



*Universidad Nacional de Córdoba*  
*Facultad de Ciencias Agropecuarias*  
*Escuela para Graduados*

---



# **Estudio comparativo de *Cold Test* con dos métodos rápidos de vigor en poblaciones de híbridos de maíz templado y subtropical**

**María Belén Aranguren**

Tesis

Para optar al Grado Académico de  
Magister en Ciencias Agropecuarias  
Mención: Tecnología de Semillas

Córdoba, 2023

# **Estudio comparativo de *Cold Test* con dos métodos rápidos de vigor en poblaciones de híbridos de maíz templado y subtropical**

**María Belén Aranguren**

## **Comisión Asesora de Tesis:**

**Directora:** Ing. Agr. (Dra.) Miriam Raquel Arango Perearnau

**Codirector:** Ing. Agr. (Dr.) Juan Argüello

**Asesor:** Ing. Agr. (MSc.) César Agüero

## **Tribunal Examinador de Tesis**

Ing. Agr. (Dr.) Pablo Mansilla .....

MSc. Roque Guillén .....

Ing. Agr. (MSc.) César Agüero .....

## **Presentación Formal Académica**

21 de diciembre de 2023

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

## AGRADECIMIENTOS

- A las autoridades de la Escuela de Graduados de la UNC por su constante soporte y acompañamiento durante la ejecución de esta tesis.
- A la empresa Corteva Agriscience Argentina, por la disponibilidad de materiales, recursos y el uso de instalaciones para llevar a cabo este trabajo.
- Al Dr. Juan Alberto Argüello, por su dedicada, generosa y paciente dirección científica, constante estímulo y gratos momentos compartidos durante este aprendizaje.
- A la Dra. Miriam Raquel Arango Perearnau, por sus valiosas contribuciones, su mirada pragmática y soporte técnico durante las etapas críticas de este trabajo.
- Al MSc. César Agüero, parte de la Comisión asesora de Tesis, por su excelente disposición a colaborar en mi trabajo de Tesis.
- A la Dra. Paula Bima por su gentileza y calidez humana durante esta etapa final de mi maestría, así como por su soporte con la actualización de mi currículum en el sistema Guaraní.
- A la Ing. Agr. Alejandra Cuatrín por su acompañamiento, oportunas intervenciones, innovación, sugerencias y guía durante el análisis estadístico de la información obtenida.

## DEDICATORIA

- *A Marcelo, mi compañero de vida, por estar siempre presente.*
- *A mis hijos, Mauro, Victoria, Valentina y Lucas por el futuro de sus vidas.*
- *A la memoria de Loly y Eduardo, mis padres, por el estímulo constante y los valores recibidos.*
- *A Domingo, y a la memoria de Elba, mis suegros, por su apoyo incondicional.*

## RESUMEN

La producción y utilización de semillas de alta calidad resultan ser clave para el éxito de la producción de los cultivos. Por ello, los programas de control de calidad de la industria de semillas deben ser versátiles y dinámicos, proporcionando resultados precisos de manera oportuna. Una de las dificultades que se presenta es la falta de pruebas rápidas validadas de evaluación de calidad de semilla que permitan tomar decisiones en el corto plazo. En tal sentido, la prueba de Frío comúnmente llamada *Cold Test* (CT) insume un período largo de tiempo para determinar el vigor (entre 14 y 12 días). El objetivo de este trabajo fue identificar una prueba de vigor en híbridos de maíz de germoplasma subtropical y templado que permita evaluar la calidad fisiológica en menor tiempo que CT, y de manera comparable con éste, para la toma rápida de decisiones. Se evaluaron las pruebas de vigor de Emergencia de Radícula (ER) a 66 h y 144 h y la Prueba de Inmersión en Agua (PIA) a 10 °C y 25 °C. Las evidencias experimentales demostraron que las poblaciones de híbridos de maíz de germoplasma templado y subtropical tuvieron un nivel de respuesta diferente ante el estrés generado por el método de CT. En los híbridos subtropicales, este método generó un estrés mayor que en la población de híbridos templados. En estos últimos, el nivel de respuesta al CT fue mejor ya que posee mecanismos fisiológicos moleculares adaptativos, lo que permitiría que sea utilizado como predictor de emergencia a campo. Por otro lado, se demostró que la ER, en general, subestima los valores en la población de germoplasma subtropical, lo que explica lo restrictivo de esta prueba para ese tipo de materiales. En cambio, en las poblaciones de materiales templados, permite discriminar más categóricamente. Estos hallazgos indican el valor condicional que tiene el ER como prueba de evaluación de calidad. Ninguno de los métodos de vigor alternativos incluidos en este trabajo admiten un reemplazo directo de la prueba de CT. Sin embargo, y a los fines de determinar el método de vigor más rápido, fácil de estandarizar y con un resultado más ajustado (mayor concordancia y correlación) a la prueba de CT, se identifica a la PIA a 25 °C para ambos germoplasmas. Además, tiene la ventaja de ser más rápida ya que logra resultados a los 8 días en comparación con los 12 días que requiere la prueba de CT.

**Palabras clave:** Emergencia de Radícula, Prueba de Inmersión en Agua, Germoplasma de maíz, Calidad de semilla de maíz.

## ABSTRACT

The production and use of high-quality seeds turns out to be a key for crop production success. Therefore, seed industry quality control programs must be versatile and dynamic, providing accurate results in a timely manner. One of the difficulties is the lack of validated rapid seed quality evaluation tests that allow short term decisions. The Cold Test (CT) takes a long time to determine vigor (between 14/12 days) which does not allow for speed that seed production system needs. The objective of this work was to identify a vigor test in corn hybrids from subtropical and temperate germplasm that allows quality to be evaluated quicker than CT, and in a comparable manner with it, for rapid decision making. Two main vigor tests were used: Radicle Emergence at 66 (ER 66) and 144 h (ER 144) and Soak at 10 °C (PIA10) and 25 °C (PIA25). Experimental evidence demonstrated that populations of maize hybrids from temperate and subtropical germplasm had a different level of response to the stress generated by CT method. In subtropical hybrids, this method generated greater stress than in the temperate hybrid population. For temperate hybrids, the level of response to CT was better since it has adaptive molecular physiological mechanisms, which would allow it to be used as a predictor of field emergence. On the other hand, it was shown that ER generally underestimates vigor in subtropical germplasm population, which explains the restrictiveness of this test for this type of materials. On the other hand, in populations of tempered materials, it allows for more categorical discrimination. These findings indicate the conditional value that ER has as a quality assessment test. None of the alternative vigor methods included in this work support a direct replacement for the CT test. However, to determine the fastest vigor method, easy to standardize and with a more adjusted result (greater agreement and correlation) to CT test, PIA25 is identified for both germplasms. In addition, it has the advantage of being faster since it achieves results in 8 days compared to the 12 days required by CT test.

**Keywords:** Radicle emergence, Soak test, Corn germplasm, Corn seed quality.

# TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág</b>
LISTA DE TABLAS .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XII
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	XIII
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>1</b>
Introducción .....	1
Objetivo general .....	6
Objetivos específicos .....	6
Bibliografía .....	7
<b>CAPÍTULO 2: GERMINACIÓN Y VIGOR POR <i>COLD TEST</i> EN POBLACIONES DE SEMILLAS DE MAÍZ TEMPLADO Y SUBTROPICAL</b> .....	<b>10</b>
Introducción .....	10
Materiales y Métodos .....	14
Material Biológico .....	14
Prueba de Germinación .....	15
Prueba de <i>Cold Test</i> .....	16
Análisis Estadístico .....	17
Resultados y discusión .....	17
Conclusión .....	22
Bibliografía .....	22

**CAPÍTULO 3: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA PRUEBA DE VIGOR DE EMERGENCIA DE RADÍCULA Y *COLD TEST* EN POBLACIONES DE MAÍZ DE GERMOPLASMA TEMPLADO Y SUBTROPICAL** ..... 25

Introducción ..... 25

Materiales y Métodos ..... 27

Material Biológico ..... 27

Prueba de *Cold Test* ..... 27

Prueba de Emergencia de Radícula ..... 27

Análisis estadístico ..... 28

Resultados y discusión ..... 29

Conclusión ..... 34

Bibliografía ..... 34

**CAPÍTULO 4: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA PRUEBA DE INMERSIÓN EN AGUA, EMERGENCIA DE RADÍCULA Y *COLD TEST* EN POBLACIONES DE MAÍZ DE GERMOPLASMA TEMPLADO Y SUBTROPICAL**..... 36

Introducción ..... 36

Materiales y Métodos ..... 38

Material Biológico ..... 38

Prueba de Germinación ..... 38

Prueba de *Cold Test* ..... 38

Prueba de Emergencia de Radícula ..... 38

Prueba de Inmersión en Agua ..... 38



Análisis estadístico .....	39
Resultados y discusión .....	40
Conclusión .....	47
Bibliografía .....	47
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>49</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Resultados en porcentaje de los análisis de la Prueba de Germinación (PG) y Cold Test (CT) obtenidos de 50 lotes de híbridos de germoplasma templado y 50 lotes de híbridos de germoplasma subtropical. ....	18
Tabla 2.2. Medidas estadísticas descriptivas de posición y dispersión de los porcentajes de Germinación y <i>Cold Test</i> (vigor) obtenidos para los lotes de híbridos de maíz de germoplasmas templado y subtropical. ....	19
Tabla 2.3. Promedios de Germinación y Cold Test (vigor) discriminadas por rango de % de Plántulas normales obtenidos para los lotes de híbridos de maíz de germoplasmas templado y subtropical. ....	20
Tabla 3.1. Resultados en porcentaje de los análisis de Cold Test (CT), Emergencia de Radícula a 66 horas (ER 66) y a 144 horas (ER 144) obtenidos de 50 lotes de híbridos de germoplasma templado y 50 lotes de híbridos de germoplasma subtropical. Se incluyen características físicas de los lotes respecto a su forma chata (C) o redonda (R) y a su tamaño grande (G) o pequeño (P). ....	30
Tabla 3.2. Coeficiente de correlación de concordancia de Lin y sus intervalos de confianza entre las pruebas CT/ER 66 y CT/ER 144 para germoplasma templado y subtropical. ....	31
Tabla 3.3. Valores de concordancia entre los métodos de CT/ER 66 y CT/ER 144 para germoplasmas templados y subtropicales (Análisis de Bland-Altman) .....	31
Tabla 4.1. Resultados en porcentaje de los análisis de Germinación (PG), Cold Test (CT), Prueba de Inmersión a 10°C (PIA10), Prueba de Inmersión a 25°C (PIA25), Emergencia de Radícula a 66 horas (ER 66) y a 144 horas (ER 144) obtenidos de 50 lotes de híbridos de germoplasma templado y 50 lotes de híbridos de germoplasma subtropical, incluyendo los promedios generales por germoplasma. Se añaden características físicas de los lotes respecto a su forma chata (C) o redonda (R) y a su tamaño grande (G) o pequeño (P) .....	41

Tabla 4.2. Coeficiente de correlación de concordancia de Lin entre CT/PIA10 y CT/PIA25 para germoplasma templado y subtropical .....	42
<u>Tabla 4.3. Estadísticos del análisis de Bland-Altman para CT/PIA10 y CT/PIA25, para germoplasma templado y subtropical, incluyendo el error estándar y los intervalos de confianza del promedio de la diferencia .....</u>	<u>42</u>
Tabla 4.4. Porcentaje de la variación total explicada por cada componente principal del análisis multivariado sobre 6 métodos de análisis y germoplasma, forma y tamaño de semillas (como variables suplementarias) en 100 lotes de maíz híbrido .....	45
Tabla 4.5. Coeficiente de correlación de la prueba de Cold Test (CT) con los métodos de Germinación (PG), Prueba de Inmersión a 10°C (PIA10), Prueba de Inmersión a 25°C (PIA25), Emergencia de Radícula a 66 horas (ER 66) y a 144 horas (ER 144) obtenido de los resultados de 100 lotes de maíz híbrido y segregado por germoplasmas (50 lotes de híbridos de germoplasma templado y 50 lotes de híbridos de germoplasma subtropical) .....	46

## LISTA DE FIGURAS

- Figura. 2.1. Diagrama de dispersión de la calidad medida como porcentaje de Germinación y vigor determinados con el análisis de Germinación (Germ.) y Cold Test (CT) respectivamente, en 100 lotes de semilla híbrida de maíz según tipo de germoplasma e intervalo de confianza del 95% para las medias de cada grupo de datos (Mann Whitney) ..... 21
- Figura 3.1. Diagrama de Bland-Altman para los datos de vigor obtenidos por los métodos de CT/ER 66 Y CT/ER 144 en germoplasmas templados y subtropicales. En línea punteada, el promedio de las diferencias ( $\bar{d}$ ), los límites de concordancia inferior y superior. Representación de los límites del intervalo de confianza para el promedio de las diferencias (en azul), límites de concordancia inferior (en rosa) y superior (en verde) ..... 32
- Figura 4.1. Diagramas de Bland-Altman para los datos de vigor obtenidos por los métodos de CT/PIA10 y CT/PIA25 para germoplasma templado y subtropical. En línea punteada, el promedio de las diferencias ( $\bar{d}$ ) y los límites de concordancia inferior y superior, con la representación de los límites del intervalo de confianza para el promedio de las diferencias (sombreado en azul) y límites de concordancia inferior (sombreado en rosa) y superior (sombreado en verde) ..... 43
- Figura 4.2. Representación gráfica de los análisis de Germinación, vigor, forma y tamaño de semilla en función de la CP1 y CP2 ..... 45

## LISTA DE ABREVIATURAS Y/O SÍMBOLOS

°C	Grado Celsius
cm	Centímetro
CT	<i>Cold Test</i>
$\bar{d}$	Promedio de las diferencias
ER	Emergencia de radícula
ER 66	Emergencia de radícula de 66 horas de duración
ER 144	Emergencia de radícula de 144 horas de duración
g	Gramo
H	Hora/s
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> – Proteína de choque térmico
Kg	Kilogramo
Mean	Media estadística
MGT	<i>Mean germination time</i> – Tiempo medio de germinación
ml	Mililitro
MPa	Megapascal
PG	Prueba de Germinación
PIA	Prueba de Inmersión en Agua
PIA10	Prueba de Inmersión en Agua a 10°C
PIA25	Prueba de Inmersión en Agua a 25°C
%	Porcentaje
SSAA	<i>Saturated Salt Accelerated Aging</i> - Envejecimiento acelerado con sal saturada
Std Dev	Desvío estándar

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El maíz (*Zea mays* L.) es un cultivo originario de América. Probablemente fue domesticado en un área limitada, pero sus características cambiaron radicalmente por incorporación de genes de especies emparentadas silvestres y/o por acción de diferente presión de selección en diversas regiones a medida que se dispersó del centro de origen (Eyhérbide, 2015). En definitiva, aún no se conocen formas silvestres del maíz, por lo que todavía los científicos debaten sobre los ancestros de este cultivo habiendo formulado diversas teorías sobre su origen (Mangelsdorf, 1974). Así mismo, Bracco (2012) determinó que la comparación entre las razas del NEA y del NOA de nuestro país, apoyan la existencia de dos centros de diversidad diferentes en Sudamérica. Esta autora menciona que la comparación con otras razas del Continente Americano avala la hipótesis de ocurrencia de una vía de introducción del germoplasma nativo del NEA a través del este de Sudamérica.

En este punto, es conveniente considerar que, en Argentina, el maíz se cultiva en diferentes regiones agroecológicas, con un amplio gradiente de precipitaciones y dos mega ambientes diferenciados por su latitud. Al norte del Paralelo 30 Sur predominan los ambientes de tipo subtropical, mientras que, al sur de este, el ambiente es similar al de otras regiones templadas del mundo. Estas variaciones son importantes ya que determinan el tipo de germoplasma a sembrar y las tecnologías de manejo apropiadas (Presello *et al.*, 2022). Dicho trabajo indica además que, al norte del Paralelo 30 Sur, se recomienda el uso de germoplasma subtropical, mientras que al sur de este, se adaptan mejor los materiales genéticos con germoplasma templado. Además, plantea que existe una “interfase” en las proximidades a este paralelo en los que se pueden utilizar cruza entre maíces templados y subtropicales. Por su parte, Rattalino Edreira y Otegui (2013) afirman que los maíces templados y tropicales difieren en sus tolerancias al estrés por calor, pero las bases ecofisiológicas para las diferencias genotípicas son pobremente entendidas. Estudios realizados en maíces templados, tropicales y sus cruza, respecto a las diferencias genotípicas en los determinantes ecofisiológicos del rendimiento de grano indicaron que el

trasfondo genético tropical no penalizó el potencial de rendimiento y confiere una mayor capacidad de soportar los efectos del calor (Rattalino Edreira y Otegui, 2012). Consecuentemente, tampoco se menciona la existencia de un comportamiento diferencial vinculado a la calidad fisiológica de las semillas entre ambos germoplasmas. Por tal motivo, se considera relevante analizar si existe una diferencia en comportamiento de calidad entre los materiales templados y subtropicales.

En la actualidad, el maíz es el cultivo más importante en términos de volumen producido en el mundo y sus características únicas lo han convertido en un cultivo valioso a lo largo de la historia (Ruiz Ruiz, 2018). Su importancia radica, según lo menciona Ruiz Ruiz (2018), en su valor nutricional, ya que es un grano básico para la alimentación con el aporte de carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales indispensables en la dieta alimenticia. Esta autora indica que el maíz es de importancia económica como materia prima de muchos productos industriales; éstas pueden ser algunas de las razones por las cuales la demanda va en crecimiento, tanto para su uso como maíz forrajero como para el consumo humano y para el uso industrial. De hecho, el maíz es hoy uno de los cultivos más relevantes en Argentina. El área de siembra ha aumentado en forma sostenida durante los últimos diez años alcanzando una superficie de 7,4 millones de hectáreas entre 2020 y 2021, con una producción de 60,5 millones de toneladas de grano (Presello *et al.*, 2022). En la campaña 2022/2023, la superficie de maíz aumentó a 8,5 millones de hectáreas en Argentina (Bolsa de Comercio de Rosario, 2023).

En este contexto, la producción y utilización de semillas de alta calidad resultan ser clave para el éxito de la producción de los cultivos. Por ello, los programas de control de calidad de la industria de semillas deben ser versátiles y dinámicos, proporcionando resultados precisos de manera oportuna (França-Neto y Krzyzanowski, 2019). Cabe mencionar aquí que, desde el punto de vista botánico, el grano de maíz es un fruto seco indehisciente con una sola semilla, donde el tegumento se encuentra fuertemente adherido al fruto, llamado cariopse (Arango Perearnau, 2018), pero a los efectos de la calidad de semilla, se va a denominar “semilla” en el presente trabajo.

En el sistema de producción de semillas, la post cosecha constituye una etapa de suma importancia para la obtención de bolsas comerciales de calidad. En ese momento, una de las dificultades es la de no disponer de pruebas rápidas validadas de evaluación de calidad de

semilla que permitan tomar decisiones en el corto plazo. En tal sentido, la prueba de Frío comúnmente llamada *Cold Test* (CT) insume entre 14 y 12 días para determinar el vigor y éste es un período largo de tiempo, que no permite dar la celeridad que el sistema de producción de semillas necesita. Consecuentemente, es necesario identificar otras pruebas de vigor que sean más rápidas para la toma de decisiones, pero tan eficientes como el CT.

En este sentido, el desarrollo de métodos rápidos y precisos para estimar la calidad fisiológica de las semillas ha sido estudiado por fisiólogos y tecnólogos de semillas durante muchos años, principalmente a principios del siglo XX, cuando se establecieron las primeras etapas de la producción organizada de semillas, inicialmente en países europeos (França-Neto y Krzyzanowski, 2019). Con relación a los procesos fisiológicos, Cruz-Pérez et al. (2003) plantean que las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas durante la germinación de la semilla permiten la identificación de los factores involucrados en el control de la germinación y del establecimiento del cultivo. En este aspecto y en relación con el deterioro de la semilla, causado por el envejecimiento natural o artificial, disminuye la germinación, la velocidad de crecimiento de la planta, y la tolerancia a condiciones adversas. Tales efectos están asociados con cambios en el metabolismo a través de procesos bioquímicos, como la actividad metabólica durante las primeras horas de germinación, que se ha correlacionado con la germinación final y el vigor de la semilla (Anderson, 1973). Por otra parte, los síntomas de la semilla deteriorada incluyen: crecimiento bajo o anormal, pérdida de compuestos solubles debido a una excesiva permeabilidad de la membrana, reducción de la actividad enzimática, y producción de sustancias tóxicas como ácidos grasos libres (Anderson, 1973). Al respecto, las pruebas de vigor en general permiten detectar el grado de deterioro que presentan los lotes de semillas. Esto se puede resumir como un conjunto de factores que producen distintos tipos de alteraciones de origen físico, fisiológico y bioquímico, que tienen lugar durante toda la vida de la semilla dependiendo de las condiciones adversas a las que estuvo expuesta (Arango Perearnau, 2018). A pesar de que no hay una definición de vigor universalmente aceptada, existe consenso general en el sentido de considerarlo como el factor más importante de la calidad de la semilla (Navarro et al., 2015).

Desde siempre, las empresas semilleras han utilizado las pruebas de vigor como herramienta interna para clasificar los distintos lotes en función de la calidad fisiológica y



decidir los destinos de la producción, tanto para la siembra como para la conservación y comercialización (Marcos-Filho, 2015; Navarro *et al.*, 2015). De hecho, Arango Perearnau (2018) sostiene que los distintos métodos de vigor se utilizan para identificar calidades fisiológicas diferentes y, especialmente, poner de manifiesto las debilidades del lote. Por ello, dicha autora menciona que es importante la correcta interpretación de los resultados de las diferentes pruebas de vigor empleadas, porque es en base a ellos que se deberá hacer un diagnóstico del lote de semillas y se decidirá el destino de este. En este sentido, la interpretación del porcentaje de vigor se hace en base a probabilidades. Esto significa que, por ejemplo, en un lote con un 80% de vigor, el 80 % de sus semillas tienen mayor probabilidad de germinar y producir plántulas normales en condiciones similares a las del estrés que se aplicó en la prueba. Además, cada prueba de vigor evalúa diferentes aspectos fisiológicos de las semillas/frutos que brindan información valiosa para la toma de decisiones (Arango Perearnau, 2018).

En relación con el *Cold Test* (CT), es una de las pruebas de vigor más antigua (Isely, 1950; Hoppe, 1956 citados en Hampton y TeKrony, 1995) y continúa siendo en la actualidad la más utilizada en la industria de semillas de maíz para casi todos los lotes de semillas vendidos en América del Norte y Europa (Hampton y TeKrony, 1995). De hecho, la mayoría de las empresas de maíz híbrido conducen sus propias versiones de esta prueba (Burris y Navratil, 1979). Desde la década de los años 50 y hasta la actualidad, han sido numerosas las variantes que se han practicado en esta técnica con respecto al tipo de sustrato utilizado, diferentes temperaturas y tiempos de estrés. Todo esto ha llevado que no haya un acuerdo generalizado en la técnica que permita hacer comparables los resultados y que sirva de herramienta para posibles reclamos de calidad (Burris y Navratil, 1979; Craviotto, *et al.*, 1992; Gutormson, 1995; Nijenstein, 1995; Caseiro y Marcos Filho, 2000; Caseiro y Marcos Filho, 2002; Lovato y Balboni, 2003; Nafziger, 2003; Lovato *et al.*, 2005; Marcos-Filho, 2015; Navarro *et al.*, 2015). Esto ha conducido a que la prueba de CT aún no se haya estandarizado y, por ende, no esté incorporado al Capítulo de vigor de las Reglas ISTA (2021).

Por otra parte, según Bowden y Landais (2018), se ha demostrado que la prueba de Emergencia de Radícula (ER) da resultados que son reproducibles en todos los laboratorios (Powell *et al.*, 2014; Powell y Mavi, 2016) y que predice la emergencia en el campo

(Matthews *et al.*, 2012). Asimismo, Arango Perearnau (2018) menciona que la prueba de ER reúne características valiosas y deseables en todo ensayo de vigor: a) es rápida, ya que el resultado puede estar disponible después de 30 horas, dependiendo de la especie que se trate; b) es económica, ya que solo se requiere el equipamiento necesario para conducir una prueba de Germinación y c) es fácil o sencilla de llevar a cabo. En función de lo precedente es claro pensar que la técnica de ER, para el caso de maíz, puede plantearse como una alternativa posible de evaluación rápida y puede acortar los tiempos de diagnóstico de vigor respecto de la prueba de CT.

Además, Arango Perearnau (2018) estudió otras técnicas como la Prueba de Inmersión en Agua (PIA), la cual es una alternativa para simular condiciones de inundación y anaerobiosis para la semilla. Las semillas sumergidas en el agua a diferentes temperaturas sufren daños por la rápida entrada de agua a las células. Esto se debe a la diferencia del potencial hídrico entre las semillas secas y el medio en el cual se encuentran, pudiendo aumentar en la fase de imbibición de -400 MPa a -1 MPa y de esta manera, se produce una considerable entrada de agua e induce un cambio del metabolismo aeróbico hacia el metabolismo fermentativo (Crawford, 1978; Castro *et al.*, 2004). De esta manera, las semillas/frutos que posean algún daño tendrán una menor disponibilidad de energía para el proceso de la germinación, lo que resulta en un menor vigor (Richard *et al.*, 1991). Existen gran cantidad de investigaciones donde se ha utilizado este tipo de estrés (Popinigis, 1985; Dantas, *et al.*, 2000; Goggi, *et al.*, 2008). Además, en numerosos trabajos se ha estudiado el efecto de la inmersión en agua a diferentes temperaturas y tiempos de imbibición sobre la germinación y el vigor en distintas especies como en maíz (Dantas *et al.*, 2000; Méndez-Natera, *et al.*, 2007; Grzybowski, 2012); en poroto (Custódio *et al.*, 2002, 2009; Bertolin, 2010) y en soja (Arango Perearnau *et al.*, 2010; Theodoro, 2013). Los mencionados autores indicaron que aquellos lotes que muestran una mayor producción de plántulas normales luego de la ejecución de la PIA tendrán mayor capacidad de soportar el estrés y, por ende, podrán clasificarse como de mayor vigor. Es una técnica interesante porque reúne características de economía, sencillez y relativa rapidez, aunque tampoco está estandarizada por ISTA.

Con relación a esto, Arango Perearnau (2018) plantea que la PIA es un ensayo que reúne las características generales que se le pide a toda prueba de vigor, que son las de ser

rápida, económica, sencilla y fácil de realizar. Esta prueba no requiere el uso de ningún tipo de producto químico ni equipos costosos. Sólo se sumergen las semillas de maíz en agua corriente de canilla con pH neutro a diferentes temperaturas y por un determinado período de tiempo. El fundamento de la prueba es someter a las semillas a un estrés de hipoxia y luego se conduce una prueba de germinación estándar. Los lotes que logran producir un mayor porcentaje de plántulas normales, luego del estrés, presentan un mejor vigor.

En base a lo mencionado, se planteó la hipótesis de que las pruebas de Emergencia de Radícula (ER) y de Inmersión en Agua (PIA) son técnicas rápidas, económicas y sencillas de evaluación de vigor, que pueden reemplazar a la tradicional técnica del *Cold Test* (CT) y acortar los tiempos de análisis en germoplasmas de maíz templado y subtropical.

Por otro lado, y en función del análisis realizado, se plantea una segunda hipótesis respecto a que la respuesta al CT depende de la naturaleza del germoplasma de los híbridos de maíz, determinándose una mayor sensibilidad para los provenientes de germoplasma subtropical.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Identificar una prueba de vigor en poblaciones de híbridos de maíz de germoplasma subtropical y templado que permita evaluar la calidad fisiológica en períodos de tiempo menores que el CT, y de manera comparable con éste, para la toma rápida de decisiones.

### **ESPECÍFICOS**

- Evaluar el comportamiento de los diferentes germoplasmas en términos de la prueba de Germinación.
- Evaluar el vigor con la técnica de CT como medida de referencia de la calidad fisiológica de la semilla en los germoplasmas en estudio.
- Evaluar a la prueba de Emergencia de radícula como sustituta de la prueba de CT y su nivel de respuesta en ambos germoplasmas.

- Evaluar a la prueba de Inmersión en Agua como reemplazante de la prueba de CT y su nivel de respuesta en ambos germoplasmas.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, J. D. 1973. Metabolic changes associated with senescence. *Seed Science & Technology* **1**: 401-416.
- ARANGO PEREARNAU M. R.; GALLO, C.; CRAVIOTTO, R. M. 2010. Prueba de inmersión como indicador de vigor en semillas de soja. XXII Seminario Panamericano de Semillas. Asunción del Paraguay. En: Actas del congreso.
- ARANGO PEREARNAU, M. R. 2018. Caracterización de la calidad de lotes de maíz (*Zea mays* L.) para su uso como simiente a través de ensayos fisiológicos y bioquímicos. Tesis Doctoral en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario.
- BOLSA DE COMERCIO DE ROSARIO. 2023. Superficie sembrada de maíz en Argentina en campaña 2022/2023. Publicado en internet, disponible en [Estimaciones | Bolsa de Comercio de Rosario \(bcr.com.ar\)](https://www.bcr.com.ar/estimaciones)
- BERTOLIN, D. C. 2010. Teste de alagamento, deterioração controlada e envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de sementes de feijão. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção. 112 pp.
- BOWDEN, L.; LANDAIS, L. 2018 The impact of light and high light on seed germination and the radicle emergence test. *Seed Science & Technology* **46** (3):465,471.
- BRACCO, M. 2012. Caracterización genética del germoplasma de razas de maíz autóctonas provenientes del noreste argentino. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n5208](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5208) Bracco
- BURRIS, J. S.; NAVRATIL, R. J. 1979. Relationship Between Laboratory Cold-Test Methods and Field Emergence in Maize Inbreds. *Agronomy Journal*, **71**: 985-988
- CASEIRO, R. F.; MARCOS FILHO, J. 2000. Métodos alternativos do teste de frio para avaliação do vigor de sementes de milho. *Scientia Agrícola*, **57**(3): 110-117. Disponible en: <http://www.scielo.br>
- CASEIRO, R. F.; MARCOS FILHO, J. 2002. Procedimiento para condução do teste de frio em sementes de milho: pre resfriamento e distribuição do substrato no interior da câmara fria. *Revista Brasileira de Sementes*, **24** (2): 53-56. Disponible en: <http://www.scielo.br>.
- CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Ed.). *Germinação: Do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 9: 146-162.
- CRAVIOTTO, R. M.; CASTELLARIN, J. M.; PEDROL, H. M. 1992. Utilización de una Prueba de Frío modificada para la evaluación de germinación en maíz (*Zea mays* L.) XIV Seminario Panamericano de Semillas, 19-23 de octubre 1992, Santa Cruz de la Sierra (Bolivia). p. 15-19.
- CRAWFORD, R. M. M. 1978. Metabolic adaptations to anoxia. In: Hook, D.D.; Grawford, R.M.M. (Ed.). *Plant life in anaerobic environments*. Ann Arbor, Ann Arbor Sciences, p. 119-136.
- CUSTÓDIO, C. C.; MACHADO NETO, N. B.; ITO, H. M.; VIVAN, M. R. 2002. Efeito da submersão em agua de sementes de feijão na germinação e no vigor. *Revista Brasileira de Sementes*, **24** (2): 49-54.
- DANTAS, B. F.; ARAGÃO, C. A.; CAVARIANI, C. A.; NAKAGAWA, J.; RODRIGUES, J. D. 2000. Efeito da duração e da temperatura de alagamento na germinação e no vigor de sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes*, **22** (1): 88-96.
- EYHÉRABIDE, G. 2015. Bases para el manejo del cultivo de maíz. ISBN: 978-987-679-141-0.

- FRANÇA-NETO, J. D. B.; KRZYŻANOWSKI, F. C. 2019. Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science*, **41**, 359-366.
- GOGGI, A. S.; CARAGEA, P.; POLLAK, L.; McANDREWS, G.; DeVRIES, M.; MONTGOMERY, K. 2008. Seed quality assurance in maize breeding programs: Tests to explain variations in maize inbreds and populations. *Agronomy Journal*, **100** (2): 337-343.
- GRZYBOWSKI, C. R. S. 2012. Respostas de sementes de milho a testes alternativos de vigor. Tesis Mestre en Ciências. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 46 pp.
- GUTORMSON, T. J. 1995. Soil Cold Test – USA Perspective. Vigour Test Committee. Seed Vigour Testing Seminar. Copenhagen, Denmark. Ed. H. A. van der Venter. ISTA p. 29-33.
- HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D.M. 1995. Handbook of Vigour Test Methods. ISTA Vigour Test Committee. 3er. Edition. 117 pp
- HOPPE, P. E. 1956. Correlation between corn germination in laboratory cold tests and stand in the field. *Plant Disease Reporter*, **40**. p. 887-889.
- ISELY, D. 1950. The cold test for corn. *Proceedings of International Seed Testing Association*, **16**: 299-311.
- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2021. International Rules for Seed Testing. Zurich. 300 pp.
- LOVATO, A.; BALBONI, N. 2003. Seed Vigour in Maize (*Zea mays* L.): Two-Year Laboratory and Field Test Compared. *Italian Journal Agronomy*, **1** (1) :1-6.
- LOVATO, A.; NOLI, E.; LOVATO, A. F. S. 2005. The relationship between cold test temperatures, accelerated ageing test and field emergence of maize seed. *Seed Science & Technology*, **33**(1): 249-253.
- MANGELSDORF, P. C. 1974. Corn: Its origin. Evolution and improvement. The Belknap Press of Harvard University. Cambridge. Massachussets. 262 p.
- MARCOS FILHO, J. 2015. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia agricola*, **72**, 363-374.
- MATTHEWS, S.; WAGNER, M.; KERR, L.; MCLAREN, G.; POWELL, A. A. 2012. Automated determination of germination time courses by image capture and early counts of radicle emergence lead to a new vigour test for winter oilseed rape (*Brassica napus*). *Seed Science and Technology*, **40**, 413-424. <https://doi.org/10.15258/sst.2012.40.3.12>
- MÉNDEZ-NATERA, J. R.; YSAVIT-MARCANO, L.; MERAZO-PINTO, J. F. 2007. Efecto de la inmersión de semillas de maíz (*Zea mays* L.) en agua a 100 °C sobre la germinación y crecimiento de plántulas bajo condiciones de laboratorio. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **10** (2): 56-64.
- NAFZIGER, E. D. 2003. Chapter 9. Seed. Disponible en: [http://iah.aces.uiuc.edu/pdf/Agronomy\\_HB/09chapter.pdf](http://iah.aces.uiuc.edu/pdf/Agronomy_HB/09chapter.pdf).
- NAVARRO, M.; FEBLES, G.; HERRERA, R. S. 2015. Vigor: essential element for seed quality. *Cuban Journal of Agricultural Science*, **49**(4).
- NIJENSTEIN, J.H. 1995. Cold Test – European Perspective. Vigour Test Committee. Seed Vigour Testing Seminar Copenhagen, Denmark. Ed. H. A. van de Venter. ISTA. p. 34-52.
- POPINIGIS, F. 1985. Fisiología de Sementes. Brasília: Agriplan. 289 pp.
- POWELL, A. A.; MATTHEWS, S.; KERR, L.; MCLAREN, G.; WAGNER, M. 2014. Early counts of radicle emergence as a vigour test for oil seed rape. Method Validation Report for The International Rules for Seed Testing 2015, pp. 42-50, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
- POWELL, A. A.; MAVI, K. 2016. Application of the radicle emergence test to radish (*Raphanus sativus*) seed. Method Validation Report for The International Rules for Seed Testing 2016, pp. 65-72, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
- PRESELLO, D. A.; GIMÉNEZ, F. J.; FERRAGUTI, F. J. 2022. La Producción de maíz en Argentina. *ACI Avances En Ciencias E Ingenierías*, **14**(1). <https://doi.org/10.18272/aci.v14i1.2573>

- RATTALINO EDREIRA, J. I.; OTEGUI M. E. 2013. Heat stress in temperate and tropical maize hybrids: A novel approach for assessing sources of kernel loss in field conditions. *Field Crops Research* **142**:58-67. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.11.009>
- RICHARD, B.; RIVOAL, J.; SPITERI, A.; PRADET, A. 1991. Anaerobic stress induces the transcription and translation of sucrose synthase in rice. *Plant Physiology*, **95** (3): 669-674.
- RUIZ RUIZ, X. G. 2018. Valoración del potencial de germoplasma exótico templado para el mejoramiento de maíz subtropical. Tesis de Maestría. Programa de Posgrado en Recursos Genéticos y de Productividad. Campus de Montecillo, Texcoco, México.
- THEODORO, J. V. C. 2013. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de soja pelos testes de pH do exsudato, alagamento e índice de resistência ao enrugamento. Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul Câmpus De Chapadão Do Sul. Programa De Pós- Graduação Em Agronomia. Mestrado Em Produção Vegetal. Tesis. 52 pp.

# GERMINACIÓN Y VIGOR POR *COLD TEST* EN POBLACIONES DE HÍBRIDOS DE MAÍZ TEMPLADO Y SUBTROPICAL

## INTRODUCCIÓN

Para comenzar, es importante resaltar que los productores agrícolas siempre esperan semillas genéticamente puras y de alta calidad. Como resultado, las empresas semilleras mantienen programas de control de calidad que monitorean la semilla desde la cosecha hasta la venta. Con ese objetivo, se utilizan una serie de pruebas “tradicionales” de calidad de las semillas, incluidas pruebas mecánicas y pruebas de pureza genética, germinación y vigor de las semillas y pruebas de sanidad de las semillas, y las técnicas de evaluación de la calidad de las semillas continúan evolucionando (MacDonald, 1998). En este punto, es de suma importancia poder discriminar los diferentes lotes de semillas según sus características particulares. Semillas de alta calidad podrían sembrarse en condiciones óptimas o podrían ser almacenadas por mayor tiempo en comparación con lotes de menor vigor, pero dentro del rango de calidad, de allí que la calidad de la semilla tiene un efecto fundamental en el rendimiento del cultivo (Vitoria y Natera, 2007). De este modo, los programas de control de calidad de las semillas, basados en ensayos bien fundamentados, asegurarían que sólo las mejores semillas se ofrezcan en el mercado. La calidad de semillas implica la integridad de estructuras y procesos fisiológicos para conservar la viabilidad (Vitoria y Natera, 2007). Los indicadores de ésta son: la germinación y el vigor, que dependen del genotipo y del manejo en la producción y post-cosecha (González *et al.*, 2014)

En relación con los indicadores de calidad fisiológica en semillas, se define a la germinación como la serie de procesos metabólicos y morfogenéticos, que transforman el embrión en una plántula, que posteriormente se puede convertir en una planta adulta (Rosental *et al.*, 2014). Por otro lado, Navarro *et al.* (2015), definen al vigor como la sumatoria de aquellas propiedades de las semillas que determinan el nivel de actividad y la

respuesta durante la germinación y emergencia de la plántula. Por esta razón, es que las pruebas de Germinación y vigor se recomiendan implementarlas de forma paralela, para emitir veredictos integrales de la calidad fisiológica, debido a que estas dos pruebas infieren y ayudan a definir la calidad física y fisiológica de la semilla (Tekrony, 2003).

La evaluación del vigor de la semilla tiene implicaciones importantes para la industria de semillas como un control básico del potencial fisiológico de la semilla durante las diferentes fases de la producción de semilla y un apoyo para las decisiones estratégicas con respecto a la selección de lotes de semilla de alta calidad para satisfacer la demanda del consumidor (Marcos-Filho, 2015). Al considerar que las pruebas de vigor deben estimar la calidad de las semillas con mayor confiabilidad que las de germinación, la evaluación mediante estudios integrales de cualquiera de los factores relacionados estrechamente con el deterioro, y que anteceden a la pérdida de viabilidad, pueden servir teóricamente como prueba para evaluar el vigor (Navarro *et al.*, 2015).

Desde una visión fisiológica, Matthews y Khajeh Hosseini (2007) propusieron que la germinación más lenta (mayor tiempo medio de germinación) de las semillas envejecidas y de bajo vigor ocurre porque necesitan más tiempo para la reparación en comparación con los embriones no envejecidos (menor tiempo medio de germinación). Así, esta sugerencia proporcionó el estímulo para el desarrollo de la hipótesis del envejecimiento/reparación de la semilla para explicar las diferencias de vigor (Powell y Matthews, 2012). La explicación de los resultados del *Cold Test* en términos de la hipótesis de envejecimiento/reparación de la semilla está respaldada por observaciones en maíz (Khajeh Hosseini *et al.*, 2009) y colza (Khajeh Hosseini *et al.*, 2010). Según Powell y Matthews (2012), las semillas que más tarde produjeron una radícula emergida fueron estadísticamente más propensas a convertirse en plántulas anormales, lo que puede interpretarse en términos de la hipótesis del envejecimiento/reparación de la semilla. En este sentido, según estos autores, se necesitaría un período de reparación más largo en las semillas más deterioradas, y algunas estarían tan deterioradas que la reparación sería incompleta, dando como resultado la producción de plántulas anormales.

El método de CT, probablemente, es uno de los métodos de vigor más estudiados principalmente para semilla de maíz en Estados Unidos, donde este cultivo es sembrado a inicios de la primavera (ABRATES, 1999). De allí que, AOSA (1983), menciona que este



método simula las condiciones de campo de primavera temprana, proveyendo altas humedades en suelo y baja temperatura. La capacidad de germinar en suelos fríos y húmedos es afectada por la herencia genética, la incidencia de daños mecánicos, el tratamiento de semillas utilizado y las condiciones fisiológicas de la semilla (ABRATES, 1999). Por lo que el CT evalúa un efecto combinado de, al menos, estos factores sobre la capacidad de germinar del lote. Asimismo, diferentes estudios revelaron la estrecha correlación entre los resultados de las pruebas de vigor en frío y la emergencia de semillas de maíz en el campo, en suelos frescos y húmedos de las regiones templadas de Europa y América (Rezvani *et al.*, 2017). En contrapartida, y si bien el CT ha sido la prueba por excelencia de vigor utilizada para los híbridos de maíz templado, no se sabe si es tan efectivo para evaluar el vigor de la semilla de los híbridos de maíz subtropical (Shah *et al.*, 2002). Por otro lado, Rezvani *et al.* (2017) mencionan estudios que indicaron que el método de CT, junto con otros métodos, no fue adecuado para evaluar el vigor del maíz sembrado en verano en áreas tropicales y subtropicales. Por otro parte, mencionan como la prueba de vigor y método de clasificación de calidad fisiológica más apropiado para lotes de semillas producidas en zonas subtropicales y tropicales, al análisis denominado *Mean Germination Time* (MGT) luego de un Envejecimiento acelerado con sales saturadas (SSAA - *Salt Saturated Accelerated Aging*). Otros autores, mencionan también al envejecimiento acelerado modificado como el mejor predictor de la emergencia a campo para materiales de maíz subtropical (Shah *et al.*, 2002).

Debe señalarse que el CT es el método de vigor más conocido y utilizado en semillas de maíz en Argentina. No obstante, la dificultad que presenta es el largo tiempo necesario para la obtención de resultados. Esto es una desventaja considerable cuando se requiere tomar decisiones rápidas debido a la gran velocidad del proceso productivo.

En lo que respecta a los atributos de calidad fisiológica de las semillas, estos son componentes importantes para ampliar la caracterización del germoplasma. Guillen-de la Cruz *et al.* (2018) mencionan que en el cultivo de maíz se puede encontrar una gran diversidad en tamaño, forma y composición de la semilla, debido a factores genéticos, ambientales y la ubicación de ésta en la mazorca. Además, agregan que las diferencias estructurales de mayor importancia en la semilla son: tamaño, forma y proporción de endospermo vítreo y harinoso. Sobre la diversidad de la correspondencia entre endospermo

vítreo y harinoso, Pérez De La Cerda *et al.* (2007) indicaron que los factores genéticos son los que más afectan la proporción de endospermo en los granos de maíz, debido a que el genotipo tiene un papel importante en la composición de los componentes de la semilla. Al respecto, se demostró que las características estructurales del endospermo están directamente relacionadas con la fisiología de la semilla, observando que, en general, las poblaciones en estudio que presentaron alto vigor y germinación provienen de materiales que tienen granos con mayor proporción de endospermo vítreo (Pérez De La Cerda *et al.*, 2007; Guillen-de la Cruz *et al.*, 2018).

En este sentido, Rattalino Edreira y Otegui (2013) mencionaron que el maíz templado y tropical difieren en su tolerancia al estrés por calor, pero que las bases ecofisiológicas de las diferencias genotípicas son poco conocidas. Respecto a este punto, Baszczyński y Walden (1981) observaron cambios dramáticos en la distribución de polipéptidos de células y tejidos de una variedad de plantas superiores en respuesta a factores de estrés ambientales tales como nutrición, agua, anaerobiosis, reguladores del crecimiento de plantas y "choque térmico". El cambio en el patrón de los productos génicos inducido por un breve cambio a una temperatura elevada se ha descrito en diferentes sistemas, incluso en maíz (Altschuler y Mascarenhas, 1982; Baszczyński y Walden, 1981; Dupuis y Dumas, 1990). El efecto general parece ser una síntesis reducida de la mayoría de los polipéptidos y la síntesis mejorada y/o nueva de un pequeño número de proteínas, denominadas *Heat Shock Protein* (HSP, o proteínas de choque térmico). Young *et al.* (2001) mencionan que el estrés por calor da como resultado la producción de proteínas mal plegadas durante su síntesis y la desnaturalización de las proteínas existentes. Además, estos autores sostienen que la prevención de la desnaturalización o replegamiento de proteínas ya desnaturalizadas parece ser la función principal de las HSP. Aunque se sabe que, además de su función durante el estrés por calor, las HSP pueden cumplir funciones importantes en condiciones sin estrés (Young *et al.*, 2001). Aquí, es importante mencionar que hay una amplia gama de respuestas a las condiciones ambientales para cada miembro de una familia HSP en particular (Sun *et al.*, 2012). En relación con esto, Baszczyński y Walden (1981) determinaron, en un experimento con plúmulas de maíz de cinco días de edad, que el aumento en la temperatura de incubación implicó la síntesis mejorada o novedosa de un pequeño grupo de polipéptidos de choque térmico análogos a otros sistemas animales. Además, agregan que, en dicho sistema, esta respuesta es espectacular porque las HSP representan más del 15% de los polipéptidos totales

sintetizados tras un breve cambio de temperatura a 41°C. De modo que la respuesta al choque térmico es: a) dependiente de la temperatura (las HSP aparecen sólo a 35 °C o más y se intensifican con el aumento de la temperatura); b) depende de la duración del tratamiento térmico (Baszczyński y Walden,1981). No obstante, y si bien son varios los organismos que producen HSP en respuesta a altas temperaturas y otros estreses, Sun et al. (2012) sostienen que la función de las proteínas de choque térmico en la tolerancia al estrés no está completamente explorada. Por lo tanto, se necesitan más estudios para aclarar las especificidades/características comunes de las HSP inducidas como mecanismo de defensa contra cada estrés ambiental (Sun *et al.*, 2012).

El objetivo del presente Capítulo fue evaluar la calidad fisiológica de las poblaciones de híbridos de maíz templados y subtropicales en términos del análisis de Germinación y el CT como prueba de referencia de vigor.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material biológico**

El material biológico usado fueron 100 lotes de semilla híbrida de *Zea mays* L., propiedad del semillero Corteva Agriscience Argentina SRL. Los mismos fueron tratados con fungicida Maxim XL (Fludioxonil 2,5 g y Metalaxil-M. 1,0 g.) en una dosis de 100 mL/100 kg de semilla. Además, en todos los casos, presentaron entre 11% y 13% de humedad.

El 50% de los mismos corresponden a diez diferentes lotes de híbridos de germoplasma subtropical (identificados como S1 a S10) producidos en las provincias norteñas de Tucumán y Catamarca, Argentina. El restante 50%, corresponde a diez diferentes híbridos de germoplasma templado (T1 a T10) producidos en la zona central del país, en las provincias de Santa Fe (sur) y Buenos Aires (noroeste).

Las muestras de semillas de los lotes se almacenaron hasta el momento de los ensayos en sobres de papel en una cámara con ambiente controlado, con temperaturas entre 16-20 °C y humedades relativas entre 70 y 75%.

## **Prueba de Germinación**

La prueba de Germinación se condujo siguiendo la metodología propuesta por las Reglas ISTA (2021). Se usó como medio de crecimiento arena estéril con una humedad de 30% de su capacidad de retención. Se sembraron 400 semillas distribuidas en cuatro repeticiones de 100 semillas cada una, separadas de la fracción de semilla pura. Para la identificación de la semilla pura se tuvo en cuenta lo especificado para *Zea mays* L. en las Reglas ISTA (2021). La siembra de cada repetición se realizó en recipientes plásticos cuadrados con tapa (dimensiones: 23,5 cm de lado x 11,5 cm de altura). Se distribuyó una base de arena húmeda de dos centímetros de altura, encima una capa de 100 semillas distribuidas homogéneamente (sin contacto entre semillas) y luego se cubrió con una capa de 1,5 cm de arena. Finalmente, se colocó una tapa hermética.

Las muestras se colocaron en una cámara de germinación a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  de temperatura constante, con luz alterna, ocho horas de luz y 16 horas de oscuridad (ISTA, 2021). Una vez transcurridos los siete días de permanencia en la cámara de germinación, se realizó la evaluación final. Las plántulas fueron separadas en dos categorías, normales y anormales, según el desarrollo de las estructuras consideradas esenciales y las semillas no germinadas, discriminadas según lo establece la normativa. Se consideraron plántulas normales a aquellas que mostraron el potencial para continuar su desarrollo en una planta satisfactoria a campo cuando crece bajo condiciones favorables de suelo, humedad, temperatura y luz (ISTA, 2021). Las plántulas anormales fueron aquellas que presentaron defectos, deformaciones, desbalances o podredumbres primarias en sus estructuras esenciales que les impide desarrollarse como una plántula satisfactoria en campo (ISTA, 2021). Las semillas no germinadas son aquellas que quedan remanentes al finalizar el ensayo de germinación y se clasifican en duras, frescas, muertas y otras categorías (ISTA, 2021). La evaluación del ensayo siguió los criterios establecidos en Manual de Evaluación de Plántulas (ISTA, 2018).

Una vez obtenidos los resultados se controló si los valores de germinación de las cuatro repeticiones obtenidas por muestra se encontraban en tolerancia estadística utilizando la Tabla 5B Parte 1 (ISTA, 2021). En los casos en que el resultado se encontró fuera de las tolerancias, se repitió el análisis pertinente. El resultado final de cada muestra analizada se expresó como porcentaje en número, siguiendo el criterio de redondeo establecido por ISTA (2021).

### **Prueba de Cold Test (CT)**

Se analizaron 200 semillas repartidas en cuatro repeticiones de 50 semillas cada una para todas las muestras bajo estudio. Se realizó el método de CT en rollos de Corteva Agriscience Argentina SRL. Se utilizó como medio de crecimiento papel de germinación Anchor (12 x 24 38# *Seed Germination Paper*) y terrina: mezcla de tierra y arena en una proporción 1:1. La tierra utilizada para conformar la terrina, fue extraída de los primeros diez centímetros del perfil de lotes en donde se cultivó maíz, a fin de asegurar la presencia de patógenos correspondientes a este cultivo. Desde su extracción hasta su utilización en el ensayo, la tierra fue tamizada (para extraer restos vegetales, piedras, etc.) y conservada en frío con una humedad de alrededor del 15%. Las hojas de papel se hidrataron a saturación el día anterior a la siembra y se las colocó en cámara fría a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, durante la siembra se colocaron dos hojas de papel Anchor sobre una base metálica fría, para conservar la temperatura del ensayo siempre en frío. Sobre las dos hojas de papel se sembraron 50 semillas bien distribuidas en la zona central del mismo. Luego se cubrieron con una delgada capa de terrina y se taparon con una hoja de papel humedecida. Se hizo un pequeño doblez en la parte inferior de las hojas de papel para evitar pérdidas de semillas y se cerró el rollo. Posteriormente se colocaron los rollos en un contenedor hermético y se llevaron a cámara de frío, en total oscuridad, a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante siete días. Transcurrido este periodo de frío, los rollos se trasladaron a una cámara de germinación a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en oscuridad, por cinco días. Al finalizar la etapa de calor se evaluó el ensayo considerando plántula vigorosa a toda aquella: a) mayor a 3 cm de longitud total (desde el extremo superior de la parte aérea hasta el extremo inferior de la raíz), b) tiene hoja primaria, aunque se encuentre dentro del coleóptilo y esté extendida menos del 50% de la longitud de éste y, c) en lo que respecta al resto de las características de las estructuras esenciales, cumplió con los criterios de “plántula normal” establecido por las reglas ISTA (2021). Los resultados de cada repetición se registraron como número de plántulas vigorosas por rollo evaluado.

Por último, se controló que los valores de plántulas obtenidas por repeticiones para cada lote estuvieran en tolerancia estadística según la Tabla 15 F (ISTA, 2021). En los casos en que el resultado se encontró fuera de las tolerancias, se repitió el análisis para dicha muestra. El resultado final se expresó como porcentaje en número de las cuatro repeticiones realizadas por lote.

## **Análisis estadístico**

Para evaluar la calidad fisiológica de los lotes de maíz de germoplasma templado y subtropical en términos del análisis de Germinación y el CT, se determinó, en primer lugar, la normalidad y homogeneidad de los datos obtenidos. Luego se aplicó la prueba estadística no paramétrica de Mann Whitney, dado que se verificó que los datos no eran normales ni homogéneos.

El análisis estadístico de la calidad fisiológica en función del tamaño de la semilla, grande y pequeña, y de la forma, redonda y chata, se realizó con un análisis de varianza de rangos alineados (Wobbrock *et al.*, 2011). Es un método no paramétrico que permitió subsanar la falta de normalidad de los datos.

Para hacer los análisis estadísticos se utilizó el software JMP, provisto por la empresa Corteva Agriscience Argentina, y el software R (R Core Team, 2021) y el paquete ARTool (Kay *et al.*, 2021) para realizar el análisis de varianza de rangos alineados.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la Tabla 2.1 se presenta un resumen de los resultados de los análisis realizados en las 100 muestras bajo estudio de la prueba de Germinación (PG) y *Cold Test* (CT) como método de vigor de referencia. Asimismo, se incluyeron el tamaño y la forma correspondiente a cada lote de semillas empleado para esta tesis.

Respecto al análisis de la calidad fisiológica de los lotes de germoplasma templado y subtropical en términos del análisis de germinación y el CT, se aplicó la prueba de Mann Whitney, dado que se verificó que los datos no eran normales ni homogéneos. Los resultados obtenidos mostraron que los híbridos de germoplasma templado presentaron, en promedio, valores de germinación y CT mayores a los hallados en los de germoplasma subtropical (Tabla 2.2).

**Tabla 2.1.** Resultados en porcentaje de los análisis de la Prueba de Germinación (PG) y *Cold Test* (CT) obtenidos de 50 lotes de híbridos de germoplasma templado y 50 lotes de híbridos de germoplasma subtropical. Se incluyen promedios generales, características físicas de las semillas respecto a su forma chata (C) o redonda (R) y a su tamaño grande (G) o pequeño (P).

GERMO-PLASMA	ID Híbrido	Muestra N°	Forma	Tamaño	PG	CT
<b>TEMPLADOS</b>	<b>T01</b>	1	C	G	93	81
		2	C	G	88	51
		3	C	G	98	82
		4	C	P	96	88
		5	R	G	93	65
		6	R	G	85	74
	<b>T02</b>	7	R	G	96	85
		8	R	G	89	82
		9	R	G	91	85
		10	R	P	83	78
		11	R	P	92	81
		12	R	P	90	86
	<b>T03</b>	13	R	G	94	86
		14	R	P	96	84
	<b>T04</b>	15	C	P	92	83
		16	C	P	92	82
	<b>T05</b>	17	R	G	94	85
		18	R	G	98	86
	<b>T06</b>	19	R	G	90	81
		20	R	G	83	70
		21	R	G	82	78
		22	R	G	85	85
		23	R	P	86	82
		24	R	P	85	88
	<b>T07</b>	25	R	G	94	75
		26	R	P	95	86
	<b>T08</b>	27	C	G	99	98
		28	C	G	98	98
		29	C	G	99	99
		30	C	G	96	98
		31	C	G	99	99
		32	C	G	99	96
		33	C	G	97	98
		34	C	G	98	99
		35	C	G	99	99
		36	C	P	97	97
		37	C	P	96	97
		38	R	G	97	97
		39	R	G	96	93
		40	R	P	95	92
		41	R	P	95	97
		42	R	P	97	98
	<b>T09</b>	43	C	P	97	95
		44	C	P	100	98
		45	R	P	96	90
		46	R	P	97	96
		47	C	P	99	99
		48	C	P	98	95
	<b>T10</b>	49	R	G	94	88
		50	R	P	91	87
<b>PROMEDIO GENERAL</b>					<b>94</b>	<b>88</b>
<b>SUBTROPICALES</b>	<b>S01</b>	51	R	P	92	80
		52	C	G	92	72
	<b>S02</b>	53	C	G	99	88
		54	C	G	97	75
		55	C	G	99	85
		56	C	P	98	82
		57	R	G	64	34
		58	R	G	95	83
		59	R	G	94	85
		60	R	P	88	56
		61	C	G	92	84
	<b>S03</b>	62	R	P	89	79
		63	C	G	92	63
	<b>S04</b>	64	C	G	97	73
		65	C	G	90	84
		66	C	G	83	53
		67	C	G	81	57
		68	C	G	87	75
		69	C	G	94	76
		70	C	G	92	79
		71	C	G	84	47
		72	C	G	94	61
		73	C	G	74	35
		74	C	P	90	56
		75	C	P	97	66
		76	C	P	87	49
		77	C	P	90	49
		78	R	G	92	67
		79	R	G	74	40
	80	R	G	75	44	
	81	R	P	75	48	
	82	R	P	91	77	
	83	R	P	77	44	
	<b>S05</b>	84	C	G	89	73
		85	C	G	99	86
		86	C	P	93	85
		87	C	P	85	78
		88	C	P	99	82
		89	R	G	73	83
		90	R	P	94	85
	<b>S06</b>	91	R	G	41	32
		92	R	P	83	41
	<b>S07</b>	93	R	P	76	68
		94	R	G	86	86
		95	R	P	94	53
	<b>S08</b>	96	R	P	87	83
		97	C	P	91	85
	<b>S09</b>	98	C	G	80	40
	<b>S10</b>	99	C	G	96	92
		100	R	P	95	91
<b>PROMEDIO GENERAL</b>					<b>88</b>	<b>68</b>

Con relación a la forma y tamaño de los lotes de semillas utilizados en este estudio (Tabla 2.1), y debido a la falta de normalidad de los datos, se ajustó un modelo estadístico de análisis de varianza de rangos alineados. De este modo, se determinó que no hay efecto del tamaño de la semilla (grande o pequeña) sobre los resultados de germinación y CT en materiales templados ni subtropicales. Esto confirma lo mencionado por Perez Mendoza et al. (2006) quienes demostraron que la calidad de la semilla de maíz depende principalmente del potencial genético de la variedad más que del tamaño de la misma. Por el contrario, se observó que la forma chata o redonda de la semilla condicionan la respuesta en los ensayos de germinación y CT. Mendoza et al. (2004) encontraron mayor vigor y germinación en la semilla ubicada en la parte basal y media de la mazorca, zonas en donde se ubican mayormente los granos chatos. Los resultados de dicho trabajo revelaron que la madurez fisiológica no es el mejor indicador de la máxima calidad de la semilla sino la acumulación de materia seca (Mendoza et al., 2004).

**Tabla 2.2.** Medidas estadísticas descriptivas de posición y dispersión de los porcentajes de Germinación y *Cold Test* (vigor) obtenidos para los lotes de híbridos de maíz de germoplasmas templado y subtropical.

Parámetros	TEMPLADOS		SUBTROPICALES	
	Germinación	<i>Cold Test</i>	Germinación	<i>Cold Test</i>
<b>N</b>	50.00	50.00	50.00	50.00
<b>Media</b>	93.78	87.84	87.52	67.78
<b>Desvío Estándar</b>	4.88	10.07	10.60	17.76
<b>Mínimo</b>	82.00	51.00	41.00	32.00
<b>Máximo</b>	100.00	99.00	99.00	92.00
<b>p-valor MW*</b>	0.0003		<0.0001	

Referencia: \* *p*-valor Mann Whitney

La germinación de la mayoría de las especies ocurre bajo rangos amplios de temperaturas y los valores extremos dependen de las características genéticas y de la calidad fisiológica de las semillas (Arango Perearnau, 2018). Dado que la germinación en laboratorio asegura que el proceso fisiológico ocurra en condiciones ideales para la especie, es válido decir que la calidad fisiológica de algunos lotes de germoplasma subtropical en estudio fue menor que la de los correspondientes a germoplasma templado (Tabla 2.3). Por lo tanto, se atribuye la diferencia de calidad germinativa en materiales subtropicales a la presencia de muestras con valores de germinación menores a 80%.



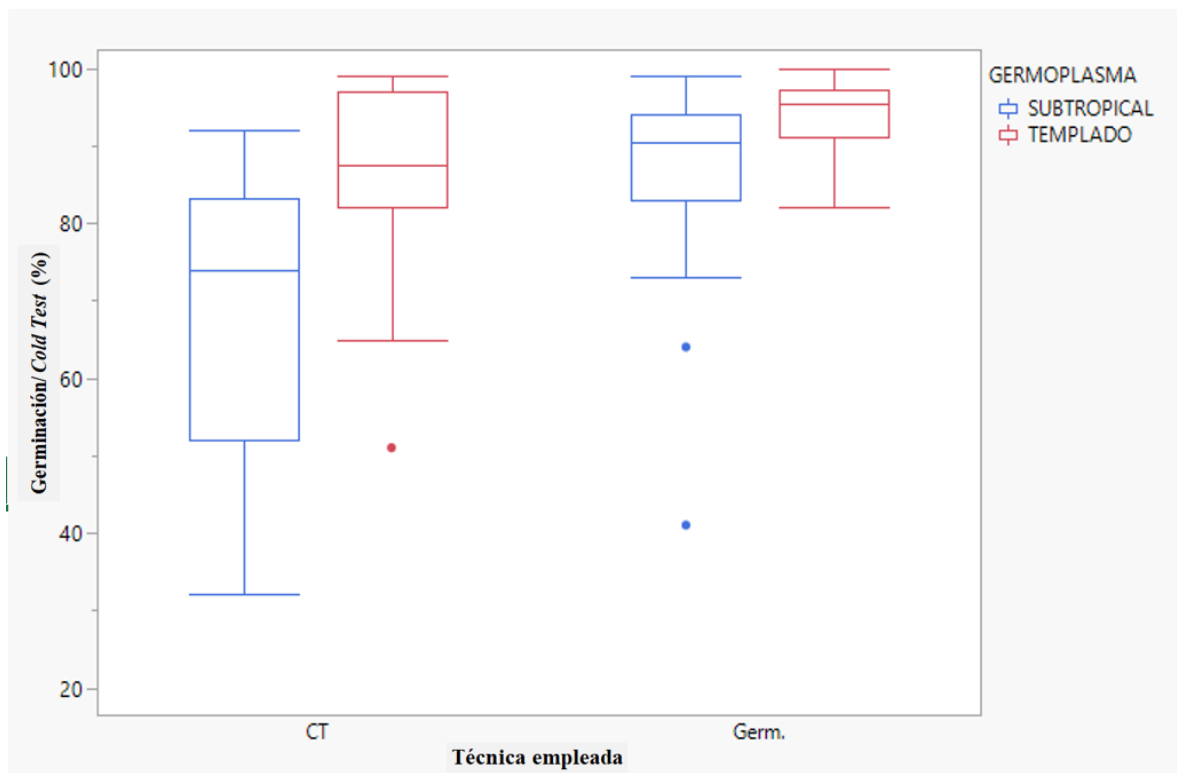
**Tabla 2.3.** Promedios de la Prueba de Germinación (PG) y *Cold Test* (CT) discriminadas por rango de % de Plántulas normales obtenidos para los lotes de híbridos de maíz de germoplasmas templado y subtropical.

<b>Rango de germinación (%)</b>		<b>TEMPLADOS</b>	<b>SUBTROPICALES</b>
<b>90-100</b>	N° Muestras	41	28
	Promedio PG (%)	96	94
	Promedio CT (%)	90	77
<b>80-89</b>	N° Muestras	9	13
	Promedio PG (%)	85	85
	Promedio CT (%)	76	63
<b>&lt; 80</b>	N° Muestras	0	9
	Promedio PG (%)	-	70
	Promedio CT (%)	-	48

Por otro lado, se observa que para CT el germoplasma subtropical evidenció una mayor variabilidad entre los datos (Tabla 2.2), lo que significa que hay una mayor sensibilidad al estrés por frío con un grado de dispersión importante con un mínimo de 32% y un máximo de 92% (60% de diferencia). Por otro lado, en los materiales templados esta dispersión fue menor (48%), fluctuando desde un mínimo de 51% a un máximo de 99%. Este comportamiento se sostiene al discriminar por rangos de % de Plántulas normales (Tabla 2.3), donde los valores promedio de CT para germoplasmas templados son sistemáticamente superiores a los obtenidos en el subtropical. De lo precedente surge que existe un comportamiento diferente entre ambos tipos de materiales respecto de su respuesta al frío.

Del análisis de la Fig. 2.1, surge que los dos germoplasmas mostraron comportamientos distintos tanto para la Germinación como para la prueba de vigor utilizada ( $p < 0,05$ , según Mann Whitney). Respecto a la Germinación, que expresa la potencialidad de un lote para germinar bajo condiciones óptimas, este comportamiento estaría explicado por una menor calidad fisiológica de algunas muestras de materiales subtropicales. Por otro lado, en el germoplasma subtropical los resultados de CT fueron significativamente más bajos ( $p < 0,05$ , según Mann Whitney) que los obtenidos en germoplasma templado, lo que evidencia una mayor sensibilidad de la respuesta al estrés por frío en los primeros. Esto puede observarse aun cuando la calidad germinativa se encuentra dentro del mismo rango que los templados (Tabla 2.3). Respecto a este tema, Rezvani et al. (2017) indican la baja efectividad del CT para evaluar el vigor para híbridos de regiones subtropicales y tropicales. De lo que surge que, para el germoplasma subtropical utilizado en dichas regiones, el CT

ejerce una condición de estrés por frío que no se relaciona con la existente en los campos de dichas zonas productivas. Por el contrario, diferentes estudios han revelado la alta correlación entre los resultados de vigor del CT y la emergencia de semillas de maíz en el campo, en suelos fríos y húmedos de las regiones templadas de Europa y América (Marcos-Filho, 2015; Navarro *et al.*, 2015; Rezvani *et al.*, 2017).



**Figura. 2.1.** Diagrama de dispersión de la calidad medida como porcentaje de germinación y vigor determinados con el análisis de germinación (Germ.) y *Cold Test* (CT) respectivamente, en 100 lotes de semilla híbrida de maíz según tipo de germoplasma e intervalo de confianza del 95% para las medias de cada grupo de datos (Mann Whitney).

En virtud de lo planteado, surge la pregunta respecto del por qué existe esta diferencia de comportamiento con relación al CT en el material de estudio. Así, esto puede ser explicado en términos de los aspectos bioquímicos y fisiológicos, debido a la existencia de *Heat Shock Proteins* (HSP). Esta respuesta al estrés por calor ha sido observada en una amplia variedad de tejidos vegetativos en maíz (Dupuis & Dumas, 1990). Al respecto, Young *et al.* (2001) han informado que en maíz, la función de chaperonas de algunas HSP, como HSP100, promueve la desagregación de proteínas luego de un estrés térmico, mientras que la de otras, como HSP70, promueve el replegamiento de proteínas desnaturalizadas. Por otro lado, Altschuler y Mascarenhas (1982) mencionan que una función adicional del

fenómeno del choque térmico podría ser la protección de las plántulas de la muerte causada por el estrés por calor extremo. También agrega que la respuesta al choque térmico parece tener relevancia para las plantas en el campo. Por lo tanto, la existencia de un proceso adaptativo al factor adverso producido por el frío en materiales templados podría explicar los resultados de CT significativamente mayores a los obtenidos en las muestras de germoplasma subtropical.

## CONCLUSIONES

Las evidencias experimentales demostraron que las poblaciones de híbridos de maíz de germoplasma templado y subtropical presentan diferente comportamiento respecto al análisis de germinación y de vigor por la prueba de CT.

Por un lado, la calidad fisiológica de la población de lotes de semilla de germoplasma subtropical en condiciones óptimas de germinación fue más baja que la evidenciada por la población de materiales templados lo que supone dos cosas, o el material utilizado en este ensayo fue de calidad más baja que los templados o la calidad fisiológica de los materiales subtropicales tiende a ser menor que la de los templados.

Por otra parte, se demostró que ambos germoplasmas tuvieron un nivel de respuesta diferente ante el estrés generado por el método de CT. En los híbridos subtropicales, este método generó un estrés mayor, lo que podría explicarse por un menor nivel de respuesta fisiológica en términos de la capacidad de adaptación a la germinación en frío. En cambio, en la población de híbridos templados, el nivel de respuesta al CT fue mejor, ya que posee mecanismos fisiológicos moleculares adaptativos, lo que permitiría que sea utilizado como predictor de emergencia a campo en condiciones ambientales semejantes al estrés de frío.

## BIBLIOGRAFÍA

- ABRATES. ASSOCIACIAO BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE SEMENTES. 1999. Vigor de Sementes: Conceitos e Testes. Comité de Vigor de Sementes. Editores: Krzyzanowski, F.C.; Daiton Vieira, R.; Franca Neto, J. B. 218p.
- ALTSCHULER, M.; MASCARENHAS, J. P. 1982. Heat shock proteins and effects of heat shock in plants. *Plant Mol Biol* 1, 103–115. <https://doi.org/10.1007/BF00024974>

- AOSA. ASSOCIATION OFFICIAL SEED ANALYSTS. 1983. Seed Vigor Testing Handbook. Contribution N° 32 To The Handbook On Seed Testing. Ed. The Seed Vigor Test Committee. 105 pp.
- ARANGO PEREARNAU, M. R. 2018. Caracterización de la calidad de lotes de maíz (*Zea mays* L.) para su uso como simiente a través de ensayos fisiológicos y bioquímicos. Tesis Doctoral en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario.
- BASZCZYNSKI C. L.; WALDEN D. B. (1981) Regulation of gene expression in corn (*Zea mays* L.) by heat shock. *Can J Biochem* 60:569-579
- DUPUIS, I.; DUMAS, C. 1990. Influence of temperature stress on in vitro fertilization and heat shock protein synthesis in maize (*Zea mays* L.) reproductive tissues. *Plant physiology*, 94(2), 665-670.
- GONZÁLEZ, R. F.; LEÓN, D.; BORGES, L.; PINZÓN, L.; MAGAÑA, M.; SANGUINES, R. y URRESTARAZU, M (2014). Envejecimiento acelerado sobre la calidad de semillas de maíz para producir germinados para forraje alternativo. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(SPE8), 1487-1493.
- GUILLEN-DE LACRUZ, P.; VELÁZQUEZ-MORALES, R.; DE LA CRUZ-LÁZARO, E.; MÁRQUEZ-QUIROZ, C.; OSORIO-OSORIO, R. 2018. Germinación y vigor de semillas de poblaciones de maíz con diferente proporción de endospermo vítreo. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 34(2), 108-117. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902018005000304>
- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2018. ISTA Handbook on Seedling Evaluation. 4ª Edition by Ronnie Don and Sylvie Ducournau. ISTA Bassersdorf, CH-Switzerland. 300 pp.
- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2021. International Rules for Seed Testing. Zurich. 300 pp.
- KAY M, ELKIN L, HIGGINS J, WOBROCK J (2021). \_ARTool: Aligned Rank Transform for Nonparametric Factorial ANOVAs\_. doi:10.5281/zenodo.594511 <<https://doi.org/10.5281/zenodo.594511>>, R package version 0.11.1, <<https://github.com/mjskay/ARTool>>.
- KHAJEH-HOSSEINI, M.; LOMHOLT, A.; MATTHEWS, S. 2009. Mean germination time in the laboratory estimates the relative vigour and field performance of commercial seed lots of maize (*Zea mays* L.). *Seed Science and Technology* **37**, 446–456.
- KHAJEH-HOSSEINI, M.; NASEHZADEH, M.; MATTHEWS, S. 2010. Rate of physiological germination relates to the percentage of normal seedlings in standard germination tests of naturally aged seed lots of oilseed rape. *Seed Science and Technology* **38**, 602–611.
- MARCOS FILHO, J. 2015. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia agricola*, **72**, 363-374.
- MATTHEWS, S.; KHAJEH-HOSSEINI, M. 2007. Length of the lag period of germination and metabolic repair explain vigour differences in seed lots of maize. *Seed Science and Technology* **35**, 200-212.
- MCDONALD, M. B. (1998). Seed quality assessment. *Seed Science Research*, 8(2), 265-276.
- MENDOZA ELOS, M., LATOURNERIE L., MORENO E., CASTAÑÓN G., CARRILLO J.C., DE LEÓN C., GARCÍA J. G. (2004). Cambios en la calidad de la semilla de maíz durante su desarrollo y maduración. *Agronomía Mesoamericana* **15** (2): 155-160.
- NAVARRO, M.; FEBLES, G.; HERRERA, R. S. 2015. Vigor: essential element for seed quality. *Cuban Journal of Agricultural Science*, **49**(4).
- PÉREZ DE LA CERDA, F. D. J.; CARBALLO CARBALLO, A.; SANTACRUZ VARELA, A.; HERNÁNDEZ LIVERA, A.; MOLINA MORENO, J. C. 2007. Calidad fisiológica en semillas de maíz con diferencias estructurales. *Agricultura técnica en México*, **33**(1), 53-61.
- PÉREZ MENDOZA, C., HERNÁNDEZ LIVERA, A., GONZÁLEZ COSSIO, F. V., GARCÍA DE LOS SANTOS, G., CARBALLO CARBALLO, A., VÁSQUEZ ROJAS, T. R., & TOVAR GÓMEZ, M. D. R. (2006). Tamaño de semilla y relación con su calidad fisiológica en variedades de maíz para forraje. *Agricultura técnica en México*, 32(3), 341-352.

- POWELL, A.; MATTHEWS, S. 2012. Seed aging/repair hypothesis leads to new testing methods. *Seed Technology*, 15-25.
- R CORE TEAM. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>
- RATTALINO EDREIRA, J. I.; OTEGUI M. E. 2013. Heat stress in temperate and tropical maize hybrids: A novel approach for assessing sources of kernel loss in field conditions. *Field Crops Research* **142**:58-67. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.11.009>
- REZVANI, E.; GHADERI-FAR, F.; HAMIDI, A.; SOLTANI, E. 2017. Appropriate Vigor Tests for Evaluating Maize Seed for Subtropical and Tropical Areas. *Seed Technology*, 38(1), 57–67. <http://www.jstor.org/stable/26625394>.
- ROSENTAL, L.; NONOGAKI, H.; FAIT, A. 2014. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research* **24**(1):1-15
- SHAH, F. S.; WATSON, C. E.; CABRERA, E. R. 2002. Seed vigor testing of subtropical corn hybrids. *Research Report*, Vol 23 (2): 1-5
- SUN, L.; LIU, Y.; KONG, X.; ZHANG, D.; PAN, J.; ZHOU, Y.; WANG, L.; LI, D.; YANG, X. 2012. ZmHSP16. 9, a cytosolic class I small heat shock protein in maize (*Zea mays*), confers heat tolerance in transgenic tobacco. *Plant cell reports*, **31**(8), 1473-1484.
- TEKRONY, D. M. 2003. Precision is an essential component in seed vigour testing. *Seed Science and Technology*, **31**, 435-447.
- VITORIA, H.; NATERA, J. R. M. (2007). Relación de la calidad fisiológica de semillas de maíz con pH y conductividad eléctrica. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 39(2), 91-100.
- WOBBROCK, J. O., FINDLATER, L., GERGLE, D., & HIGGINS, J. J. (2011, May). The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures. In *Proceedings of the SIGCHI conference on human factors in computing systems* (pp. 143-146).
- YOUNG, T. E.; LING, J.; GEISLER-LEE, C. J.; TANGUAY, R. L.; CALDWELL, C.; GALLIE, D. R. 2001. Developmental and Thermal Regulation of the Maize Heat Shock Protein, HSP101. *Plant Physiology*, Volume 127, Issue 3, Pages 777–791, <https://doi.org/10.1104/pp.010160>

# ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA PRUEBA DE VIGOR DE EMERGENCIA DE RADÍCULA Y *COLD TEST* EN POBLACIONES DE HÍBRIDOS DE MAÍZ DE GERMOPLASMA TEMPLADO Y SUBTROPICAL

## INTRODUCCIÓN

Por lo planteado en esta tesis, es necesario identificar otras pruebas de vigor que sean más rápidas, pero tan eficientes como el *Cold Test* (CT). Actualmente, el método de Emergencia de Radícula no es tan utilizado como el CT por la industria semillera para la toma de decisiones comerciales en el mercado argentino. Consecuentemente, se necesitan datos experimentales para poder contrastar ambos métodos en los germoplasmas templado y subtropical.

Cabe considerar aquí, que la capacidad de las semillas para germinar rápidamente fue uno de los primeros atributos del vigor y se convirtió en un indicador importante de la calidad fisiológica de la misma como un índice más sensible de la semilla que el porcentaje de germinación (Marcos-Filho, 2015).

En lo que respecta al método de Emergencia de Radícula (ER), se encuentra contemplado dentro de las pruebas de vigor basadas en el crecimiento de las plántulas (Marcos-Filho, 2015; Navarro *et al.*, 2015). Desde una perspectiva general, Marcos-Filho (2015) menciona que diferentes pruebas de vigor aplicadas a lotes de semillas de varias especies han demostrado que los lotes de semillas fisiológicamente envejecidos o más deteriorados tienen una germinación lenta y esta característica se observa por el aumento del período desde el inicio de la absorción de agua hasta la emergencia de la raíz primaria. Se sabe que el retraso en la protrusión de las raíces es uno de los signos iniciales de deterioro después de la madurez fisiológica de la semilla (Matthews y Khajeh-Hosseini, 2007; Matthews *et al.*, 2012). El grado de deterioro es directamente proporcional a la duración de

la fase II de la germinación de la semilla, es decir, la fase de latencia o fase *lag* (Matthews y Khajeh-Hosseini, 2007), lo que refleja el período más largo necesario para la acción de los mecanismos de reparación metabólica o indica una reparación incompleta. Como resultado, la extensión del deterioro de la semilla es directamente proporcional a la duración del período en que tiene lugar la reparación metabólica del daño causado por el deterioro antes de que pueda continuar la germinación (Powell and Matthews, 2012; Marcos-Filho, 2015).

Con relación a esto, Powell y Matthews (2012) han proporcionado evidencia respecto a la hipótesis de envejecimiento/reparación de semillas para explicar las diferencias de vigor. La evaluación de la tasa de germinación en semillas híbridas de maíz fue el tiempo medio de germinación (MGT), es decir, el retraso promedio desde el comienzo de la imbibición hasta la aparición de la radícula. Así, la germinación más lenta (mayor MGT) de las semillas envejecidas y de bajo vigor explica la necesidad de mayor tiempo para la reparación celular en comparación con los embriones no envejecidos que presentan menor MGT (Matthews y Khajeh-Hosseini (2007).

En este punto, es importante marcar que las condiciones precisas de análisis dentro del laboratorio son particularmente importantes cuando se evalúa el vigor, más que cuando se realiza una prueba de Germinación (Tekrony, 2003). Así, cambios menores en el entorno de análisis, pueden significar cambios importantes en el resultado de vigor obtenido de la semilla en estudio (Tekrony, 2003; Bowden y Landais, 2018). Así mismo, Tekrony (2003) menciona a dos factores ambientales, el contenido de humedad de la semilla y la temperatura durante los ensayos, que son críticos en muchas pruebas de vigor, pero que generalmente requieren menos precisión durante la prueba de Germinación. Por tanto, y al menos en cuanto a temperatura, las Reglas ISTA especifican el requisito para un control más estricto para una prueba de Emergencia de radícula (ER) que para una prueba de Germinación.

Además, en el Manual de Vigor de ISTA (Hampton y Tekrony, 1995) se enfatiza la importancia que tiene el contenido de humedad del lote de semillas antes de analizar el vigor. En dicho manual se recomienda ajustar el contenido de humedad de las semillas a un valor entre 10 y 14% para evitar diferencias en los resultados de los análisis y además posibilitar la comparación entre los distintos lotes de semillas.

En lo que respecta a las ventajas de los métodos de ER, Powell y Matthew (2012) mencionan que requieren unos pocos días para obtener el resultado, son relativamente fáciles para estandarizar en un laboratorio de semillas y tienen la potencialidad de automatizarse utilizando análisis de imágenes asistidos por computadora. Esta última característica, agrega la ventaja de ser objetiva, ya que elimina la subjetividad propia de los analistas.

En relación con lo mencionado, se sugiere que el método de ER podría proveer las bases de un método de determinación de vigor para maíz que acortaría los tiempos respecto al CT. Sin embargo, ninguno de los autores menciona un comportamiento diferente de acuerdo con el tipo de germoplasma en análisis.

En base a lo precedente, se plantea la hipótesis de que el método de Emergencia de Radícula (ER) es una técnica rápida, económica y sencilla de evaluación de vigor que puede reemplazar la tradicional técnica de CT y acortar los tiempos de análisis en ambos germoplasmas de maíz.

El objetivo de este Capítulo fue comparar la prueba de CT con el método de ER con el fin de evaluar la posibilidad de reemplazo de CT por ER para determinar el vigor en semillas de maíz de germoplasmas templados y subtropicales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material Biológico**

El material biológico utilizado está descrito en el Capítulo 2.

### **Prueba de *Cold Test***

Se aplicó la metodología descrita en el Capítulo 2.

### **Prueba de Emergencia de Radícula**

Se realizó siguiendo la metodología descrita para la especie maíz en las Reglas ISTA (2021), con sustrato papel armando rollos.



Las muestras de semillas de los diferentes lotes de híbridos se sembraron entre papeles de germinación, en rollos. Se utilizó papel de germinación marca Anchor (12 x 24 38# *Seed Germination Paper*). Se utilizaron 200 semillas por muestra, sembradas en ocho repeticiones de 25 semillas cada una. El papel se humedeció con agua a saturación. Los rollos se armaron con dos hojas de papel húmedo abajo y una hoja de papel húmedo sobre las semillas. Los rollos perfectamente identificados se colocaron dentro de bolsas de polietileno cerradas para evitar pérdidas de humedad durante el periodo del ensayo. Se utilizaron las dos condiciones de ensayo de ER sugeridas por las Reglas ISTA (2021):

- ER 66: 66 horas  $\pm$  15 minutos de incubación a  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (2,75 días).
- ER 144: 144 horas  $\pm$  1 h de incubación a  $13^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (6 días)

Transcurrido el tiempo en la cámara de incubación, se procedió a la evaluación del ensayo. Se consideró como plántula vigorosa a aquellas semillas que produjeron una radícula de al menos dos milímetros de longitud. La radícula incluyó las partes que están dentro de la coleorriza, así como aquellas que han emergido de ella (ISTA, 2021).

Como último paso, se controló que los resultados de las repeticiones por muestra obtenidas se encontraran en tolerancia estadística según Tabla 15I (ISTA, 2021). En los casos en que el resultado estuvo fuera de tolerancias, se repitió el análisis para dicha muestra. El resultado final se expresó como porcentaje en número promedio de las ocho repeticiones realizadas por muestra.

### **Análisis estadístico**

Se siguió la metodología propuesta por Watson y Petrie (2010) para realizar el análisis estadístico de concordancia de los métodos de vigor en estudio. Por consiguiente, se utilizó el Coeficiente de Correlación de Concordancia de Lin (Camacho-Sandoval, 2008) como Índice de Confiabilidad para estimar la concordancia de los métodos y el Diagrama de Bland-Altman para visualizar el patrón (y extensión) de la concordancia. Cabe aclarar que, debido a la falta de asociación lineal entre los métodos en estudio, no se realizó el cálculo del Coeficiente de Correlación de Pearson entre ellos.

Para la interpretación del coeficiente de correlación de concordancia de Lin, se usaron los valores de Camacho-Sandoval (2008), donde se indica que valores de Coeficiente de Lin inferiores a 0,90 presentan un grado de concordancia pobre.

El diagrama de Bland-Altman es una forma sencilla de evaluar un sesgo entre las diferencias de medias y estimar un intervalo de concordancia, dentro del cual se encuentran el 95% de las diferencias del segundo método, en comparación con el primero (Giavarina, 2015). El examen visual del diagrama Bland-Altman nos permite evaluar la concordancia global entre los dos métodos y el sentido del sesgo en el caso que el mismo exista.

El coeficiente de correlación de concordancia de Lin y el diagrama de Bland-Altman fueron calculados utilizando los paquetes `epiR` (Stevenson *et al.*, 2022) y `BlandAltmanLeh` (Lehnert, 2015), de la herramienta estadística R (R Core Team, 2021).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se presentan los resultados de vigor obtenidos a través de los métodos de CT, ER 66 y ER 144 para las 100 muestras de maíz analizadas en el presente estudio (Tabla 3.1), con sus respectivos promedios generales por método.

**Tabla 3.1.** Resultados en porcentaje de los análisis de *Cold Test* (CT), Emergencia de Radícula a 66 horas (ER 66) y a 144 horas (ER 144) obtenidos de 50 lotes de híbridos de germoplasma templado y 50 lotes de híbridos de germoplasma subtropical. Se incluyen características físicas de los lotes respecto a su forma chata (C) o redonda (R) y a su tamaño grande (G) o pequeño (P).

GERMO-PLASMA	ID Híbrido	Muestra N°	Forma	Tamaño	CT	ER66	ER144
<b>T E M P L A D O S</b>	T01	1	C	G	81	12	5
		2	C	G	51	0	0
		3	C	G	82	3	88
		4	C	P	88	33	16
		5	R	G	65	16	26
		6	R	G	74	2	0
	T02	7	R	G	85	92	93
		8	R	G	82	94	94
		9	R	G	85	92	97
		10	R	P	78	91	98
		11	R	P	81	97	98
		12	R	P	86	95	98
	T03	13	R	G	86	89	97
		14	R	P	84	96	98
	T04	15	C	P	83	75	82
		16	C	P	82	68	62
	T05	17	R	G	85	95	98
		18	R	G	86	95	94
	T06	19	R	G	81	97	98
		20	R	G	70	85	97
		21	R	G	78	97	97
		22	R	G	85	99	94
		23	R	P	82	93	95
		24	R	P	88	89	94
	T07	25	R	G	75	34	24
		26	R	P	86	16	56
	T08	27	C	G	98	99	99
		28	C	G	98	97	98
		29	C	G	99	99	98
		30	C	G	98	97	99
		31	C	G	99	97	98
		32	C	G	96	99	99
		33	C	G	98	99	98
		34	C	G	99	99	98
		35	C	G	99	100	99
		36	C	P	97	97	96
		37	C	P	97	95	96
		38	R	G	97	89	97
		39	R	G	93	92	97
		40	R	P	92	95	93
	T09	41	R	P	97	95	97
		42	R	P	98	98	99
		43	C	P	95	100	99
		44	C	P	98	100	100
		45	R	P	90	90	99
		46	R	P	96	96	99
	T10	47	C	P	99	97	99
		48	C	P	95	98	95
	T10	49	R	G	88	91	94
		50	R	P	87	77	71
<b>PROMEDIO GENERAL</b>					<b>88</b>	<b>81</b>	<b>84</b>
<b>S U B T R O P I C A L</b>	S01	51	R	P	80	51	57
		52	C	G	72	59	77
	S02	53	C	G	88	72	79
		54	C	G	75	52	41
		55	C	G	85	65	67
		56	C	P	82	69	45
		57	R	G	34	0	2
		58	R	G	83	4	2
		59	R	G	85	43	41
		60	R	P	56	24	39
	S03	61	C	G	84	24	22
		62	R	P	79	4	53
	S04	63	C	G	63	39	14
		64	C	G	73	49	71
		65	C	G	84	1	0
		66	C	G	53	45	65
		67	C	G	57	27	53
		68	C	G	75	16	2
		69	C	G	76	1	0
		70	C	G	79	60	27
		71	C	G	47	0	89
		72	C	G	61	70	27
		73	C	G	35	0	0
		74	C	P	56	61	41
		75	C	P	66	2	0
		76	C	P	49	1	0
		77	C	P	49	7	0
		78	R	G	67	8	0
		79	R	G	40	0	1
		80	R	G	44	0	0
	S05	81	R	P	48	0	0
		82	R	P	77	2	14
		83	R	P	44	0	0
		84	C	G	73	0	0
		85	C	G	86	84	82
		86	C	P	85	40	40
		87	C	P	78	32	27
		88	C	P	82	72	71
		89	R	G	83	0	0
		90	R	P	85	19	72
	S06	91	R	G	32	0	1
		92	R	P	41	2	0
	S07	93	R	P	68	9	36
		94	R	G	86	26	78
	S08	95	R	P	53	7	9
		96	R	P	83	59	77
	S09	97	C	P	85	79	88
	S10	98	C	G	40	94	89
		99	C	G	92	79	91
	<b>PROMEDIO GENERAL</b>					<b>68</b>	<b>31</b>

La Tabla 3.2 presenta los coeficientes de correlación de concordancia de Lin obtenidos de la comparación de CT con ER 66 y CT con ER 144, para ambos tipos de germoplasma. En todos los casos, los valores fueron inferiores a 0,40 aspecto que se ve reforzado por el hecho de que los intervalos de confianza, en ningún caso incluyen al valor mínimo de 0,90

como para considerarlos adecuados. Por consiguiente, y considerando la calificación del grado de concordancia de Camacho-Sandoval (2008), se confirma que la concordancia entre el CT y cualquiera de los dos métodos de ER fue muy pobre (<0,90). Del análisis precedente surge que los resultados de vigor obtenidos por el método de CT no admiten un reemplazo directo por las técnicas de ER para ninguno de los germoplasmas en estudio. Esto puede ser explicado, desde la óptica de la tecnología de semillas, en términos de que las condiciones de estrés de ambos métodos son distintas y la respuesta de los materiales dependerá de la calidad intrínseca de los mismos y su capacidad para superar el estrés correspondiente a cada método.

**Tabla 3.2.** Coeficiente de correlación de concordancia de Lin y sus intervalos de confianza entre las pruebas CT/ER 66 y CT/ER 144 para germoplasma templado y subtropical.

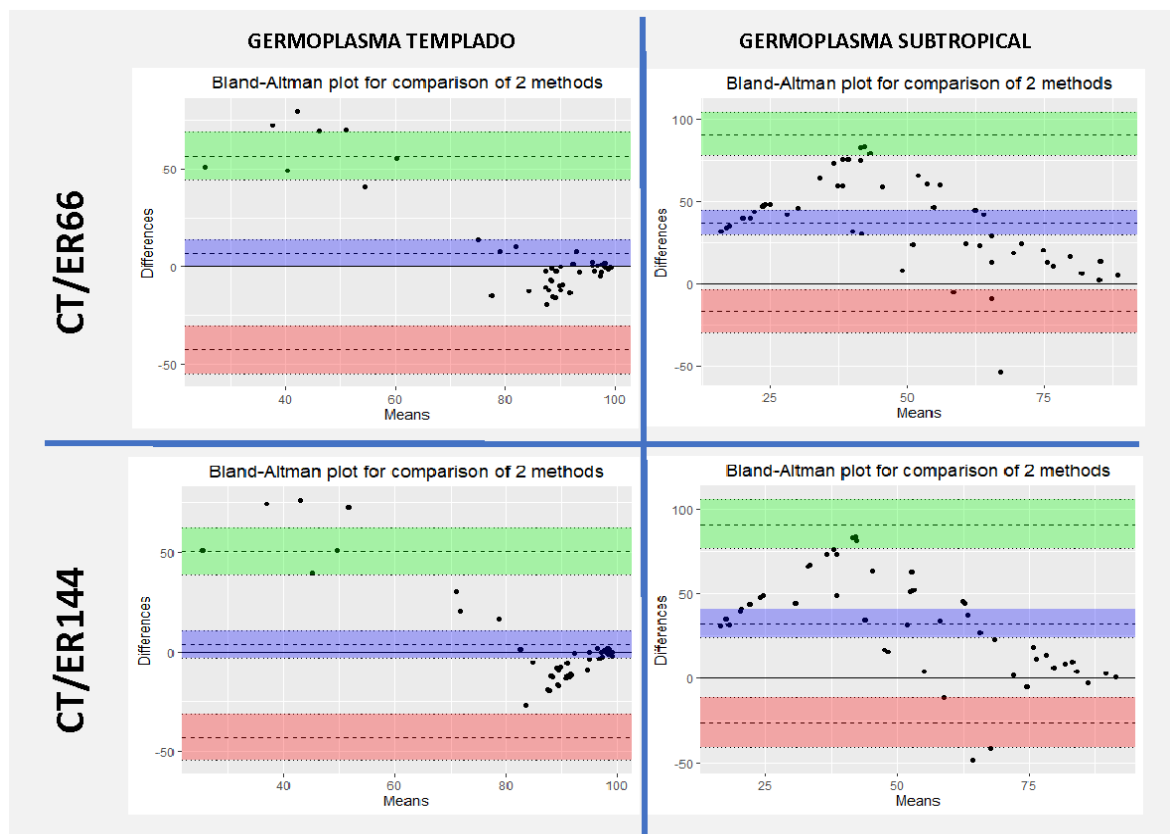
Métodos Comparados	TEMPLADOS			SUBTROPICALES		
	Coef. Lin	IC -L. Inferior	IC - L. Superior	Coef. Lin	IC -L. Inferior	IC - L. Superior
CT - ER 66	0.3601951	0.2333413	0.4749942	0.1853494	0.0671312	0.2984356
CT - ER 144	0.3807090	0.2453845	0.5014800	0.2110451	0.0765759	0.3379742

Por otro lado, la Tabla 3.3 resume los estadísticos del análisis de Bland-Altman que visualiza las diferencias entre los pares de lecturas y ofrece una idea del patrón y el alcance del acuerdo entre métodos. Al respecto, y según Giavarina (2015), el promedio de las diferencias (sesgo) entre los pares de datos ( $\bar{d}$ ) indica la magnitud en que los resultados de los métodos de ER se desvían respecto de CT.

**Tabla 3.3.** Valores de concordancia entre los métodos de CT/ER 66 y CT/ER 144 para germoplasmas templados y subtropicales (Análisis de Bland-Altman).

Métodos	Parámetros	Germoplasma Templado				Germoplasma Subtropical			
		Unidad	Error estándar (se)	Intervalo de Confianza		Unidad	Error estándar (se)	Intervalo de Confianza	
				Desde	Hasta			Desde	Hasta
CT /ER66	Promedio de la diferencia ( $\bar{d}$ )	7.04	3.57	-0.14	14.22	37.08	3.89	29.26	44.9
CT/ER144	Promedio de la diferencia ( $\bar{d}$ )	3.74	3.36	-3.01	10.49	32.43	4.24	23.91	40.95

En dicha Tabla se observa que el promedio de la diferencia (sesgo) entre el CT y ER para los dos métodos ensayados (ER 66 y ER 144) es menor para los lotes de híbridos de germoplasmas templados (CT/ER 66=7,04; CT/ER 144=3,74) en comparación a los germoplasmas subtropicales (ER 66=37,08; ER 144=32,43). Asimismo, los intervalos de confianza, en el caso de los híbridos de germoplasma templado, incluyen al cero, por lo cual se indica que el CT/ER 66 y CT/ER 144 son estadísticamente iguales. Sin embargo, y como se observa en la Fig. 3.1, las diferencias no son constantes a lo largo del rango en que se evaluó la variable. De este modo, para valores promedio bajos de calidad (menores a 60%), las diferencias son positivas (ER menor a CT) y, por el contrario, cuando los valores promedio de calidad son altos (mayores a 70%), esta diferencia es negativa (ER mayor a CT). Es decir, que el método de ER tiende a sobreestimar el valor de CT cuando la calidad de la semilla es alta y, por el contrario, muestra una tendencia a subestimarla cuando la calidad de la semilla se encuentra por debajo de 60% de vigor promedio.



**Figura 3.1.** Diagrama de Bland-Altman para los datos de vigor obtenidos por los métodos de CT/ER 66 Y CT/ER 144 en germoplasmas templados y subtropicales. En línea punteada, el promedio de las diferencias ( $\bar{d}$ ), los límites de concordancia inferior y superior. Representación de los límites del intervalo de confianza para el promedio de las diferencias (en azul), límites de concordancia inferior (en rosa) y superior (en verde).

En relación con la comparación del CT en ambos métodos de ER, para la población de germoplasma subtropical, los intervalos de confianza (Tabla 3.3) excluyen al cero. En tal sentido, es posible decir que el sesgo es significativo, porque la línea de igualdad no está dentro del intervalo de confianza de la media de las diferencias. Esto se puede fundamentar desde Giavarina (2015), confirmando de este modo la falta de concordancia entre las observaciones de los diferentes métodos para este tipo de materiales.

Es pertinente realizar un análisis, desde el punto de vista fisiológico, de los métodos de Emergencia de Radícula descritos en las Reglas (ISTA, 2021) y el *Cold Test* descrito en el Capítulo 2 de este trabajo (basado en Hampton y Tekrony, 1995). Así, en comparación con ER 66 (2,75 días a 20°C) y el ER 144 (6 días a 13°C), este último por tener menor temperatura y más días de duración, las fases I y II del proceso de germinación tienen más tiempo para completarse y alcanzar la emergencia de la radícula. La menor temperatura determina que sea menor el potencial agua, ya que la energía por mol de agua es menor, lo que atrasa el proceso fisiológico. En cambio, el método de ER 66 tiene 2,75 días y la temperatura de 20°C, aumenta el potencial agua, hay mayor energía libre por mol de agua y se agilizan las fases I y II. Con relación a la metodología del CT (siete días a 10°C y cinco a 25°C), la temperatura es menor que la utilizada en la prueba de ER, lo que significa que el potencial de agua a 10°C es menor y prolonga las fases I y II, por lo que su capacidad de discriminación es menor (menos sensible) como evaluador de la calidad. De este análisis surge que, desde el punto de vista fisiológico, los métodos en estudio tienen niveles de respuesta fisiológica distintas.

Desde una perspectiva más general, existen patrones de comportamiento que son levemente diferentes entre las poblaciones de germoplasma templado y subtropical (Fig. 3.1) respecto de CT. Se observa que las diferencias entre técnicas varían según el valor de la variable y el tipo de germoplasma evaluado. Por su parte, Shah *et al.* (2002) mencionan que en sus ensayos la disminución del vigor de la semilla fue más pronunciada para híbridos subtropicales que para híbridos templados. Resulta evidente que, para el germoplasma subtropical, el método de ER presentó siempre valores mucho más bajos que los determinados por el CT. Como se mencionó anteriormente, estos procesos pueden explicarse en términos de la fase I y II del proceso de germinación, el que finaliza con la emergencia de la radícula (Powell y Matthews, 2012). Aquí, es importante el tiempo que requiere que

la radícula emerja, lo que va a depender del agua disponible, de tal modo que a bajas temperaturas (CT 10°C y ER 144 13°C) se disminuye el potencial agua y eso alarga dicho tiempo de salida del embrión. De manera que disminuye el potencial agua y disminuye la energía libre del agua, por lo que se alarga la fase I y II. Además, los dos materiales biológicos analizados tienen comportamientos distintos a esas condiciones de baja temperatura. Por lo que, a su vez, responden de manera distinta a los métodos analizados.

## CONCLUSIONES

Del análisis de las evidencias experimentales y retomando la hipótesis, surge que los métodos de ER no reemplazan el CT, lo que se fundamenta en el hecho que no existe concordancia ni asociación entre ambos. Desde el punto de vista fisiológico, se puede basar en que ambas pruebas tienen diferencias con relación al tiempo de la respuesta trifásica.

La respuesta del CT para evaluar la calidad fisiológica en maíz depende del genotipo que se trate y de la calidad intrínseca del material, es decir, que ante mejor calidad se obtendrá un mejor resultado de vigor. Por otro lado, y atendiendo la duración de la prueba CT (12 días) desde el punto de vista fisiológico, y en comparación con ER, la fase I y II cuentan con tiempo suficiente como para reorganizarse, lo que explica su menor exigencia como prueba de calidad fisiológica.

La ER como prueba de evaluación de calidad, en general, subestima los valores en la población de híbridos subtropicales, lo que explica lo restrictivo de esta prueba para ese tipo de materiales. En cambio, en las poblaciones de materiales templados, permite discriminar más categóricamente. Estos hallazgos indican el valor condicional que tiene el ER como prueba de evaluación de calidad fisiológica.

## BIBLIOGRAFÍA

- BOWDEN, L.; LANDAIS, L. 2018 The impact of light and high light on seed germination and the radicle emergence test. *Seed Science & Technology* **46** (3):465,471.
- CAMACHO-SANDOVAL, J. 2008. Coeficiente de concordancia para variables continuas. *Acta Médica Costarricense*, 50(4), 211-212. Retrieved June 23, 2022, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022008000400005&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022008000400005&lng=en&tlng=es).

- GIAVARINA, D. 2015. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*, 25(2):141–51. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.015>
- HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D.M. 1995. Handbook of Vigour Test Methods. ISTA Vigour Test Committee. 3er. Edition. 117 pp
- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2021. International Rules for Seed Testing. Zurich. 300 pp.
- LEHNERT, B. 2015. BlandAltmanLeh: Plots (Slightly Extended) Bland-Altman Plots. R package version 0.3.1. <https://CRAN.R-project.org/package=BlandAltmanLeh>
- MARCOS FILHO, J. 2015. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia agricola*, **72**, 363-374.
- MATTHEWS, S.; KHAJEH-HOSSEINI, M. 2007. Length of the lag period of germination and metabolic repair explain vigour differences in seed lots of maize. *Seed Science and Technology* **35**, 200-212.
- MATTHEWS, S.; WAGNER, M.; KERR, L.; MCLAREN, G.; POWELL, A. A. 2012. Automated determination of germination time courses by image capture and early counts of radicle emergence lead to a new vigour test for winter oilseed rape (*Brassica napus*). *Seed Science and Technology*, **40**, 413-424. <https://doi.org/10.15258/sst.2012.40.3.12>
- NAVARRO, M.; FEBLES, G.; HERRERA, R. S. 2015. Vigor: essential element for seed quality. *Cuban Journal of Agricultural Science*, **49**(4).
- POWELL, A.; MATTHEWS, S. 2012. Seed aging/repair hypothesis leads to new testing methods. *Seed Technology*, 15-25.
- R CORE TEAM. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>
- SHAH, F. S.; WATSON, C. E.; CABRERA, E. R. 2002. Seed vigor testing of subtropical corn hybrids. Research Report, Vol 23 (2): 1-5
- STEVENSON, M., SERGEANT, E. with contributions from Telmo Nunes, Cord Heuer, Jonathon Marshall, Javier Sanchez, Ron Thornton, Jeno Reiczigel, Jim Robison-Cox, Paola Sebastiani, Peter Solymos, Kazuki Yoshida, Geoff Jones, Sarah Pirikahu, Simon Firestone, Ryan Kyle, Johann Popp, Mathew Jay, Charles Reynard, Allison Cheung, Nagendra Singanallur, Aniko Szabo and Ahmad Rabiee. (2022). *epiR: Tools for the Analysis of Epidemiological Data*. R package version 2.0.48. <https://CRAN.R-project.org/package=epiR>
- TEKRONY, D. M. 2003. Precision is an essential component in seed vigour testing. *Seed Science and Technology*, **31**, 435-447.
- WATSON, P. F.; PETRIE, A. 2010. Method agreement analysis: A review of correct methodology. *Theriogenology*, Volume 73, Issue 9: 1167-1179. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.003>



# ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA PRUEBA DE INMERSIÓN EN AGUA, EMERGENCIA DE RADÍCULA Y *COLD TEST* EN POBLACIONES DE HÍBRIDOS DE MAÍZ DE GERMOPLASMA TEMPLADO Y SUBTROPICAL

## INTRODUCCIÓN

Es indispensable en el mercado de semillas tomar decisiones con respecto al destino de los lotes de producción con rapidez y eficiencia. Disponer de información sobre la calidad de las semillas en términos de germinación y vigor permite decidir el destino del lote, ya sea venta inmediata, conservación, tiempo de conservación, mejor zona geográfica para su siembra en base a las condiciones climáticas de las diferentes regiones ecológicas y, el menos deseado, necesidad de descarte. Existen diferentes pruebas que se pueden utilizar para evaluar el vigor, algunas de ellas ya validadas e incorporadas a las reglas de la Asociación Internacional de Semillas (ISTA por sus siglas en inglés) y otras de uso general o en investigación, pero no validadas por las asociaciones internacionales de análisis de semillas.

El objeto problema de este Capítulo se vincula con la necesidad de conocer el nivel de respuesta de las diferentes pruebas de vigor más rápidas que la prueba de CT, en relación con los dos tipos de materiales de maíz ensayados.

La prueba de vigor bajo análisis en este Capítulo es conocida con distintos nombres tales como: prueba de inmersión, prueba de inundación, prueba de Inmersión en Agua, soaking, soak test, entre otras. En esta tesis, y a los efectos de unificar el nombre del procedimiento, se le asignará el nombre “Prueba de Inmersión en Agua” (PIA) en un todo de acuerdo con lo planteado para la especie maíz por Arango Perearnau (2018).

De modo similar a lo planteado en el Capítulo 3 para el método de Emergencia de Radícula, aquí la Prueba de Inmersión en Agua (PIA) surge como otra prueba de vigor rápida con la cual contrastar el método de *Cold Test* (CT). Por esta razón, es necesario obtener los

datos experimentales correspondientes para realizar la comparación de ambos métodos, ya que tampoco la PIA es utilizada comercialmente para discriminar la calidad fisiológica en el mercado argentino.

Para comenzar, es importante examinar y comprender, desde el fundamento fisiológico, de la PIA (Arango Perearnau, 2018) se trata de una prueba que se ha usado desde hace tiempo en ensayos de investigación con el objeto de caracterizar los materiales genéticos en respuesta al estrés de hipoxia. En particular, los métodos de PIA tienen dos etapas: la inicial de estrés que corresponde a la inmersión en agua durante 24 h y una segunda de germinación normal en cámara. En la primera etapa, el fundamento fisiológico se explica en términos de las diferencias de potenciales entre el sustrato, en este caso, agua corriente a pH neutro y las semillas secas que se sumergen en ella. El contenido de agua determina un ingreso rápido a la semilla seca y esto afecta la permeabilidad de las membranas, ya que no se reconstituyen de manera gradual tal como sucede con una imbibición lenta. Consecuentemente, la prueba PIA se constituye en un estrés que pone a la semilla en condiciones extremas, permitiendo evaluar la calidad de ésta. El otro aspecto para considerar son las temperaturas, ya que afectan el potencial hídrico. Así, a menor temperatura (10°C), la diferencia de potencial va a ser menor que a 25°C, ya que disminuye la energía libre (Argüello, 2023).

Diferentes autores (Crawford, 1978; Martin *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 2004; Arango Perearnau, 2018) mencionan que sumergir las semillas en agua durante un periodo de tiempo y a diferentes temperaturas antes de sembrar da como resultado una germinación reducida de las semillas en muchas especies. Poco se sabe, sin embargo, sobre los mecanismos responsables. Durante la etapa de inmersión se excretan productos finales del metabolismo anaeróbico, tales como el etanol, el acetaldehído y el CO<sub>2</sub> y se acumulan en el agua de remojo. Martin *et al.* (1991) correlacionó negativamente ( $r = -0,99$ ) las cantidades de etanol excretadas durante la inmersión de las semillas con la posterior germinación. Además, otros informes indican que las semillas que tienen cocientes respiratorios aumentados tienden a deteriorarse más rápido y ser de menor calidad. Los resultados de diferentes estudios mencionados por Martin *et al.* (1991), han llevado a la hipótesis de que los productos finales del metabolismo anaeróbico (etanol y acetaldehído) son tóxicos para las semillas y que la inmersión en agua conduce a un aumento de las concentraciones celulares de la semilla.

En definitiva, la PIA reúne las características deseadas en toda prueba de vigor, que son la sencillez en la ejecución, la rapidez y la facilidad en la interpretación de resultados que son, ni más ni menos que, un porcentaje de plántulas normales (Arango Perearnau, 2018).

Los objetivos de este Capítulo fueron evaluar la calidad fisiológica de los lotes de maíz híbrido de germoplasma templado y subtropical en términos de la PIA, comparar la respuesta de los métodos de PIA y CT y determinar el nivel de concordancia de los métodos de ER y PIA con CT.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material biológico**

El material biológico utilizado fue descrito en el Capítulo 2.

### **Prueba de Germinación**

Se aplicó la metodología descrita en el Capítulo 2.

### **Prueba de *Cold Test***

Se aplicó la metodología descrita en el Capítulo 2.

### **Prueba de Emergencia de Radícula**

Se aplicó la metodología descrita en el Capítulo 3.

### **Prueba de Inmersión en Agua**

Para la ejecución de esta prueba se sembraron dos repeticiones de 100 semillas extraídas de la fracción de semilla pura de cada uno de los lotes de híbridos en estudio.

Se ejecutaron dos métodos siguiendo los mismos pasos, y cuya única diferencia fue la temperatura del agua de inmersión para la semilla, a saber:

- PIA10: inmersión en agua desmineralizada a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas  $\pm 15$  minutos.

- PIA25: inmersión en agua desmineralizada a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas  $\pm 15$  minutos.

El primer paso fue sumergir dos repeticiones de 100 semillas cada una en un contenedor plástico con tapa y con 200 cc de agua desmineralizada estabilizada a la temperatura del ensayo correspondiente (PIA10 o PIA25). Los contenedores se incubaron en dos cámaras de germinación, previamente calibradas a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  una (PIA10) y la otra a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (PIA25) durante 24 h  $\pm 15$  minutos.

Una vez finalizada la incubación, se filtró el agua y, cada repetición de 100 semillas fue sembrada en medio de crecimiento arena siguiendo los pasos de la prueba de Germinación descrita en el Capítulo 2.

Es importante mencionar que la evaluación del ensayo se realizó siguiendo los criterios establecidos por ISTA (2021).

Finalmente, se controló que los resultados de plántulas normales de cada repetición obtenidas por muestra se encontrasen en tolerancia estadística según Tabla 15F (ISTA, 2021). En los casos en que el resultado se encontró fuera de tolerancias, se repitió el análisis para dicha muestra. El resultado final se expresó como porcentaje en número de las dos repeticiones realizadas por muestra.

### **Análisis estadístico**

Se siguió la metodología propuesta por Watson y Petrie (2010) para realizar el análisis estadístico de concordancia entre la PIA y el CT. Se utilizó: a) el coeficiente de correlación de concordancia de Lin (Camacho-Sandoval, 2008) como Índice de Confiabilidad para estimar la concordancia de los métodos; b) el Diagrama de Bland-Altman para visualizar el patrón (y extensión) de la concordancia; c) el Coeficiente de Correlación, estimado por el método por filas, para confirmar el grado de asociación entre los métodos en estudio.

Por otra parte, se realizó un análisis multivariado a través de matrices de correlación y de componentes principales (ACP) con el objetivo de conocer y visualizar la relación de las variables utilizadas en el presente estudio e identificar la/las de mayor impacto. En dicho análisis se incluyó la evaluación del poder germinativo y los métodos de vigor aplicados a los 100 lotes de maíz. El tipo de germoplasma (templado y subtropical), el tamaño de la

semilla (grande y pequeño) y su forma (chata y redonda) se incluyeron como variables ilustrativas del análisis.

El coeficiente de correlación de concordancia de Lin y el diagrama de Bland-Altman fueron calculados utilizando los paquetes epiR (Stevenson *et al.*, 2022) y BlandAltmanLeh (Lehnert, 2015) de la herramienta estadística R (R Core Team, 2021) mientras que los análisis de correlación y multivariado se calcularon con el software JMP.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados de todas las pruebas de vigor realizadas en este estudio, incluyendo los resultados de la prueba de Germinación. En términos generales, y como se mencionó en el Capítulo 2, la calidad fisiológica de las muestras correspondientes a los materiales templados fue mayor (germinación promedio 94%) que los subtropicales (germinación promedio 88%). Por su parte, los promedios generales de los métodos de vigor también fueron mayores en los germoplasmas templados (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Resultados en porcentaje de los análisis de Germinación (PG), Cold Test (CT), Prueba de Inmersión a 10°C (PIA10), Prueba de Inmersión a 25°C (PIA25), Emergencia de Radícula a 66 horas (ER 66) y a 144 horas (ER 144) obtenidos de 50 lotes de híbridos de germoplasma templado y 50 lotes de híbridos de germoplasma subtropical, incluyendo los promedios generales por germoplasma. Se añaden características físicas de los lotes respecto a su forma chata (C) o redonda (R) y a su tamaño grande (G) o pequeño (P).

GERMO-PLASMA	ID Híbrido	Muestra N°	Forma	Tamaño	PG	CT	PIA10	PIA25	ER66	ER144
T E M P L A D O S	T01	1	C	G	93	81	64	81	12	5
		2	C	G	88	51	15	27	0	0
		3	C	G	98	82	73	80	3	88
		4	C	P	96	88	80	81	33	16
		5	R	G	93	65	25	47	16	26
		6	R	G	85	74	45	48	2	0
	T02	7	R	G	96	85	78	77	92	93
		8	R	G	89	82	80	66	94	94
		9	R	G	91	85	83	88	92	97
		10	R	P	83	78	68	78	91	98
		11	R	P	92	81	87	88	97	98
		12	R	P	90	86	92	90	95	98
	T03	13	R	G	94	86	92	83	89	97
		14	R	P	96	84	96	92	96	98
	T04	15	C	P	92	83	61	78	75	82
		16	C	P	92	82	47	75	68	62
	T05	17	R	G	94	85	90	83	95	98
		18	R	G	98	86	89	87	95	94
	T06	19	R	G	90	81	81	89	97	98
		20	R	G	83	70	77	79	85	97
		21	R	G	82	78	77	76	97	97
		22	R	G	85	85	77	82	99	94
	T07	23	R	P	86	82	83	78	93	95
		24	R	P	85	88	80	88	89	94
		25	R	G	94	75	12	35	34	24
		26	R	P	95	86	59	77	16	56
		27	C	G	99	98	98	98	99	99
		28	C	G	98	98	100	97	97	98
		29	C	G	99	99	98	98	99	98
		30	C	G	96	98	94	97	97	99
		31	C	G	99	99	96	97	97	98
		32	C	G	99	96	98	99	99	99
	T08	33	C	G	97	98	97	97	99	98
		34	C	G	98	99	96	98	99	98
		35	C	G	99	99	97	96	100	99
		36	C	P	97	97	94	95	97	96
		37	C	P	96	97	94	91	95	96
		38	R	G	97	97	94	99	89	97
		39	R	G	96	93	93	95	92	97
		40	R	P	95	92	93	85	95	93
		41	R	P	95	97	93	93	95	97
		42	R	P	97	98	97	97	98	99
	T09	43	C	P	97	95	95	95	100	99
		44	C	P	100	98	99	98	100	100
		45	R	P	96	90	95	92	90	99
		46	R	P	97	96	99	97	96	99
		47	C	P	99	99	97	100	97	99
		48	C	P	98	95	98	97	98	95
	T10	49	R	G	94	88	82	92	91	94
		50	R	P	91	87	65	83	77	71
PROMEDIO GENERAL					94	88	81	84	81	84
S U B T R O P I C A L	S01	51	R	P	92	80	74	71	51	57
		52	C	G	92	72	39	53	59	77
	S02	53	C	G	99	88	43	53	72	79
		54	C	G	97	75	20	48	52	41
		55	C	G	99	85	45	44	65	67
		56	C	P	98	82	43	55	69	45
		57	R	G	64	34	2	10	0	2
		58	R	G	95	83	12	41	4	2
	S03	59	R	G	94	85	36	49	43	41
		60	R	P	88	56	18	43	24	39
		61	C	G	92	84	70	84	24	22
		62	R	P	89	79	49	65	4	53
	S04	63	C	G	92	63	56	71	39	14
		64	C	G	97	73	61	89	49	71
		65	C	G	90	84	50	63	1	0
		66	C	G	83	53	50	76	45	65
		67	C	G	81	57	49	49	27	53
		68	C	G	87	75	38	70	16	2
		69	C	G	94	76	35	67	1	0
		70	C	G	92	79	74	91	60	27
		71	C	G	84	47	8	17	0	89
		72	C	G	94	61	70	82	70	27
		73	C	G	74	35	9	23	0	0
		74	C	P	90	65	65	72	61	41
		75	C	P	97	66	25	59	2	0
		76	C	P	87	49	19	37	1	0
		77	C	P	90	49	19	47	7	0
		78	R	G	92	67	67	59	8	0
		79	R	G	74	40	4	15	0	1
		80	R	G	75	44	2	11	0	0
	81	R	P	75	48	21	20	0	0	
	S05	82	R	P	91	77	41	71	2	14
		83	R	P	77	44	11	22	0	0
		84	C	G	89	73	28	35	0	0
		85	C	G	99	86	77	89	84	82
		86	C	P	93	85	48	65	40	40
		87	C	P	85	78	48	71	32	27
		88	C	P	99	82	49	70	72	71
		89	R	G	73	83	6	13	0	0
		90	R	P	94	85	48	71	19	72
		91	R	G	41	32	5	20	0	1
	S06	92	R	P	83	41	35	36	2	0
		93	R	P	76	68	44	50	9	36
		94	R	G	86	86	80	84	26	78
	S07	95	R	P	94	53	25	33	7	9
		96	R	P	87	83	73	80	59	77
		97	C	P	91	85	61	77	79	88
	S08	98	C	G	80	40	96	99	94	89
	S09	99	C	G	96	92	93	89	79	91
		100	R	P	95	91	86	79	86	88
PROMEDIO GENERAL					88	68	42	56	31	35

A continuación, la Tabla 4.2 presenta los coeficientes de correlación de concordancia de Lin obtenidos de la comparación de CT con PIA10 y con PIA25, para ambos tipos de germoplasma, con sus correspondientes límites de confianza. Allí se evidencia que, en todos los casos, los valores de dicho coeficiente fueron inferiores a 0,80 y los límites de confianza oscilaron por debajo de 0,84. En este punto, y considerando la calificación de Camacho-Sandoval (2008), se evidencia una concordancia muy pobre (<0.90) entre el CT y ambos métodos de PIA. En consecuencia, los valores de vigor obtenidos por CT no reemplazan de modo directo a los obtenidos a través de las pruebas de PIA para los germoplasmas estudiados. Esto puede ser explicado, desde la óptica de la tecnología de semillas, en términos de que las condiciones de estrés de ambos métodos son distintas y la respuesta de

los materiales dependerá de la calidad intrínseca de los mismos y su capacidad para superar el estrés correspondiente a cada método.

**Tabla 4.2.** Coeficiente de correlación de concordancia de Lin entre CT/PIA10 y CT/PIA25 para germoplasma templado y subtropical

Métodos Comparados	TEMPLADOS			SUBTROPICALES		
	Coef. Lin	IC -L. Inferior	IC - L. Superior	Coef. Lin	IC -L. Inferior	IC - L. Superior
CT - PIA25	0.7602442	0.6599731	0.8339048	0.4731172	0.2763650	0.6318056
CT - PIA10	0.5920958	0.4739177	0.6893223	0.2976666	0.1436198	0.4376296

Valores menores a 0,90 indica concordancia muy pobre (Camacho-Sandoval, 2008).

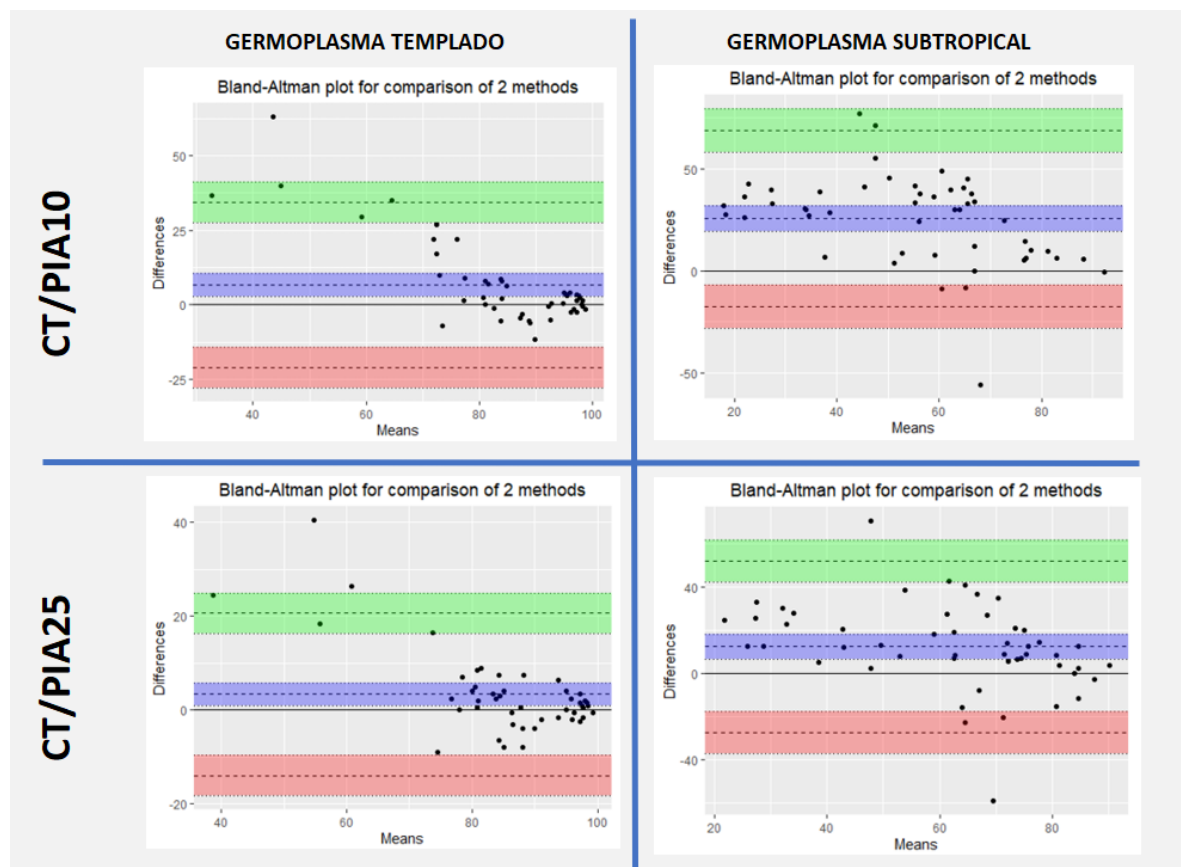
Además, en la tabla 4.3 se muestra un resumen de los estadísticos del análisis de Bland-Altman entre los métodos CT/PIA10 y CT/PIA25. En primer lugar, se observa que el promedio de la diferencia (sesgo) es menor en la comparación de los métodos para germoplasmas templados que para los germoplasmas subtropicales. Esto indica que el comportamiento de ambos germoplasmas frente al estrés generado por lo métodos comparados fue diferente. En segundo lugar, el intervalo de confianza excluye al cero en los germoplasmas analizados, por lo que ambos métodos de PIA son estadísticamente diferentes (Giavarina, 2015) al CT. En igual forma, la amplitud de los intervalos de confianza es impactada por el error estándar, que es mayor para los híbridos de germoplasma subtropical (CT/PIA10: 3,11 y CT/PIA25: 2,86) respecto de los templados (CT/PIA10: 1,99 y CT/PIA25: 1,25).

**Tabla 4.3.** Estadísticos del análisis de Bland-Altman para CT/PIA10 y CT/PIA25, para germoplasma templado y subtropical, incluyendo el error estándar y los intervalos de confianza del promedio de la diferencia.

Métodos	Parámetros	Germoplasma Templado				Germoplasma Subtropical			
		Unidad	Error estándar (se)	Intervalo de Confianza		Unidad	Error estándar (se)	Intervalo de Confianza	
				Desde	Hasta			Desde	Hasta
CT /PIA10	Promedio de la diferencia ( $\bar{d}$ )	6.63	1.99	2.63	10.63	25.48	3.11	19.23	31.73
CT/PIA25	Promedio de la diferencia ( $\bar{d}$ )	3.35	1.25	0,84	5.86	12.27	2.86	6.53	18.01

En relación con este tema, los diagramas de Bland-Altman para el análisis de los resultados obtenidos por CT/PIA10 y CT/PIA25 (Fig. 4.1) exponen gráficamente la falta de constancia de las diferencias promedio a lo largo del rango de calidad estudiado para ambos germoplasmas.

Dentro de este marco, podemos afirmar que para el germoplasma templado el comportamiento de la PIA10 y PIA25 es similar. Así, evidencia una tendencia a subestimar el vigor respecto a CT cuando la calidad promedio es menor a valores cercanos a 75% y a sobreestimarlos cuando presenta valores mayores. Además, en ambos casos se observa que las diferencias promedio son mayores al subestimar que al sobreestimar, lo que indica un mejor ajuste de métodos en el rango de calidad promedio superior a 75%.



**Figura 4.1.** Diagramas de Bland-Altman para los datos de vigor obtenidos por los métodos de CT/PIA10 y CT/PIA25 para germoplasma templado y subtropical. En línea punteada, el promedio de las diferencias ( $\bar{d}$ ) y los límites de concordancia inferior y superior, con la representación de los límites del intervalo de confianza para el promedio de las diferencias (sombreado en azul) y límites de concordancia inferior (sombreado en rosa) y superior (sombreado en verde).



Por otro lado, en el germoplasma subtropical los resultados de la PIA10 muestran una tendencia a subestimar el vigor respecto del valor del CT (Fig 4.1), presentándose diferencias positivas y, en general, de magnitudes superiores a 20%. Esto indica que el estrés generado por la PIA10 tiene mayor impacto en el resultado que el generado por el CT en este tipo de materiales. Dicho comportamiento, se explica por la ausencia de mecanismos adaptativos de este germoplasma al estrés por frío. En lo que respecta a la PIA25, las diferencias con CT fueron comparativamente menores que PIA10. Asimismo, tiende a subestimar en valores de calidad promedio menores a 70% y tiende a un comportamiento similar al germoplasma templado en valores mayores a 70%, pero con mayor variabilidad.

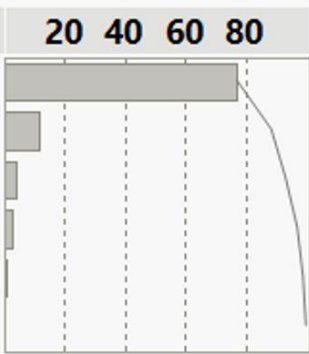
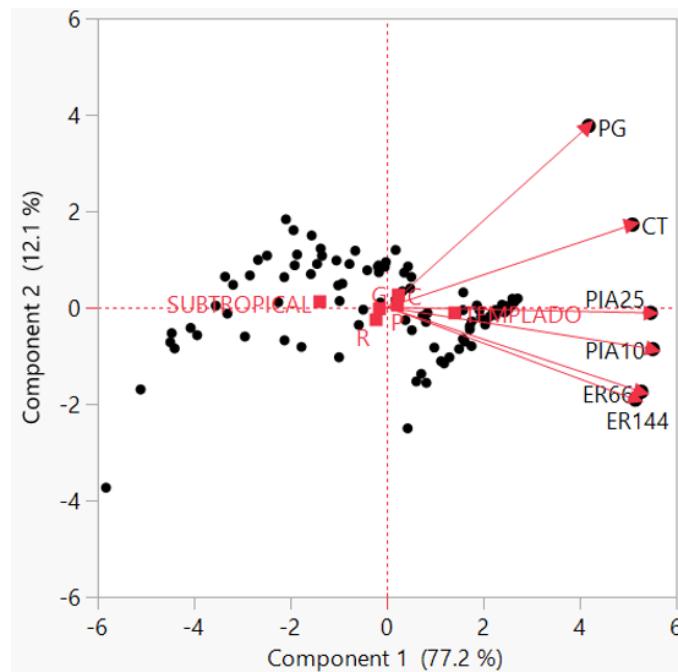
De esta manera, se observa que las PIA tienen resultados de calidad menores, comparadas respecto al CT (siete días a 10°C y cinco a 25°C). Es importante recordar que en CT, la temperatura inicial es igual a PIA10 y menor a PIA25, pero sin la condición de inmersión en agua en ambos casos. La menor temperatura prolonga las fases I y II y la mayor duración del ensayo (12 días final) hacen que su sensibilidad sea menor, bajando su capacidad para discriminar calidades en función del vigor del lote. En síntesis, y al igual que lo analizado en el Capítulo 3 para ER, los métodos PIA y CT tienen niveles de respuesta diferentes desde el punto de vista fisiológico.

Por lo que se refiere a los métodos de vigor ER y PIA estudiados en la presente tesis, es necesario identificar cuál es el que presenta una mayor concordancia con el CT. Así pues, se realizó el análisis exploratorio multivariado, tomando como base los resultados obtenidos en las 100 muestras bajo estudio (Tabla 4.3), a saber: prueba de Germinación (PG), *Cold Test* (CT) como método de vigor de referencia, Emergencia de Radícula (ER) en sus dos versiones de 66 horas (ER 66) y 144 horas (ER 144), y la prueba de Inmersión en Agua a 10°C (PIA10) y a 25°C (PIA25) respectivamente. Asimismo, se incluyeron el tamaño y la forma correspondiente a cada lote de semillas empleado para esta tesis.

Como puede observarse en la Tabla 4.4, la componente principal 1 (CP1) explica el 77,2% de la varianza total de los datos y la CP2 el 12,05% de los mismos. Por lo tanto, con las dos primeras componentes se explica casi el 90% de la variabilidad. Las componentes restantes contribuyen con valores bajos. Por ese motivo, se toman en cuenta para la interpretación sólo las dos primeras componentes a fin de poder construir el biplot.

**Tabla 4.4.** Porcentaje de la variación total explicada por cada componente principal del análisis multivariado sobre 6 métodos de análisis y germoplasma, forma y tamaño de semillas (como variables suplementarias) en 100 lotes de maíz híbrido.

Componentes Principales	Eigenvalue (Valores propios)	% Variación total
CP1	4.6346	77.24
CP2	0.7231	12.05
CP3	0.2764	4.61
CP4	0.2156	3.59
CP5	0.1026	1.71
CP6	0.0478	0.80

Referencias: PG (Germinación), CT (*Cold Test*), ER 66 (Emergencia de Radícula de 66 horas), ER 144 (Emergencia de Radícula de 144 horas), PIA10°C (Prueba de Inmersión en Agua a 10°C), PIA25°C (Prueba de Inmersión en Agua a 25°C); C (semilla de forma Chata), R (semilla de forma Redonda), G (semilla grande), P (semilla pequeña), SUBTROPICAL (lotes de semillas de germoplasma subtropical), TEMPLADO (lotes de semillas de germoplasma templado).

**Figura 4.2.** Representación gráfica de los análisis de Germinación, vigor, forma y tamaño de semilla en función de la CP1 y CP2.

Por su parte, en la Fig 4.2 se muestra la representación gráfica de la ubicación espacial de los seis métodos de análisis aplicados a los lotes de maíz, el tipo de germoplasma, el tamaño y forma de la semilla en función de la Componente Principal 1 (CP1) y Componente Principal 2 (CP2). En este tipo de gráfico, además de indicarse el % de varianza explicada por el primer (CP1) y segundo componente (CP2), las variables positivamente

correlacionadas se agrupan juntas o próximas (Martínez, 2018). Los germoplasmas se ubican de izquierda a derecha dentro del biplot, en un gradiente creciente para todos los métodos evaluados.

**Tabla 4.5.** Coeficiente de correlación de la prueba de *Cold Test* (CT) con los métodos de Germinación (PG), Prueba de Inmersión a 10°C (PIA10), Prueba de Inmersión a 25°C (PIA25), Emergencia de Radícula a 66 horas (ER 66) y a 144 horas (ER 144) obtenido de los resultados de 100 lotes de maíz híbrido y segregado por germoplasmas (50 lotes de híbridos de germoplasma templado y 50 lotes de híbridos de germoplasma subtropical).

Correlación con CT			
Métodos Analíticos	Germ. Templado + Subtropical	Germ. Templado	Germ. Subtropical
PG	0.7296	-	-
PIA10	0.7567	0.8263	0.5347
PIA25	0.7720	0.8723	0.5811
ER 66	0.6815	0.6330	0.4529
ER 144	0.6727	0.6174	0.4455

En la Tabla 4.5 se observa una correlación positiva entre los métodos para los 100 lotes bajo estudio, siendo las más fuertemente correlacionadas la germinación con el CT ( $r=0.7296$ ) y este último con el PIA25 ( $r=0.7720$ ). Esto coincide con Arango Perearnau (2018), quien menciona a la PIA (23°C por 48 h) como una de las más promisorias nuevas herramientas para la evaluación de calidad fisiológica del maíz.

Por otro lado, en la Fig. 4.2 se muestra que los dos tipos de germoplasma se ubican en posiciones opuestas al origen, evidenciando un comportamiento marcadamente distinto entre sí. En este mismo sentido, en diversos trabajos se deja de manifiesto la baja efectividad de métodos de vigor, como el CT, utilizados en híbridos de zonas templadas para evaluar la calidad fisiológica en híbridos de regiones tropicales y subtropicales (Wilson y Trawatha, 1991; Shah *et al.*, 2002; Hamidi *et al.*, 2013). Esto fundamenta la necesidad de discriminar el análisis de métodos para cada tipo de germoplasma.

En lo concerniente al tamaño de semillas, se ubicó en el centro del biplot (Fig. 4.2), de este modo no se evidencia una polarización de los germoplasmas debido al mismo. En relación a la forma se evidencia una leve separación del centro que se condice con lo observado en el Capítulo 2 con respecto a que las semillas chatas (punto ubicado a la derecha del centro del biplot) presenta valores mayores en las variables evaluadas respecto a las semillas redondas. Esto coincide con lo mencionado por Mendoza *et al.* (2004) quienes

sostienen que se encontró mayor vigor y germinación en la semilla ubicada en la parte basal y media de la mazorca, lugar en donde se ubican mayormente las semillas achatadas.

## CONCLUSIONES

Del análisis comparativo entre todos los test de vigor ensayados y germoplasmas estudiados surge que, la PIA25 es la que mayor asociación mostró con respecto del CT. En referencia a la respuesta del material genético, los dos tipos de germoplasma evidencian un comportamiento marcadamente distinto entre sí en relación con los métodos de vigor ensayados. Así, esto fundamenta la necesidad de discriminar la elección de un método de vigor en función del tipo de germoplasma.

Ninguno de los métodos de vigor alternativos incluidos en este trabajo admiten un reemplazo directo de la prueba de CT. Sin embargo, se identifica a la PIA25 como el método de vigor más rápido, fácil de estandarizar y con un resultado más ajustado a la prueba de CT. Esta prueba presenta la ventaja de ser más rápida que el CT, ya que logra resultados a los 8 días en comparación con los 12 días que requiere la prueba de CT.

En resumen, de los métodos de vigor estudiados, la PIA25 es el método de vigor que presentó la mayor concordancia y correlación con la prueba de CT respecto de los otros métodos evaluados en este trabajo, tanto en germoplasmas templados como subtropicales. Por ello, es la técnica sugerida para reemplazar el CT, aunque no de manera directa, cuando es urgente reducir los tiempos de obtención de resultados para la toma de decisiones.

## BIBLIOGRAFÍA

- ARANGO PEREARNAU, M. R. 2018. Caracterización de la calidad de lotes de maíz (*Zea mays* L.) para su uso como simiente a través de ensayos fisiológicos y bioquímicos. Tesis Doctoral en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario.
- ARGÜELLO, J. A. 2023. Fundamentos fisiológicos de la prueba PIA a 10 y a 25°C. Comunicación personal.
- CAMACHO-SANDOVAL, J. 2008. Coeficiente de concordancia para variables continuas. Acta Médica Costarricense, 50(4), 211-212. Retrieved June 23, 2022, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022008000400005&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022008000400005&lng=en&tlng=es).
- CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Ed.). Germinação: Do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 9: 146-162.

- CRAWFORD, R. M. M. 1978. Metabolic adaptations to anoxia. In: Hook, D.D.; Grawford, R.M.M. (Ed.). Plant life in anaerobic environments. Ann Arbor, Ann Arbor Sciences, p. 119-136.
- GIAVARINA, D. 2015. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*, 25(2):141–51. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.015>
- HAMIDI, A., H. NIAMANESH, B. MOTISHAR, E. REZVANI, B. OSKOIL, V. ASKARI AND J. REZAZADEH. 2013. Determination of best suitable seed vigor test for various maize (*Zea mays* L.) hybrids. Final research report. Seed and Plant Certification and Registration Institute of Iran (in Persian with English abstract).
- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2021. International Rules for Seed Testing. Zurich. 300 pp.
- LEHNERT, B. 2015. BlandAltmanLeh: Plots (Slightly Extended) Bland-Altman Plots. R package version 0.3.1. <https://CRAN.R-project.org/package=BlandAltmanLeh>
- MARTIN, B. A.; CERWICK, S. F.; REDING, L. D. 1991. Physiological basis for inhibition of maize seed germination by flooding. *Crop Science*, 31:1052-1057.
- MARTÍNEZ, C. G. 2018. Análisis de componentes principales (PCA). Apuntes personales sobre análisis de componentes principales, con un ejemplo en R aplicado sobre datos de expresión génica.
- MENDOZA ELOS, M., LATOURNERIE L., MORENO E., CASTAÑÓN G., CARRILLO J.C., DE LEÓN C., GARCÍA J. G. (2004). Cambios en la calidad de la semilla de maíz durante su desarrollo y maduración. *Agronomía Mesoamericana* 15 (2): 155-160.
- R CORE TEAM. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>
- STEVENSON, M., SERGEANT, E. with contributions from Telmo Nunes, Cord Heuer, Jonathon Marshall, Javier Sanchez, Ron Thornton, Jenő Reiczigel, Jim Robison-Cox, Paola Sebastiani, Peter Solymos, Kazuki Yoshida, Geoff Jones, Sarah Pirikahu, Simon Firestone, Ryan Kyle, Johann Popp, Mathew Jay, Charles Reynard, Allison Cheung, Nagendra Singanallur, Aniko Szabo and Ahmad Rabiee. (2022). epiR: Tools for the Analysis of Epidemiological Data. R package version 2.0.48. <https://CRAN.R-project.org/package=epiR>
- WATSON, P. F.; PETRIE, A. 2010. Method agreement analysis: A review of correct methodology. *Theriogenology*, Volume 73, Issue 9: 1167-1179. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.003>
- WILSON D.O. AND S.E. TRAWATHA. 1991. Physiological maturity and vigor in production of Florida stay sweet shrunken-2 sweet corn seed. *Crop Sci.* 31(6): 1640–1647.

### CONCLUSIONES GENERALES

- Las evidencias experimentales demostraron que las poblaciones de germoplasma templado y subtropical presentan diferente comportamiento respecto a la germinación y a los diferentes métodos de vigor ensayados en la presente tesis.

- Por un lado, la calidad fisiológica de la población de lotes de semilla de germoplasma subtropical en condiciones óptimas de germinación fue más baja que la evidenciada por la población de materiales templados lo que supone dos cosas, o el material utilizado en este ensayo fue de calidad más baja que los templados o la calidad fisiológica de los materiales subtropicales tiende a ser menor que la de los templados.

- La población de lotes de semilla híbrida de maíz de germoplasma templado y subtropical tuvieron un nivel de respuesta diferente ante el estrés generado por el método de CT. En híbridos subtropicales, este método generó un estrés mayor, lo que podría explicarse por un menor nivel de respuesta fisiológica en términos de la capacidad de adaptación a la germinación en frío. En cambio, en la población de híbridos templados, el nivel de respuesta al CT fue mejor, ya que posee mecanismos fisiológicos moleculares adaptativos, lo que permitiría que sea utilizado como predictor de emergencia a campo en condiciones ambientales semejantes al estrés de frío.

- La respuesta del CT para evaluar la calidad en maíz depende del genotipo que se trate y de la calidad intrínseca del material, es decir que ante mejor calidad fisiológica se obtendrá un mejor resultado de vigor. Por otro lado, y atendiendo la duración de la prueba CT (12 días) desde el punto de vista fisiológico, y en comparación con ER y PIA, la fase I y II cuentan con tiempo suficiente como para reorganizarse lo que explica su menor exigencia como prueba de calidad.

- Los métodos de ER no reemplazan el CT, lo que se fundamenta en el hecho que no existe ni concordancia ni asociación entre ambos. Desde el punto de vista fisiológico, se

puede basar en que ambas pruebas tienen diferencias con relación al tiempo de la respuesta trifásica.

- La ER como prueba de evaluación de calidad en general subestima los valores en la población de germoplasma subtropical, lo que explicaría lo restrictivo de esta prueba para ese tipo de materiales. En cambio, en las poblaciones de materiales templados permitiría discriminarlos más categóricamente. Estos hallazgos indican el valor condicional que tiene el ER como prueba de evaluación de calidad.

- En referencia a la respuesta del material genético, los dos tipos de germoplasma evidencian un comportamiento marcadamente distinto entre sí en relación con los métodos de vigor ensayados. Así, esto fundamenta la necesidad de discriminar la elección de un método de vigor en función del tipo de germoplasma.

- Ninguno de los métodos de vigor alternativos estudiados en este trabajo admiten un reemplazo directo de la prueba de CT. Sin embargo, y a los fines de determinar el método de vigor más rápido, fácil de estandarizar y con un resultado más ajustado a la prueba de CT, se identifica a la PIA25. Esta prueba presenta la ventaja de ser más rápida que el CT, ya que logra resultados a los 8 días en comparación con los 12 días que requiere la prueba de CT.

- En resumen, de los métodos de vigor estudiados, la PIA25 es el método de vigor que presentó la mayor concordancia y correlación con la prueba de CT respecto de los otros métodos evaluados en este trabajo, tanto en germoplasmas templados como subtropicales. Por ello, es la técnica sugerida para reemplazar el CT, aunque no de manera directa, cuando es urgente reducir los tiempos de obtención de resultados para la toma de decisión.

- Debido a lo planteado en el Capítulo 2 de esta tesis, se plantea la necesidad de determinar la calidad fisiológica de los materiales subtropicales en condiciones óptimas de germinación respecto de los materiales templados.

- Por lo mencionado en el Capítulo 2 y 4 de este trabajo, queda planteada la necesidad de realizar futuras investigaciones respecto al impacto de la forma de las semillas de maíz (chatas y redondas) en la calidad fisiológica a través de los resultados de vigor.