El valor entre paréntesis representa la diferencia significativa mínima ($p=0.01$)

Tabla 7: Contenido por grano (mg) de zeína-2, zeína-1 y zeína-total para híbridos de maíz de tipo de grano contrastante (dentado, semi-dentado y colorado duro) sembrados en 10 sitios (combinación localidad y año) en fecha de siembra temprana y tardía.

Sitio	Fecha Siembra	Zeína-2 (mg/grano)			Zeína-1 (mg/grano)			Zeína total (mg/grano)		
		Dentado	Semi-dentado	Colorado duro	Dentado	Semi-dentado	Colorado duro	Dentado	Semi-dentado	Colorado duro
Corrientes2010	Temprana	2,4	3,1	3,7	5,3	5,0	5,2	7,7	8,1	8,9
Corrientes2011	Temprana	2,2	2,8	4,1	5,7	5,0	7,7	7,9	7,8	11,9
Paraná2010	Tardía	2,4	3,8	4,2	6,0	6,2	6,8	8,4	10,0	10,9
Paraná2010	Temprana	2,3	3,9	5,3	5,7	8,0	8,2	8,1	11,9	13,6
Paraná2011	Temprana	2,2	2,6	2,9	4,9	4,6	6,6	7,1	7,2	9,5
Pergamino2010	Tardía	2,5	3,0	3,4	5,4	5,2	6,8	7,9	8,2	10,2
Pergamino2010	Temprana	1,9	2,6	3,5	4,3	5,5	8,4	6,2	8,0	12,0
Pergamino2011	Tardía	3,2	3,8	4,5	6,9	6,7	7,3	10,1	10,5	11,8
Pergamino2011	Temprana	2,1	3,3	3,5	4,9	8,0	7,7	7,1	11,4	11,2
Balcarce2010	Tardía	1,8	2,5	2,3	4,1	3,3	4,1	5,9	5,8	6,5
Balcarce2010	Temprana	2,2	1,6	2,5	5,5	8,7	9,7	7,7	10,2	12,3
Balcarce2011	Tardía	3,5	3,6	4,2	4,5	5,1	5,3	8,0	8,7	9,5
Balcarce2011	Temprana	3,3	3,5	4,7	5,9	5,8	7,2	9,1	9,3	12,0
Viedma2010	Tardía	2,4	3,1	3,7	5,3	5,0	5,2	7,7	8,1	8,9
Viedma2010	Temprana	2,2	2,8	4,1	5,7	5,0	7,7	7,9	7,8	11,9
Viedma2011	Tardía	2,4	3,8	4,2	6,0	6,2	6,8	8,4	10,0	10,9
Viedma2011	Temprana	2,3	3,9	5,3	5,7	8,0	8,2	8,1	11,9	13,6
Sitio		<0,0001			<0,0001			<0,0001		
Fecha Siembra (FS)		<0,05			0,0001			0,0001		
Híbrido (Hib)		<0,0001			<0,0001			<0,0001		
Sitio:FS		<0,01			<0,0001			0,016		
Sitio:Hib		<0,0001			<0,0001			<0,0001		
Fs:Hib		0,0005			<0,0001			<0,0001		
Sitio:Hib:FS		0,007	(0,35)		<0,0001	(0,59)		<0,0001	(0,79)	

El valor entre paréntesis representa la diferencia significativa mínima ($p=0.01$)

Por otro lado, para la fracción de zeína-1, se establecieron diferencias en concentración entre los híbridos sólo en fechas de siembra temprana (excepto en Viedma 2011). En la fecha de siembra temprana, la concentración de la fracción de zeína-1 fue, en general, mayor para el híbrido colorado y semi-dentado respecto al híbrido dentado. Las diferencias en concentración de zeína-1 entre híbridos fueron concordantes con las diferencias en el contenido de zeína-1 en el grano (

Tabla 7, Figura 20).

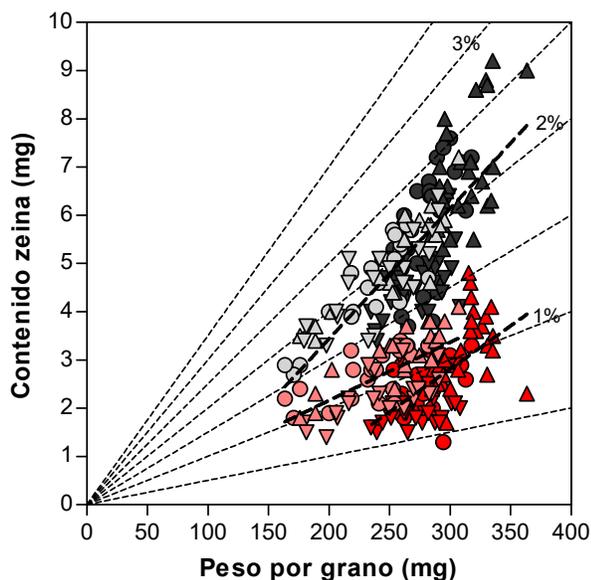


Figura 20: Contenido de zeína-1 (grises) y zeína-2 (rojos) por grano en función del peso por grano para siembras tempranas (símbolos oscuros) y siembras tardías (símbolos claros), para tres híbridos de distinto tipo de grano (triángulo hacia arriba: colorado duro; círculo: semi-dentado y triángulo hacia abajo: dentado). Las líneas al origen unen puntos con igual concentración de zeínas. Cada punto corresponde a una repetición. Ajuste modelos, zeína-1: $y=0,03x-1,97$, $R^2=0,6$, $P>0,0001$; zeína-2 siembra temprana: $y=0,019x-2,54$, $R^2=0,4$, $P<0,0001$; zeína-2 siembra tardía: $y=0,012x-0,25$, $R^2=0,46$, $P<0,0001$.

El efecto de la fecha de siembra sobre el contenido y concentración de la fracción zeína-1 presentó alta dependencia del híbrido y del sitio considerados. El retraso en la fecha de siembra tendió a reducir más que proporcionalmente el contenido de zeína-1 que el peso por grano en el híbrido colorado duro, con lo que tendió a reducir la concentración de esta fracción de zeína. Para el híbrido dentado, en tanto, el atraso en la fecha de siembra tendió a reducir más el peso por grano que el contenido de zeína-1 con lo que la concentración de dicha fracción de zeína tendió a incrementarse. A diferencia de lo observado para la fracción zeína-2, el retraso en la fecha de siembra no afectó consistentemente la concentración de zeína-1, pero sí provocó una reducción consistente en el contenido de dicha fracción (Tabla 7).

3.3.2. Relación fuente-destino y las fracciones de zeínas.

La asociación entre la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos y la concentración de zeína total dependió del híbrido considerado (Figura 21a). La

concentración de zeína-total tendió a mantenerse ante cambios en la relación fuente-destino en el híbrido colorado duro y se redujo ante el aumento en dicha relación en el híbrido dentado, el híbrido semi-dentado presentó un comportamiento intermedio. En tanto que el contenido de zeína total no se asoció a la relación fuente-destino durante el llenado de granos para ninguno de los tres híbridos evaluados (Figura 22b)

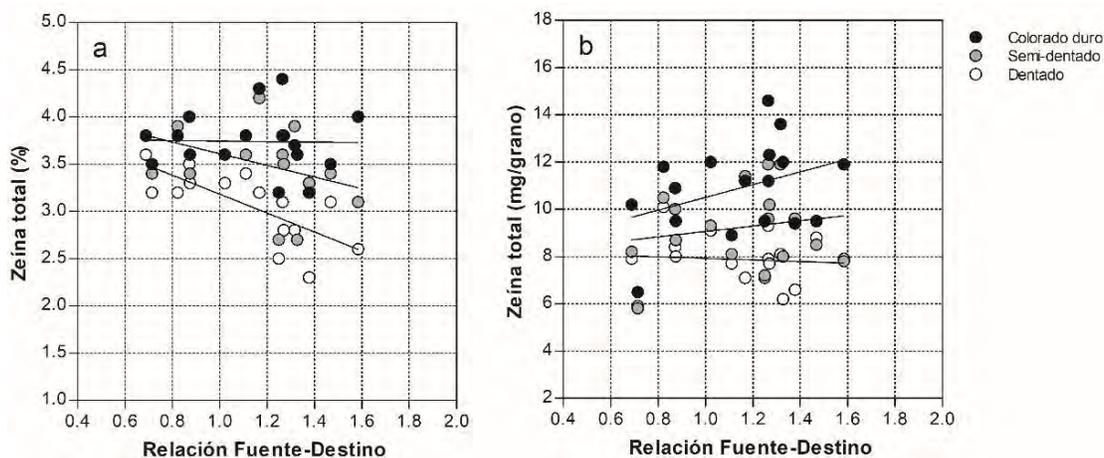


Figura 21: Concentración (a) y contenido (b) de zeína total en grano en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para tres híbridos de maíz de textura de grano contrastante. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones. Modelos ajustados por híbrido, concentración: dentado $y=4,2-1,01x$, $R^2=0,53$; $P<0,001$; semi-dentado $y=4,2+0,62x$, $R^2=0,16$, $P<0,12$; colorado duro $P=0,93$ y contenido: dentado $P=0,74$, semi-dentado $P=0,49$, colorado duro $P=0,14$.

La concentración de zeína-2 se asoció negativamente con la relación fuente-destino durante el período de llenado de grano en los tres híbridos estudiados (Figura 22a). Las pendiente de estas asociaciones no difirieron entre híbridos ($P=0,38$). El contenido de zeína-2 en grano no se asoció a la relación fuente-destino en ninguno de los híbridos evaluados (Figura 23b). La asociación entre la concentración de zeína-1 y la relación fuente-destino fue menos estrecha (Figura 23a) y se observó un comportamiento diferencial entre híbridos ($P<0,05$) ya que mientras la concentración de zeína-1 tendió a aumentar con el incremento de dicha relación en el híbrido colorado duro, se observó una asociación fue negativa entre estas variables en el híbrido dentado ($P=0,023$). La relación entre las fracciones de zeína (zeína-1/zeína-2) se asoció positivamente con la relación fuente-destino para los híbridos colorado duro y semi-dentado ($P<0,01$), pero no para el híbrido dentado (Figura 24).

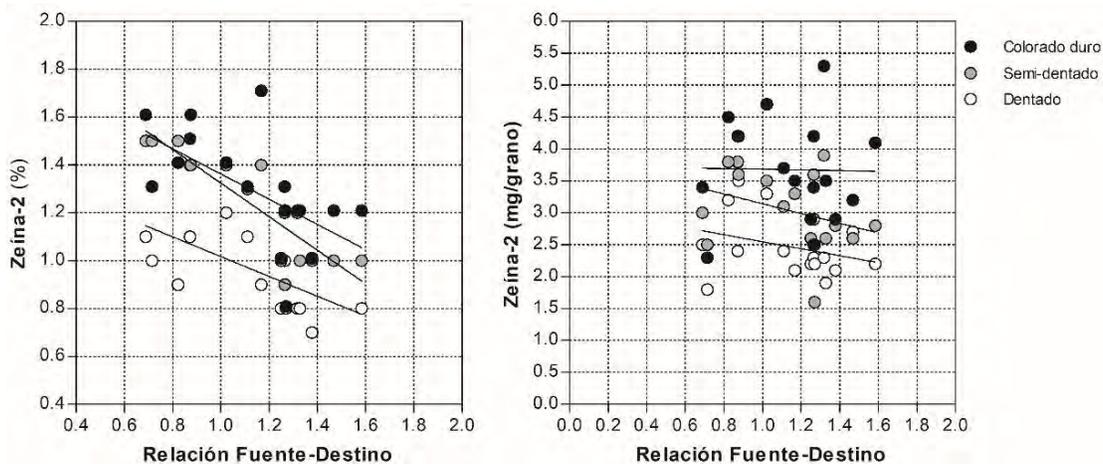


Figura 22: Concentración (a) y contenido (b) de zeína-2 en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para tres híbridos de maíz. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones. Modelos ajustados por híbrido, concentración: dentado $y=1,43-0,41x$, $R^2=0,39$, $P<0,01$, semi-dentado $y=2,02-0,70x$, $R^2=0,77$, $P<0,01$; colorado duro $y=1,89-0,83x$, $R^2=0,40$, $P<0,01$ y contenido: dentado $P=0,24$, semi-dentado $P=0,19$, colorado duro $P=0,94$.

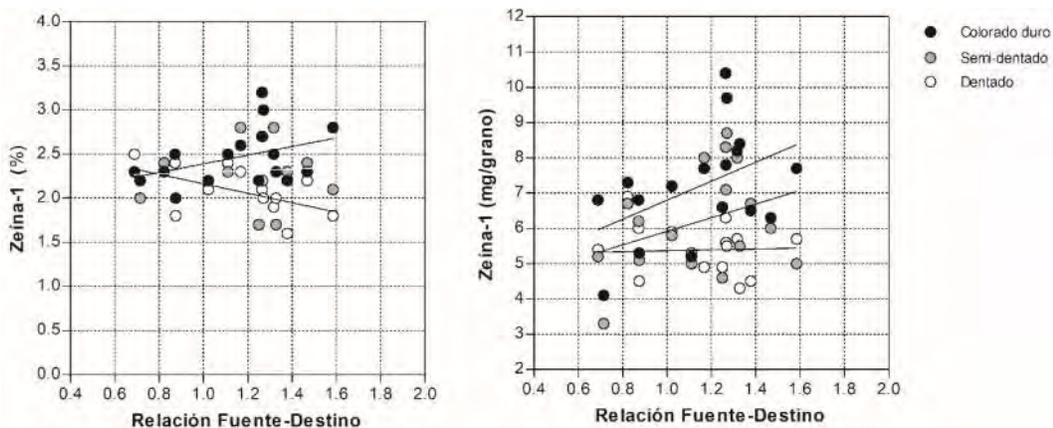


Figura 23: Concentración (a) y contenido (b) de zeína-1 en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para tres híbridos de maíz. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones. Modelos ajustados por híbrido, concentración: dentado $y=2,7-0,53x$, $R^2=0,29$, $P<0,05$, semi-dentado $P=0,79$, colorado duro $y=1,89+0,49x$, $R^2=0,17$, $P<0,1$ y contenido: dentado $P=0,86$, semi-dentado $P=0,17$ y colorado duro $y=4,1+2,69x$, $R^2=0,21$, $P<0,1$.

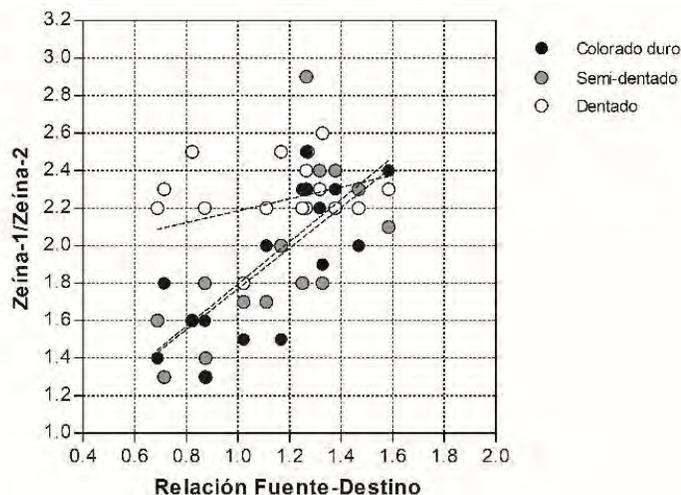


Figura 24: Relación de zeínas (zeína-1/zeína-2) en función de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos para tres híbridos de maíz. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones. Ajuste de modelos: dentado $P=0,28$, semi-dentado $y=0,67+1,12x$, $R^2=0,51$, $P<0,01$, colorado duro $y=0,68+1,08x$, $R^2=0,57$, $P<0,01$.

3.3.3 Zeínas y dureza del grano

La concentración de las distintas fracciones de zeínas no se asoció significativamente con la relación de molienda cuando se realizó un único análisis incluyendo todos los datos (Figura 25 a-c). Sin embargo, al descontar el efecto del ambiente, la asociación positiva entre la concentración de las distintas fracciones de zeínas y la relación de molienda se hizo evidente (Figura 25 d-f). En tanto que, al descontar el efecto del híbrido, la relación de molienda no se asoció con la concentración de zeínas-1 ni con la de zeína-total (Figura 25 H-I), pero se asoció negativamente con la concentración de zeína-2 (Figura 22),

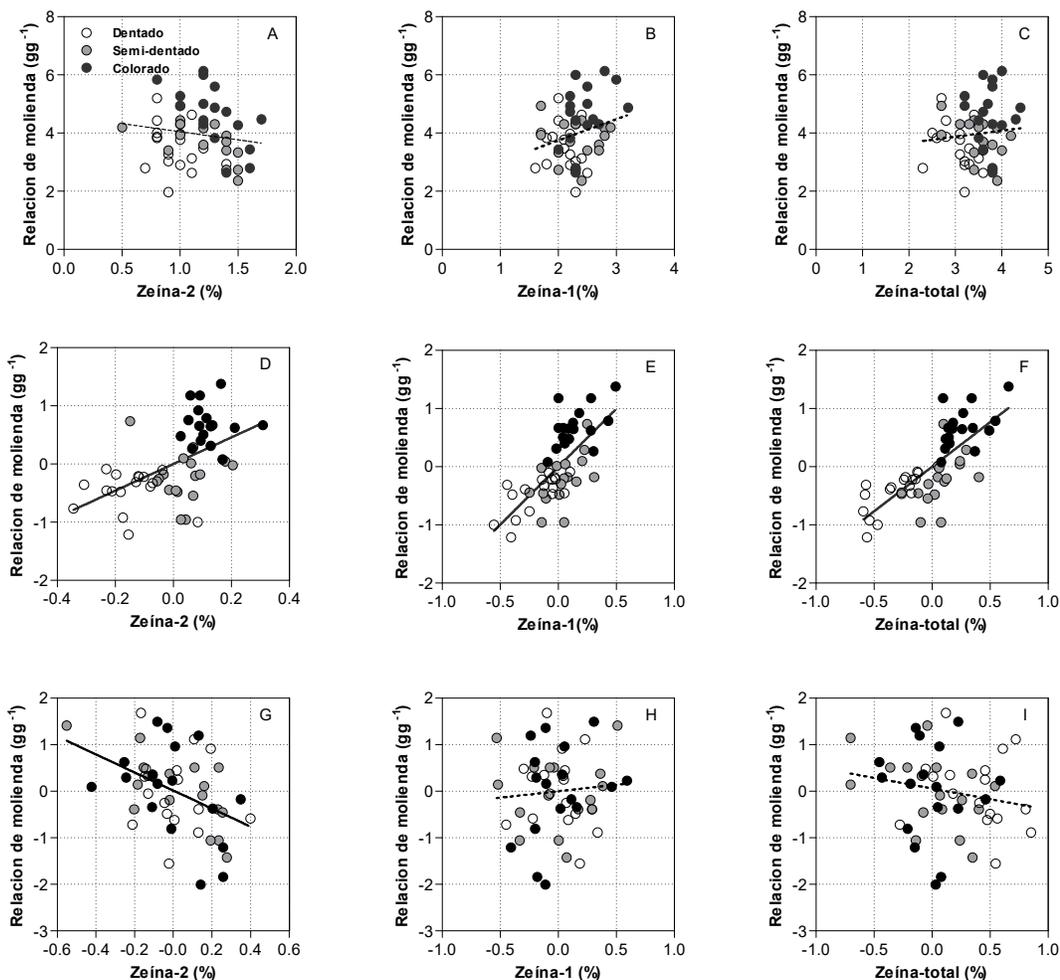


Figura 25: Relación de molienda en función de la concentración de (a) zeína-2, (b) zeína-1 y (c) zeína total para tres tipos de híbridos de maíz: dentado (blanco), semi-dentado (gris) y Colorado duro (negro) y distintos ambientes conformados por la combinación de localidades, fechas de siembra y años. D-F: Residuales de la relación de molienda en función de los residuales de la concentración de zeína resultantes de sustraer la media ambiental, i.e., promedio de los tres híbridos en cada ambiente (d) zeína-2, (e) zeína-1 y (f) zeína total. G-I: Residuales de la relación de molienda en función de los residuales de la concentración de zeína resultantes de sustraer la media de los híbridos, i.e., promedio de todos los ambientes para cada híbrido (g) zeína-2, (h) zeína-1 y (i) zeína total. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones. La línea continua indica que el modelo de regresión es significativo al 0,01.

La relación entre zeína-1 y zeína-2 se asoció positivamente con la dureza indicada por la relación de molienda para los híbridos Colorado duro y semi-dentado. Contrariamente, no se observó una asociación entre la relación zeína-1/zeína-2 y la dureza para el híbrido dentado (Figura 26).

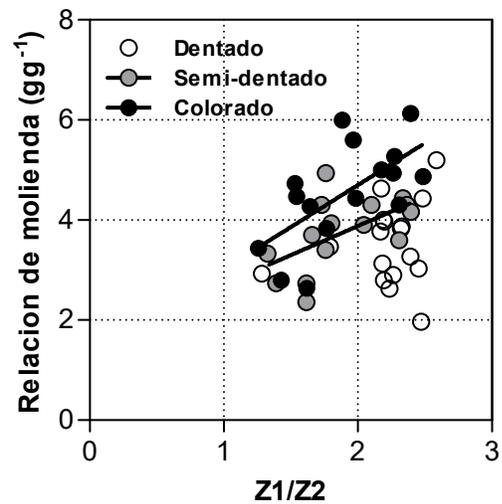


Figura 26: Relación de molienda en función de la relación de zeínas-1/zeínas-2 (Z-1/Z-2) para tres híbrido de maíz: dentado (blanco), semi-dentado (gris) colorado duro (negro) y distintos ambientes conformados por la combinación de localidades, años y fechas de siembra. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones.

3.4. Discusión

En este capítulo, en primer lugar, se estudió el efecto del híbrido y el ambiente sobre la composición de las fracciones de zeínas en el grano de maíz. Luego, se estudió la asociación entre la composición de las fracciones de zeínas y la dureza del grano expresada como relación de molienda.

3.4.1. Ambiente, híbrido y composición de zeínas

Hasta ahora, los estudios sobre la determinación de la composición de la fracción de zeínas del grano de maíz han hecho foco en el efecto del genotipo (Dombrink-Kurtzman and Bietz, 1993; Robutti, Borrás, Ferreres y Bietz, 2000; Eyhéabide *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2005; Gerde *et al.*, 2016; Abdala *et al.*, 2018). En concordancia con esos trabajos, en esta tesis se encontraron mayores contenidos y concentración de zeína-2, zeína-1 y de zeína total en el híbrido colorado duro respecto al híbrido de tipo dentado (

Tabla 6 y Tabla 7).

Además, esta tesis estudió cómo el ambiente afecta la composición de dicha fracción proteica a través de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos. La relación fuente-destino durante el período de llenado de granos parece tener un efecto menor sobre el contenido de zeína-2 por grano. No obstante, la variación en la relación fuente-destino afectó sensiblemente la acumulación del resto de los componentes del grano y en consecuencia afectó la concentración de zeína-2 en grano. Se estableció una asociación negativa entre la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos y la concentración de zeína-2 en los tres híbridos (Figura 22). Esta dilución de la zeína-2 ante el incremento en la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos es compatible con la síntesis relativamente temprana de esta fracción de zeínas descrita por el modelo de desarrollo del cuerpo proteico antes presentado (Lending y Larkins, 1989). De esta manera, las mayores concentraciones de zeína-2 en el grano se observaron, en general, en siembras tardías en altas latitudes, ambientes caracterizados por una baja relación fuente-destino durante el llenado de granos.

Por otro lado, el modelo de desarrollo del cuerpo proteico antes presentado (Lending y Larking, 1989) propone que en una etapa posterior a la síntesis de zeína-2, la síntesis de zeína-1 rellena los cuerpos proteicos hasta alcanzar la madurez. Los resultados de esta tesis apoyan este modelo para el híbrido colorado duro y el híbrido semi-dentado en los que la variación en el contenido de zeína-1 en respuesta a la relación fuente destino fue proporcional (semi-dentado) o más que proporcional comparando con el

resto de los componentes del grano. Así, para estos híbridos, la concentración de zeína-1 tendió a mantenerse o a aumentar levemente ante incrementos en la relación fuente-destino durante el llenado de granos.

En el híbrido dentado, en cambio, el contenido de zeína-1 no se asoció a la relación fuente-destino durante el llenado de granos y la concentración de zeína-1 se redujo al incrementarse dicha relación durante el período de llenado de granos, lo que es coincidente con lo observado para la fracción de zeína-2. Estos resultados permiten hipotetizar que en el híbrido dentado la acumulación de zeína-1 cesa antes durante el llenado de granos. Dicha hipótesis sería la reducción abrupta de la actividad de ARN-m para zeínas-1 que ocurre en la porción harinosa del grano como consecuencia del temprano avance de la muerte celular programada que comienza poco después de la fecundación (Woo *et al.*, 2001). De esta manera las acumulaciones de zeína-1 y zeína-2 tendrían mayor sincronía en el híbrido dentado comparando con el híbrido semi-dentado y el híbrido colorado duros utilizados en esta tesis.

Gerde *et al.* (2016) proponen que la relación entre zeínas-1/zeínas-2 es mayor para los híbridos de tipo dentado lo que es producto principalmente de un menor contenido/concentración de zeínas-2. Resultados similares se observan al analizar el trabajo de Dombrink-kurtzman y Bietz (1993). Esta tesis confirmó estos resultados para la mayor parte de los ambientes evaluados. No obstante, en los ambientes caracterizados por una alta relación fuente-destino durante el período de llenado de granos las diferencias entre híbridos se reducen como consecuencia de la respuesta diferencial de las distintas fracciones de zeínas ante el incremento en la disponibilidad de asimilados por grano durante el llenado.

3.4.2. Composición de zeínas y dureza de grano

La dureza del grano de maíz ha sido asociada tradicionalmente con la fracción proteica del endosperma, en especial con las fracciones de zeínas (Lopes and Larkins, 1991; Pratt *et al.*, 1995; Chandrashekar and Mazhar, 1999; Gerde *et al.*, 2016). En esta tesis, sin embargo, no se encontró una asociación significativa entre la concentración de zeína total o alguna de sus fracciones y la dureza de grano indicada como la relación de molienda (Figura 25A, B y C). Los trabajos antes mencionados han utilizado al genotipo como la principal fuente de variación de dureza de grano. En concordancia, al analizar el efecto del tipo de híbrido utilizando los residuales resultantes de sustraer la media de cada ambiente se hizo evidente la asociación positiva entre la concentración de zeínas y dureza del grano (Figura 25D, E y F). De esta manera, cuando la concentración de las fracciones de zeínas se incrementó a causa del genotipo este

incremento fue acompañado por un aumento en la dureza. Contrariamente, cuando la variación en la concentración se debió al efecto del ambiente, la asociación con la dureza fue débil y negativa para zeína-2 y no significativa para zeína-1 y zeína-total (Figura 25G, H e I).

Haciendo analogía con la edificación, Chandrashekar y Mazhar (1999) proponen a la malla proteica del endosperma como una pared en que la zeína-2 hace de cemento y la zeína-1 hace de los ladrillos, la zeínas serían así determinantes de la fortaleza de esta pared y por lo tanto de la dureza de grano. Sin embargo, la dureza debe depender además, de características estructurales del grano a mayor escala tales como el arreglo espacial de dicha malla de zeínas, la forma y tamaño de los gránulos de almidón y su capacidad de rellenar el espacio disponible (Dombrink-Kurtzman y Knutson, 1997), la fuerza con que se ligan el almidón, la proteína, etc. De esta manera, la asociación entre la relación fuente-destino y la dureza de grano parece estar más ligada a alguno de dichos aspectos estructurales que a la composición de la malla de zeínas.

Cuando la variación en la relación zeína-1/zeína-2 fue consecuencia de la utilización de híbridos de distinto tipo de granos (i.e., colorado duro, semi-dentado y dentado), se observó una asociación negativa entre dicha relación de zeínas y la dureza de grano (Gerde *et al.*, 2016). De esta manera, una baja relación zeína-1/zeína-2 es deseable en términos de dureza de grano cuando evaluamos genotipos en un ambiente. Los híbridos duros presentan sobre todo mayor concentración de zeína-2 (Figura 22) y por lo tanto, mayor rigidez en la malla proteica. Contrariamente, una baja relación zeína-1/zeína-2 que ocurre como consecuencia de un ambiente que promueve una baja relación fuente-destino durante el llenado no sería deseable si el objetivo es producir granos duros, porque estaría asociada a alteraciones estructurales que reducen la dureza de los granos. La relación de zeínas estaría funcionando como un indicador de la relación fuente-destino durante el llenado de granos en híbridos que presentan una clara diferenciación de los momentos en que se sintetizan las distintas fracciones de zeínas. De esta manera, el aumento de la relación zeína-1/zeína-2 para el híbrido colorado y el híbrido semi-dentado indica mayor relación fuente-destino durante el llenado de granos que se asocia a una estructura de grano de alta dureza (Figura 26).

La información presentada en este capítulo no permite rechazar la tercera hipótesis que proponía que las alteraciones en la relación fuente-destino durante el período de llenado de los granos de maíz afectan la concentración de zeína total y se sus fracciones componentes. No obstante, de los resultados obtenidos también se desprende que el efecto de la alteración de la relación fuente-destino sobre la composición de la fracción

de zeínas del grano es dependiente del híbrido considerado (Figura 21, Figura 22 y Figura 23). Por otro lado, la variación en la composición de zeínas debida al ambiente no se asoció a la dureza de grano por lo que se rechaza la quinta hipótesis de la tesis que proponía que el efecto de la relación fuente-destino durante el período de llenado de los granos sobre la dureza de grano está asociado con su efecto sobre la concentración de zeína total y la relación entre sus fracciones componentes. Trabajos futuros deberán encontrar cual o cuales son las características estructurales del grano de maíz afectadas por la relación fuente-destino durante el llenado de granos que determinan la dureza del mismo.

CAPITULO 4: INTEGRACION FINAL Y CONCLUSIONES

En esta tesis se han presentado y discutido evidencias acerca de cómo el ambiente en el que se desarrolla el cultivo y el tipo de híbrido empleado se relacionan con la dureza del grano de maíz y cuál es el rol de la composición de las zeínas en el establecimiento de dichas relaciones.

El rango de ambientes en los que se desarrolla el maíz en Argentina es muy amplio, sin embargo, no se había evaluado aún el peso relativo o la importancia del ambiente en la determinación de la dureza del grano de maíz respecto al tipo de híbrido. Esta información es relevante para el diseño de sistemas de cultivo orientados a producir granos de calidad diferenciada. En este contexto, el primer objetivo de este trabajo fue **evaluar la contribución del tipo de híbrido y del ambiente sobre la dureza del grano y sobre el rendimiento de maíz para el área maicera argentina**. Así, considerando la diversidad de ambientes del área maicera argentina (Aramburu Merlos *et al.*, 2015) y la variabilidad genética disponible para dureza de grano (Eyhérbide *et al.*, 2004; Abdala *et al.*, 2018), se hipotetizó **que el efecto del ambiente sobre la dureza de grano es mayor que el efecto del tipo de híbrido**. La red experimental diseñada para responder a este objetivo combinó localidades sobre una transecta norte-sur a lo largo de gran parte área maicera, dos fechas de siembra, dos manejos de fertilización y tres híbridos comerciales representativos del rango disponible de dureza de grano. La información generada permitió destacar el rol del ambiente por sobre el rol del genotipo en la determinación de la dureza del grano de maíz; de hecho, el ambiente fue la principal fuente de variabilidad en la dureza de grano (Tabla 2). La pertinencia del efecto del ambiente sobre la dureza de grano queda de manifiesto en los ambientes en los que incluso el híbrido intrínsecamente duro no alcanzó los requerimientos de dureza la industria de molienda seca (Figura 2). En el otro extremo, hay ambientes en los que cualquier híbrido alcanzó los requerimientos de la industria molinera y en los que la elección del híbrido debería responder a la maximización del rendimiento en grano. Estos resultados llevaron a no rechazar la primera hipótesis de esta tesis y a proponer al ambiente en el que se desarrolla el cultivo como el principal factor a considerar para la producción de maíz de calidad diferenciada para la industria de molienda seca. Esta es una de las principales contribuciones de esta tesis al diseño de estrategias para la producción de maíz duro, sobre todo al considerar que hasta el momento la mayor parte de los estudios hicieron foco en la importancia del tipo de híbrido en la determinación de la dureza de grano de este cultivo (Robutti *et al.*, 2000a; Duarte *et al.*, 2005; Gerde *et al.*, 2016; Macke *et al.*, 2016). En un trabajo recientemente publicado (Abdala *et al.*, 2018) concluyen que el efecto del ambiente es despreciable respecto al del tipo de

híbrido, no obstante la variabilidad ambiental explorada en este trabajo es muy baja comparando con la que resulta de las distintas combinaciones de sitios y manejos agronómicos presentes en los sistemas de producción de maíz en Argentina (Aramburu Merlos *et al.*, 2015). En general, los resultados obtenidos en esta tesis indican que las condiciones ambientales en las que se desarrolla el cultivo, y que resultan del sitio y el manejo agronómico, deberían ser consideradas en conjunto con el híbrido para el diseño de estrategias de producción de maíz orientadas a obtener grano de calidad para la industria de molienda seca.

Hasta el momento no se había abordado en profundidad el estudio de la respuesta de la dureza del grano de maíz al ambiente para distintos tipos de híbridos. Se hipotetizó que la respuesta en dureza de grano ante variaciones en el ambiente sería mayor para un híbrido dentado comparando con uno colorado duro. Esta hipótesis fue rechazada en vista de los resultados obtenidos que demostraron que la respuesta en la dureza de grano ante variaciones en el ambiente fue mayor para un híbrido colorado duro comparando con híbridos más blandos. No obstante, bajo el esquema actual de comercialización, en el que la calidad se define respecto a un valor umbral de dureza, los granos de híbridos de tipo colorado se mantienen con mayor frecuencia sobre dicho umbral y aparentan, entonces, mayor estabilidad respecto a variaciones en el ambiente.

Avanzar en la capacidad de predecir el efecto del ambiente sobre la dureza de maíz sería de utilidad para el diseño de estrategias productivas orientadas a obtener grano de un nivel de dureza determinado. Trabajos previos exploraron la asociación entre la dureza de grano indicada por la relación de molienda y la relación entre la fuente de asimilados y la demanda de los destinos reproductivos durante el llenado de granos (Cirilo *et al.*, 2011; Governatori y Uhart, 1998). La localidad, el año y la fecha de siembra fueron los factores que explicaron la mayor parte del efecto del ambiente sobre la dureza del grano en la red experimental que se condujo en esta tesis. La radiación y la temperatura fueron las principales variables responsables del efecto del ambiente sobre la dureza de grano. La radiación y la temperatura definen el crecimiento del cultivo (Monteith, 1972) y por lo tanto se relacionan con la fuente de asimilados durante el llenado de los granos y con el establecimiento de la demanda por parte de los granos durante el período crítico de floración (Cerrudo *et al.*, 2013). En este contexto, la tesis se orientó hacia la **elaboración de un modelo predictivo de la dureza del grano de maíz basado en la integración de variables ambientales determinantes de la relación entre la fuente de asimilados y la demanda de los destinos reproductivos durante el período llenado de granos**. La tesis propuso un método original para

estimar un indicador de la relación fuente-destino durante el llenado de granos que consistió en utilizar el crecimiento potencial acumulado durante el período de llenado efectivo de los granos como indicador de la fuente durante dicho período y el crecimiento potencial acumulado alrededor del período crítico de floración (Cerrudo *et al.*, 2013) como indicador de la demanda de los destinos. El crecimiento acumulado durante dichos períodos se estimó en base a la duración y la tasa de crecimiento del cultivo. La tasa de crecimiento se estimó en base a la radiación interceptada por el cultivo y la eficiencia con que esta radiación se utilizó para producir biomasa que, en ausencia de limitaciones hídricas y nutricionales, depende de la temperatura (Monteith, 1972). A diferencia de otros métodos para estimar la relación fuente-destino, el método propuesto fue útil para caracterizar el ambiente sin estar influenciado por caracteres del genotipo excepto el ciclo y se obtiene a partir de datos de radiación y temperatura que actualmente están disponible para la mayor parte del área agrícola (Aramburu Merlos *et al.*, 2015). Por otro lado, el método propuesto no presenta problemas de sub-estimación de fuente en condiciones en las que la ausencia de destino reproductivo lleva a un retro-control de la fotosíntesis. No obstante, resta incorporar el efecto de estreses hídricos, térmicos nutricionales y bióticos sobre la fracción de radiación incidente interceptada y sobre la eficiencia en el uso de la radiación para extender, así, su utilidad a situaciones en las que los cultivos no crecen en condiciones potenciales. Al respecto, los modelos de simulación de cultivo actuales cuentan con algoritmos para integrar los efectos del estrés hídrico y las deficiencias nutricionales sobre el crecimiento del cultivo durante las distintas etapas de desarrollo (Carberry *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 2017; Soufizadeh *et al.*, 2018). En un próximo paso se podrán ajustar modelos de simulación de cultivos para obtener estimaciones de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos en cultivos que crecen con limitaciones hídricas y/o que están expuestos a deficiencias nutricionales.

La tercera hipótesis de la tesis propuso que **la relación fuente-destino estimada como la relación entre el crecimiento acumulado durante el período de llenado de granos y el crecimiento acumulado durante el período crítico de floración se asocia directamente con la relación de molienda de maíz**. Esta hipótesis no fue rechazada. La relación fuente-destino durante el período de llenado de granos se asoció en buena medida con relación de molienda del grano para los distintos tipos de híbridos confirmando la importancia del estado fisiológico del cultivo durante el llenado de granos sobre la dureza del grano en maíz (Cirilo *et al.*, 2011). Este indicador de la relación fuente-destino del ambiente se propone como una herramienta útil para explorar la

dureza alcanzable en distintos ambientes, sin limitaciones, surgidos de combinaciones de sitio y manejo agronómico. Del mismo modo, dicho indicador de la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos se podría extender a la estimación de otras características de calidad de grano como la composición del aceite (Izquierdo *et al.*, 2009).

Por otra parte, el modelo propuesto no contempla otro efecto que la relación fuente-destino para la determinación de la dureza de grano. Sin embargo, Martínez *et al.* (2017) describieron un efecto directo de la temperatura mínima sobre la participación de la amilosa en la composición del almidón del grano que determina la compresibilidad del almidón y por lo tanto implicado en la dureza del grano (Dombrink-Kurtzman y Knutson, 1997). Por otro lado, (Mayer *et al.*, 2016) han descrito un efecto directo de temperaturas elevadas (golpe de calor) sobre la dureza de grano. La incorporación de estas y otras variables ambientales mejorará sensiblemente la capacidad predictiva del modelo propuesto para estimar la dureza alcanzable en un ambiente determinado.

Hasta aquí, en esta tesis se demostró que esta tesis demostró que el ambiente en el que se desarrolla el cultivo es determinante de la dureza del grano de maíz y que el efecto del ambiente sobre la dureza está asociado con la relación entre la fuente y la demanda de asimilados durante el período de llenado de granos. A continuación, esta tesis propuso estudiar la base de los mecanismos que subyacen la asociación entre dicha relación y la dureza del grano de maíz.

La dureza del grano de maíz se atribuye principalmente a la interacción de distintas fracciones de prolaminas endospermatas, las zeínas, que se ensamblan en cuerpos proteicos que a su vez se aglomeran conformando una malla rígida que contiene a los amiloplastos. El rol de las zeínas en la determinación de la dureza de grano se ha establecido en gran medida utilizando como fuente de variación al tipo de híbrido (Dombrink-Kurtzman y Bietz, 1993; Mazhar y Chandrashekar, 1995; Robutti *et al.*, 1997; Chandrashekar y Mazhar, 1999; Gerde *et al.*, 2016). Sin embargo, no había estudios del efecto que tiene la relación entre la fuente de asimilados y la demanda de los destinos reproductivos durante el llenado sobre dicha asociación entre la composición de zeínas y dureza del grano. De esta manera, la tesis se orientó a **establecer asociaciones funcionales entre la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos y la concentración de zeínas y sus fracciones.**

Se formuló entonces la cuarta hipótesis que establecía que **las alteraciones en la relación fuente-destino durante el período de llenado efectivo de los granos de maíz modifican la concentración de zeína total y la relación entre las fracciones**

de zeínas. Dicha hipótesis no fue rechazada ya que se pudo establecer una asociación negativa entre la relación fuente-destino durante el período de llenado de granos y la concentración de zeína-2 en los tres híbridos (Figura 22). Por otro lado, la concentración de zeína-1 también se asoció a la relación fuente-destino, pero la respuesta dependió del híbrido considerado (Figura 23). De esta manera, esta tesis aporta información original sobre el efecto de la relación fuente-destino durante el período de llenado sobre la composición de la fracción proteica del grano de maíz. Los mecanismos que permitieron explicar estas asociaciones entre relación fuente-destino y la concentración de las diferentes fracciones de zeínas son compatibles con el modelo de desarrollo del cuerpo proteico en el grano de maíz propuesto por Lending y Larking (1989). No obstante futuros trabajos podrán profundizar en el entendimiento de dichos mecanismos analizando la dinámica de acumulación de las distintas fracciones de zeínas en el grano bajo distintas condiciones de relación fuente-destino y para distintos tipos de híbridos.

Por último, esta tesis se orientó a establecer asociaciones funcionales entre la composición de la fracción de zeínas y la dureza del grano de maíz indicada por la relación de molienda. La **quinta hipótesis estableció que el efecto de la relación fuente-destino durante el período de llenado de los granos sobre la dureza de grano está asociado con su efecto sobre la concentración de zeína total y la relación entre sus fracciones componentes.**

En concordancia con lo conocido hasta ahora (Gerde *et al.*, 2016; Lopez y Larking, 1991; Chandrashekar y Mazhar, 1999; Pratt *et al.*, 1995), la variación en la concentración de las fracciones de zeína originadas por el tipo de híbrido una vez despejado el efecto del ambiente se asoció a la variación en dureza de grano. Sin embargo, los resultados de esta tesis indican que el efecto del ambiente sobre la dureza no estaría determinado por su efecto sobre la composición de las zeínas. La asociación con la dureza fue débil y negativa para zeína-2 y no significativa para zeína-1 y zeína-total. En vista de estos resultados se rechazó la quinta hipótesis antes presentada. Los resultados de esta tesis indican que el efecto de la relación fuente-destino sobre la dureza de grano podría estar ligado a aspectos estructurales del grano a mayor escala que la composición de la malla que conforman las fracciones de zeínas. Esta tesis plantea así un nuevo desafío para avanzar en el entendimiento del efecto del ambiente sobre la dureza del grano de maíz. Futuros trabajos deberán orientarse a identificar características estructurales del grano implicadas en el establecimiento de la dureza y los mecanismos que las articulan con el ambiente en el que se desarrolla el cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- Abdala, L.J.; Gambin, B.L.; Borrás, L. 2018. Sowing date and maize grain quality for dry milling. *Eur. J. Agron.* 92: 1–8.
- Alexandre, A.L.; Mestres, C.; Faure, J. 1991. Measurement of endosperm vitreousness of corn: a quantitative method and its application to african cultivars. *Cereal Chem.* 68: 614–617.
- Andrade, F.H. 1995. Analysis of growth and yield of maize, sunflower and soybean grown at Balcarce, Argentina. *Field Crops Res.* 41: 1–12.
- Andrade, F.H.; Uhart, S.A.; Cirilo, A. 1993 Temperature affects radiation use efficiency in maize. *Field Crops Res.* 32: 17–25.
- Andrade, F.H.; Uhart, S.A.; Frugone, M.I. 1993 Intercepted Radiation at Flowering and Kernel Number in Maize: Shade versus Plant Density Effects. *Crop Sci.* 33: 482–485.
- Aramburu Merlos, F.; Monzon, J.P.; Mercou, P.L.; Taboada, M.; Andrade, F.H.; Hall, A.J.; Jobbagy, E.; Cassman, K.G.; Grassini, P. 2015. Potential for crop production increase in Argentina through closure of existing yield gaps. *Field Crops Res.* 184: 145–154.
- Bauer, P.J.; Carter, P.R. 1986. Effect of Seeding Date, Plant Density, Moisture Availability, and Soil Nitrogen Fertility on Maize Kernel Breakage Susceptibility 1. *Crop Sci.* 26: 1220–1226.
- Blandino, M.; Sacco, D.; Reyneri, A. 2013. Prediction of the dry-milling performance of maize hybrids through hardness-associated properties. *J. Sci. Food Agric.* 93: 1356–1364.
- Bolsa de Cereales. 2017. Panorama Agrícola Semanal. [en línea]. <http://www.bolsadecereales.com/ver-acerca-del-panorama-agricola-semanal-78>. [consulta: noviembre 2018].
- Bonelli, L.E.; Monzon, J.P.; Cerrudo, A.; Rizzalli, H.R.; Andrade, F.H. 2016. Maize grain yield components and source-sink relationship as affected by the delay in sowing date. *Field Crops Res.* 198: 215–225.
- Boote, K.J.; Jones, J.W.; Pickering, N.B. 1996. Potential Uses and Limitations of Crop Models. *Agron. J.* 88: 704–716.
- Borrás, L.; Curá, J.A.; Otegui, M.E. 2002. Maize Kernel Composition and Post-Flowering Source-Sink Ratio. *Crop Sci.* 42: 781–790.
- Brun, E.L.; Dudley, J.W. 1989. Nitrogen Response in the USA and Argentina of Corn Populations with Different Proportions of Flint and Dent Germplasm. *Crop Sci.* 29: 565–569.
- Caffera, R.M.; Berbery, E.H. 2006. La Plata basin climatology. *In*: Barros, V., Clarke, R., Diás, P.S. (eds.). *Climate Change in the La Plata Basin*. CIMA/CONICET-UBA. pp: 19–38.

- Capello, M.L. 2011. Una Argentina competitiva, productiva y federal: La cadena de maiz y sus derivados industriales. IERAL Fundación Mediterranea: Buenos Aires, Argentina. Documento de Trabajo Año 17, Edición 99. pp: 44.
- Carberry, P.S.; Muchow, R.C.; McCown, R.L. 1989. Testing the CERES-Maize simulation model in a semi-arid tropical environment. *Field Crops Res.* 20: 297–315.
- Cerrudo, A.; Di Matteo, J.; Fernandez, E.; Robles, M.; Pico, L.O.; Andrade, F.H. 2013. Yield components of maize as affected by short shading periods and thinning. *Crop Pasture Sci.* 64: 580–587.
- Chandrashekar, A.; Mazhar, H. 1999. The Biochemical Basis and Implications of Grain Strength in Sorghum and Maize. *J. Cereal Sci.* 30: 193–207.
- Chenu, K. 2015. Characterizing the crop environment: nature, significance and applications. *In: Sadras, V.O., Calderini, D.F. (eds.), Crop Physiology* 2nd. ed. Academic Press, San Diego, pp. 321–348
- Cirilo, A.G.; Actis, M.; Andrade, F.H.; Valentinuz, O.R. 2011. Crop management affects dry-milling quality of flint maize kernels. *Field Crops Res.* 122: 140–150.
- Cirilo, A.G.; Andrade, F.H. 1994. Sowing date and maize productivity: I. Crop growth and dry matter partitioning. *Crop Sci.* 34: 1039–1043.
- Cirilo, A.G.; Andrade, F.H. 1998. Maíz. *In: Aguirrezábal L.; Andrade F. (coords.) Calidad de Productos Agrícolas. Bases ecofisiológicas, genéticas y de manejo agronómico.* Imprenta Laukakolor: Buenos Aires. pp. 315–322
- Claassen, M.M.; Shaw, R.H. 1970. Water Deficit Effects on Corn. I. Grain Components 1. *Agron. J.* 62: 652–655.
- De Mendiburu, F. 2009. *Agricolae: statistical procedures for agricultural research.* R Package Version: 1–0.
- Di Matteo, J.A.; Ferreyra, J.M.; Cerrudo, A.A.; Echarte, L.; Andrade, F.H. 2016. Yield potential and yield stability of Argentine maize hybrids over 45 years of breeding. *Field Crops Res.* 197: 107–116.
- Dombrink-Kurtzman, M.A., and J.A. Bietz. 1993. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. *Cereal Chem.* 70: 105–108.
- Dombrink-Kurtzman, M.A.; Knutson, C.A. 1997. A Study of Maize Endosperm Hardness in Relation to Amylose Content and Susceptibility to Damage. *Cereal Chem.* 74: 776–780.
- Duarte, A.P.; Mason, S.C. Jackson, D.S.; Kiehl, J.de C. 2005. Grain Quality of Brazilian Maize Genotypes as Influenced by Nitrogen Level. *Crop Sci.* 45: 1958–1964.
- Echarte, L.; Andrade, F.H.; Sadras, V.O.; Abbate, P. 2006. Kernel weight and its response to source manipulations during grain filling in Argentinean maize hybrids released in different decades. *Field Crops Res.* 96: 307–312.

- Echarte, L.; Andrade, F.H.; Vega, C.R.C.; Tollenaar, M. 2004. Kernel Number Determination in Argentinean Maize Hybrids Released between 1965 and 1993. *Crop Sci.* 44: 1654.
- Esen, A. 1987. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). *J. Cereal Sci.* 5: 117–128.
- Eyherabide, G.; Robutti, J.L.; Percibalde, N.M.; Percello, D.; Alvarez, M.D.P. 2004. Association between grain yield and endosperm hardness in maize cultivars. *Maydica* 49: 319–326.
- FAO. 2018. FAOSTAT. [en línea]. Statistics of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> [consulta: marzo 2019].
- Finlay, K.W.; Wilkinson, G.N. 1963. The analysis of adaptation in a plant-breeding programme. *Aust. J. Agric. Res.* 14: 742–754.
- Fox, G.; Manley, M. 2009. Hardness Methods for Testing Maize Kernels. *J. Agric. Food Chem.* 57: 5647–5657.
- Gambín, B.L.; Borrás, L. 2010. Resource distribution and the trade-off between seed number and seed weight: a comparison across crop species. *Ann. Appl. Biol.* 156: 91–102.
- Geetha, K.B.; Lending, C.R.; Lopes, M.A.; Wallace, J.C.; Larkins, B.A. 1991. opaque-2 modifiers increase gamma-zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. *Plant Cell* 3: 1207–1219.
- Gerde, J.A.; Spinozzi, J.I.; Borrás, L. 2017. Maize Kernel Hardness, Endosperm Zein Profiles, and Ethanol Production. *BioEnergy Res.* 10: 760–771.
- Gerde, J.A.; Tamagno, S. Di Paola, J. C.; Borrás, L. 2016. Genotype and Nitrogen Effects over Maize Kernel Hardness and Endosperm Zein Profiles. *Crop Sci.* 56: 1225–1233.
- Gifford, R.M.; Evans, L.T. 1981. Photosynthesis, carbon partitioning, and yield. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 485–509.
- Gilmore, E.C.; Rogers, J.S. 1958. Heat units as a method of measuring maturity in corn. *Agron. J.* 50: 611–615.
- Governatori, S.; Uhart, S. 1998. Effect of nitrogen availability on kernel endosperm hardness of hybrids released in different eras. *In: International Workshop on Physiological Bases for Maize Improvement.* FA-UBA, Bs. As. pp 35-41.
- Hall, A.J.; Rebella, C.M.; Ghera, C.M.; Culot, J.P. 1992. Field-crop systems of the Pampas. *In: Pearson, C.J. (ed.). Ecosystems of the world. Field crop ecosystems.* Elsevier: New York, US, pp.413-450.
- Holding, D.R.; Larkins, B.A. 2006. The development and importance of zein protein bodies in maize endosperm. *Maydica* 51: 243–254.

- Hunter, J.L.; TeKrony, D.M.; Miles, D.F.; Egli, D.B. 1991. Corn Seed Maturity Indicators and their Relationship to Uptake of Carbon-14 Assimilate. *Crop Sci.* 31: 1309–1313.
- Izquierdo, N.G.; Aguirrezábal, L.A.N.; Andrade, F.H.; Geroudet, C.; Valentinuz, O.; Pereyra Iraola, M. 2009. Intercepted solar radiation affects oil fatty acid composition in crop species. *Field Crops Res.* 114: 66–74.
- Jones, R.J.; Simmons, S.R. 1983. Effect of Altered Source-Sink Ratio on Growth of Maize Kernels 1. *Crop Sci.* 23: 129–134.
- Kniep, K.R.; Mason, S.C. 1991. Lysine and Protein Content of Normal and Opaque-2 Maize Grain as Influenced by Irrigation and Nitrogen. *Crop Sci.* 31: 177–181.
- Larkins, B.A.; Pedersen, K.; Marks, M.D.; Wilson, D.R. 1984. The zein proteins of maize endosperm. *Trends Biochem. Sci.* 9: 306–308.
- Lee, K.M.; Herrman, T.J.; Bean, S.R.; Jackson, D.S.; Lingenfelter, J. 2007. Classification of Dry-Milled Maize Grit Yield Groups Using Quadratic Discriminant Analysis and Decision Tree Algorithm. *Cereal Chem.* 84: 152–161.
- Lending, C.R.; Larkins, B.A. 1989. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *Plant Cell* 1: 1011–1023.
- Lezcano, I.A.E. 2012. Informe de producto. Cadena de productos de maíz. [en línea]. Alimentos Argentinos. Ministerio de Agricultura. : http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Farinaceos/farinaceos/Productos/ProductosMaiz_1ra_2012_05May.pdf [consulta: marzo 2019].
- Loomis, R.S.; Williams, W.A. 1963. Maximum Crop Productivity: An Estimate. *Crop Sci.* 3: 67–72.
- Lopes, M.A.; Larkins, B.A. 1991. Gamma-Zein Content is Related to Endosperm Modification in Quality Protein Maize. *Crop Sci.* 31: 1655–1662.
- Luque, S.F.; Cirilo, A.G.; Otegui, M.E. 2006. Genetic gains in grain yield and related physiological attributes in Argentine maize hybrids. *Field Crops Res.* 95: 383–397.
- Macke, J.A.; Bohn, M.O.; Rausch, K.D.; Mumm, R.H. 2016. Genetic Factors Underlying Dry-Milling Efficiency and Flaking-Grit Yield Examined in US Maize Germplasm. *Crop Sci.* 56: 2516–2526.
- Maddoni, G.A. 2012. Analysis of the climatic constraints to maize production in the current agricultural region of Argentina—a probabilistic approach. *Theor. Appl. Climatol.* 107: 325–345.
- MAIZAR. 2017. La cadena de maíz y la molienda. [en línea]. <http://www.maizar.org.ar/vertext.php?id=527>. [consulta: noviembre 2018]

- Martínez, R.D.; Cirilo, A.G.; Cerrudo, A.; Andrade, F.H.; Reinoso, L.; Valentinuz, O.R.; Balbi, C.N.; Izquierdo, N.G. 2017. Changes of starch composition by postflowering environmental conditions in kernels of maize hybrids with different endosperm hardness. *Eur. J. Agron.* 86: 71–77.
- Mayer, L.I.; Savin, R.; Maddonni, G.A. 2016. Heat Stress during Grain Filling Modifies Kernel Protein Composition in Field-Grown Maize. *Crop Sci.* 56: 1890–1903.
- Mazhar, H.; Chandrashekar, A. 1995. Quantification and distribution of kafirins in the kernels of sorghum cultivars varying in endosperm hardness. *J. Cereal Sci.* 21: 155–162.
- McMaster, G.S.; Wilhelm, W.W. 1997. Growing degree-days: one equation, two interpretations. *Agric. For. Meteorol.* 87: 291–300.
- Melchori, R.; Paparotti, O.F.; Paul, W, J. 1996. Diagnóstico de fertilización nitrogenada de maíz: Nitratos en pre-escardillada. INTA. EEA Paraná: Entre Ríos, Argentina. Serie Extensión N°11, pp.23-27
- Mercau, J.L.; Otegui, M.E. 2014. A modeling approach to explore water management strategies for late-sown maize and double-cropped wheat–maize in the rainfed Pampas region of Argentina. In: Ahuja, L.R.; Ma, L.; Lascano, R.J. (eds.), Practical applications of agricultural system models to optimize the use of limited water. ASA, SSSA, CSSA, Madison, WI, Advances in Agricultural Systems Modeling, 5 pp. 351-374
- Ministerio de Agroindustria. 2018. Estimaciones agrícolas [en línea]. <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/> [consulta: enero 2019].
- Mistrogino, D.; Valentinuz, O. 2004. Fertilización en maíz en siembra directa en suelos molisole y vertisoles de Entre Ríos. *Rev Cient Agrop* 8: 99–107.
- Monteith, J.L. 1972. Solar radiation and productivity in tropical ecosystems. *J. Appl. Ecol.*: 747–766.
- Orthofer, F.J.; Eastman, G.; List, P.J.; White, P.; Jhonson, L.A. 2003. Cor: composition, processing and utilization. In: White, P.; Jhonson, L.A. Corn: chemistry and technology. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. pp. 671–693
- Otegui, M.E.; Bonhomme, R. 1998. Grain yield components in maize: I. Ear growth and kernel set. *Field Crops Res.* 56(3): 247–256.
- Pagani, A.; Echeverría, H.E.; Andrade, F.H.; Sainz Rozas, H. R. 2009. Characterization of Corn Nitrogen Status with a Greenness Index under Different Availability of Sulfur. *Agron. J.* 101: 315–322.
- Paulis, J.W.; Bietz., J.A. 1986. Separation of alcohol-soluble maize proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Cereal Sci.* 4: 205–216.
- Paulsen, M.R.; Watson, S.A.; Singh, M. 2003. Measurement and maintenance of corn quality. In: White, P.; Jhonson, L.A. Corn: chemistry and technology. American Association of Cereal Chemists, Saint Paul, MN. pp. 159–219.

- Pomeranz, Y.; Hall, G.E.; Czuchajowska, Z.; Lai, F.S. 1986. Test weight, hardness, and breakage susceptibility of yellow dent corn hybrids. *Cereal Chem.* 63(4):349-351
- Pratt, R.C.; Paulis, J.W.; Miler, T.; Nelsen, T.; Bietz, J.A. 1995. Association of zein classes with maize kernel hardness. *Cereal Chem.* 72: 162–167.
- Prism 5 for Windows. 2009. 1992–2007© GraphPad Software Inc, San Diego, US.
- Ritchie, S.W.; Hanway, J.J.; Benson, G.O. 1989. How a corn plant develops. Iowa State University of Science and Technology: Ames, Iowa, Special Report; no. 48, 21p.
- Robutti, J.L.; Borrás, F.S.; Eyherabide, G.H. 1997. Zein Compositions of Mechanically Separated Coarse and Fine Portions of Maize Kernels. *Cereal Chem. J.* 74: 75–78.
- Robutti, J.L.; Borrás, F.S.; Ferrer, M.E.; Bietz, J.A. 2000. Grouping and Identification of Argentine Maize Races by Principal Component Analysis of Zein Reversed-Phase HPLC Data. *Cereal Chem.* 77: 91–95.
- Robutti, J.; Borrás, F.; Ferrer, M.; Percibaldi, M.; Knutson, C.A. 2000. Evaluation of Quality Factors in Argentine Maize Races. *Cereal Chem.* 77: 24–26.
- Rossi, G.; Calzada, J. 2015. Calculo del consumo de maíz en argentina. [en línea]. Bolsa de Cereales de Rosario, Rosario. <https://www.bcr.com.ar/Pages/Publicaciones/infoboletinsemanal.aspx?IdArticulo=1175> [consulta: enero 2019].
- Sabelli, P.A.; Larkins, B.A. 2009. The Development of Endosperm in Grasses. *Plant Physiol.* 149: 14–26.
- Sainz Rozas, H.; Echeverría, H.E.; Studdert, G.A.; Domínguez, G. 2000. Evaluation of the Presidedress Soil Nitrogen Test for No-Tillage Maize Fertilized at Planting. *Agron. J.* 92: 1176–1183.
- Shewry, P.R.; Halford, N.G. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot.* 53: 947–958.
- Soufizadeh, S.; Munaro, E.; McLean, G., Massignam, A.; van Oosterom, E.J.; Chapman, S.C.; Messina, C.; Cooper, M.; Hammer, G.L. 2018. Modelling the nitrogen dynamics of maize crops – Enhancing the APSIM maize model. *Eur. J. Agron.* 18: 268-287.
- Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill, New York.. 481p.
- Tamagno, S.; Borrás, L.; Greco, I.A. 2014 Fertilización nitrogenada y respuesta en rendimiento y calidad en maíces dentados y flint. En: Borrás, L. (ed.) Manejo eficiente del nitrógeno en Maíces Flint. Tecnigráfica, Rosario, Argentina. Pp: 19-27.
- Tamagno, S.; Greco, I.A.; Almeida, H.; Borrás, L. 2015. Physiological differences in yield related traits between flint and dent Argentinean commercial maize genotypes. *Eur. J. Agron.* 68: 50–56.

- Tamagno, S.; Greco, I.A.; Almeida, H.; Di Paola, J. C.; Ribes, F.M.; Borrás, L. 2016. Crop Management Options for Maximizing Maize Kernel Hardness. *Agron. J.* 108(4): 1561–1570.
- Tollenaar, M.; Daynard, T.B. 1982. Effect of source-sink ratio on dry matter accumulation and leaf senescence of maize. *Can. J. Plant Sci.* 62(4): 855–860.
- Tollenaar, M.; Lee, E.A. 2002. Yield potential, yield stability and stress tolerance in maize. *Field Crops Res.* 75(2): 161–169.
- Tsimba, R.; Edmeades, G.O.; Millner, J.P.; Kemp, P.D. 2013. The effect of planting date on maize: Phenology, thermal time durations and growth rates in a cool temperate climate. *Field Crops Res.* 150: 145–155.
- Uhart, S.A.; Andrade, F.H. 1991. Source-sink relationships in maize grown in a cool-temperate area. *Agronomie* 11(10): 863–875.
- Uhart, S.A.; Andrade, F.H. 1995. Nitrogen deficiency in maize: I. Effects on crop growth, development, dry matter partitioning, and kernel set. *Crop Sci.* 35(5): 1376–1383.
- Wallace, J.C.; Lopes, M.A.; Paiva, E.; Larkins, B.A. 1990. New Methods for Extraction and Quantitation of Zeins Reveal a High Content of γ -Zein in Modified opaque-2 Maize. *Plant Physiol.* 92(1): 191–196.
- van Wart, J.; Grassini, P.; Cassman, K.G. 2013. Impact of derived global weather data on simulated crop yields. *Glob. Change Biol.* 19(12): 3822–3834.
- Woo, Y.M.; Hu, D.W-N.; Larkins, B.A.; Jung, R. 2001. Genomics Analysis of Genes Expressed in Maize Endosperm Identifies Novel Seed Proteins and Clarifies Patterns of Zein Gene Expression. *Plant Cell* 13(10): 2297–2317.
- WU, Y.V. 1992. Corn hardness as related to yield and particle size of fractions from a micro hammer-cutter mill. *Cereal Chem.* 69: 343–347.
- Yang, H.; Grassini, P.; Cassman, K.G.; Aiken, R.M.; Coyne, P.I. 2017. Improvements to the Hybrid-Maize model for simulating maize yields in harsh rainfed environments. *Field Crops Res.* 204: 180–190.
- Yuan, J.; Flores, R.A. 1996. Laboratory Dry-Milling Performance of White Corn: Effect of Physical and Chemical Corn Characteristics. *Cereal Chem* 73(5), 574-578