



*Doctorado en Recursos Naturales - Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional del Nordeste*

Respuesta fisiológica de genotipos de maíz (*Zea mays*
L.) al estrés térmico por alta temperatura durante el
periodo crítico del cultivo

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional
del Nordeste - Área de Recursos Naturales*

Nicolás Neiff
Ingeniero Agrónomo
Facultad de Ciencias Agrarias - UNNE

Director de Tesis

Oscar Rodolfo Valentinuz

Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Entre Ríos

M. Sc., Universidad Nacional de Mar de Plata

Doctor, University of Guelph, Canadá

Co-Director de Tesis

Fernando Héctor Andrade

Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Buenos Aires

M. Sc., Iowa State University, USA

Doctor, Iowa State University, USA

III

"Experiencia e imaginación siguen vías paralelas, aunque va muy retardada aquella respecto de ésta. La hipótesis vuela, el hecho camina; a veces el ala rumbea mal, el pie pisa siempre firme; pero el vuelo puede rectificarse, mientras el paso no puede volar nunca".

José Ingenieros

IV

Dedicatoria:

*A mis Directores, Oscar y Fernando:
Quienes siempre fueron mi fuente de motivación, ambos manifestando
una calidad de persona excepcional, siendo un honor ser uno de sus
alumnos.*

*A mis Padres, Alicia y Juan José:
Quienes han sembrado en mí la curiosidad y apoyaron todos mis
proyectos. A ellos, que son los nobles faroles que alumbran mi camino.*

*A mi Novia, Yael:
Quien me ha dado fuerzas para conducir este trabajo y me acompañó
incondicionalmente con su cariño y afecto.*

Agradecimientos:

La realización de este trabajo de tesis fue realmente una muestra de solidaridad y compromiso por parte de personas e instituciones. Deseo expresar mi profundo agradecimiento a mis Directores por la confianza depositada en mí y el apoyo incondicional de muchas personas para que este trabajo haya alcanzado esta etapa. Mínimamente quisiera nombrar en este apartado toda pieza que formó parte de este trabajo:

Guillermo Zacarías
Noelia May Petroff
Yael Namtz
José Morello
Emanuel Casañas
Matías Neiff
Personal del Campo Experimental
Carlos Cargmañola
Celsa Balbi
Silvia Mazza
Laura Giménez
Patricia Angeloni
José Tarragó
Ricardo Ranea
Darío Olezchuck
Alberto Peper
Juan Ignacio Rattalino
Constanza Carrera
Mariano Cossani
Samuel Trachsel
Edmundo Ploschuk

Universidad Nacional del Nordeste
CONICET
Facultad de Ciencias Agrarias
CECOAL
INTA Paraná
Fundación ArgenINTA
Nodo-NEA de Ecofisiología (INTA)
Ecofisiología de Cereales -
INTA Balcarce
Monsanto Argentina
Genética y Fitotecnia - FCA
Fisiología Vegetal - FCA
Instituto Agrotécnico - FCA
Fitosan S.R.L
Fisiología de maíz - CIMMYT
Ce.Te.Pro

A todos Ustedes, ¡muchas gracias!

Publicaciones derivadas de esta Tesis:

Trabajos científicos publicados en revistas con referato:

Neiff, N., Trachsel, S., Valentinuz, O., Balbi, C., Andrade, F. 2016. High Temperatures around Flowering in Maize: Effects on Photosynthesis and Grain Yield in Three Genotypes. *Crop Sci.* 56: en prensa. doi: 10.2135/cropsci2015.12.0755.

Neiff, N., Dhliwayo, T., Suarez, E.A., Burgueño, J., Trachsel, S., 2015. Using an Airborne Platform to Measure Canopy Temperature and NDVI under Heat Stress in Maize. *J. Crop Improv.* 29, 669–690. doi:10.1080/15427528.2015.1073643

Trabajos científicos publicados en reuniones científicas y técnicas:

Neiff, N., May Petroff, N., Mazza, S., Valentinuz, O. ¿Es importante el momento de medición de senescencia del cultivo de Maíz para la selección de genotipos tolerantes a estrés por alta temperatura?. Argentina. Corrientes. 2016 Resúmen. Reuniones Científicas y Técnicas. Universidad Nacional del Nordeste.

Neiff, N., Balbi C., Mazza S. Variaciones en fotosíntesis de hoja y eficiencia fotosintética de tres híbridos de maíz expuestos a estrés térmico durante el periodo crítico del cultivo. Argentina. La Plata. 2015. Libro. Resúmen. Jornada. XXIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo. Universidad Nacional de la Plata.

Neiff, N., Valentinuz, O, Balbi, C., Andrade, F. Relaciones entre fotosíntesis de hoja, biomasa producida y número de granos en híbridos de maíz expuestos a estrés por alta temperatura. Argentina. CABA. 2014. Libro. Resúmen. Congreso. XV Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal, XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal

Burgueño J.; Rodrigues A; Trachsel, S; Ortiz-Monasterio, I.; Zarco-Tejada P.; Ammar K.; Gérard, B.; **Neiff, N.**; Pacheco, A.; Alvarado, G. High throughput phenotyping: selection of correct traits for plant breeding programs. Francia. Beaune. PhenoDays 2014.

Neiff, N.; Valentinuz, Oscar; Balbi, C.; Andrade, F. Respuesta fotosintética de híbridos de maíz sometidos a estrés por alta temperatura. Argentina. CABA. 2013. Libro. Resúmen. Workshop. II Workshop Internacional de Ecofisiología Vegetal aplicada al estudio de la determinación del rendimiento y la calidad de los cultivos de granos. FAUBA; INTA; SAFV; RAICES; UIB

Índice General

| | |
|--|-------|
| Agradecimientos:..... | VIII |
| Publicaciones derivadas de esta Tesis: | IX |
| Índice General | XI |
| Índice de Tablas..... | XIV |
| Índice de Figuras | XV |
| Abreviaturas | XVII |
| Resumen | XVIII |
| Abstract | XIX |
| CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 1 |
| 1.1. Importancia del estrés térmico causado por altas temperaturas y su relación con el cambio climático | 2 |
| 1.2. Principales mecanismos y procesos fisiológicos afectados por altas temperaturas.. | 4 |
| 1.3. Crecimiento y fotosíntesis de hoja: su relación con la biomasa y el rendimiento en grano en el cultivo de maíz..... | 6 |
| 1.4. Índices de vegetación y su potencial aporte en los programas de mejoramiento por altas temperaturas | 8 |
| 1.5. Hipótesis | 10 |
| 1.6. Objetivos..... | 10 |
| 1.6.1. Generales: | 10 |
| 1.6.2. Específicos:..... | 10 |
| CAPÍTULO II: PRINCIPALES MECANISMOS Y PROCESOS FISIOLÓGICOS AFECTADOS POR ALTAS TEMPERATURAS..... | 11 |
| 2.1 Introducción..... | 12 |
| 2.2 Objetivo | 12 |
| 2.3 Materiales y métodos..... | 12 |
| 2.3.1 Establecimiento de los experimentos..... | 12 |
| 2.3.2 Generación del estrés térmico..... | 13 |
| 2.3.3 Mediciones de intercambio gaseoso, temperatura de hoja y fluorescencia de clorofila. | 14 |
| 2.3.4 Determinación de Estabilidad de Membranas | 15 |
| Análisis Estadístico..... | 16 |
| 2.4 Resultados..... | 17 |
| 2.4.1. Efecto de los regímenes térmicos sobre la temperatura foliar y las variables relacionadas con el intercambio gaseoso | 17 |
| 2.4.2. Variaciones en la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) y el daño celular relativo (DCR) debido a estrés por altas temperaturas..... | 20 |
| 2.4.3. La fotosíntesis de hoja ($A_{máx}$) y su asociación con los rasgos medidos..... | 21 |

| | |
|---|----|
| 2.5. Discusión | 24 |
| 2.5.1. Efectividad de los tratamientos..... | 24 |
| 2.5.2. Modificaciones en la conductancia estomática (gs) y la transpiración (E) durante el calentamiento | 24 |
| 2.5.3. Efectos del calentamiento sobre la fotosíntesis de hoja (Amáx), la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) y la estabilidad de las membranas celulares..... | 25 |
| 2.6. Conclusiones..... | 27 |
| CAPÍTULO III: ALTAS TEMPERATURAS DURANTE EL PERIODO CRÍTICO EN MAÍZ: EFECTOS SOBRE LA FOTOSÍNTESIS Y EL RENDIMIENTO EN GRANO | |
| 3.1 Introducción..... | 29 |
| 3.2 Objetivo | 29 |
| 3.3 Materiales y métodos..... | 29 |
| 3.3.1 Manejo del cultivo y diseño experimental | 29 |
| 3.3.2 Regímenes térmicos y generación del estrés térmico | 30 |
| 3.3.3. Mediciones de fotosíntesis de hoja (Amáx)..... | 31 |
| 3.3.4. Rasgos agronómicos y procesamiento de las muestras..... | 33 |
| 3.4 Resultados..... | 35 |
| 3.4.1. Condiciones ambientales en los invernáculos: Temperatura, Humedad relativa y Concentración de CO ₂ | 35 |
| 3.4.2. Efectos del calentamiento | 37 |
| 3.4.3. La fotosíntesis de hoja (Amáx): su relación con el crecimiento y el rendimiento del cultivo | 38 |
| 3.4.4. Interacciones entre los genotipos y los regímenes térmicos | 40 |
| 3.5 Discusión | 42 |
| 3.5.1. Consecuencias del calentamiento artificial | 42 |
| 3.5.2. Efectos generales de las altas temperaturas alrededor de floración | 42 |
| 3.5.3. Potenciales mecanismos de tolerancia al estrés térmico que expliquen las diferencias genotípicas | 44 |
| 3.6 Conclusiones..... | 46 |
| CAPÍTULO IV: TEMPERATURA DE CANOPEO Y NDVI, SU POTENCIAL APORTE EN PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO POR ESTRÉS TÉRMICO ALREDEDOR DE FLORACIÓN | |
| 4.1. Introducción..... | 48 |
| 4.2. Objetivos: | 48 |
| 4.3. Materiales y Métodos: | 48 |
| 4.3.1. Condiciones ambientales y características del germoplasma utilizado | 48 |
| 4.3.2 Rasgos agronómicos | 49 |
| 4.3.3 Mediciones de Temperatura de Canopeo y NDVI utilizando un vehículo aéreo | 49 |

| | |
|--|----|
| 4.3.4. Análisis estadístico | 50 |
| 4.4. Resultados..... | 53 |
| 4.4.1. Efectos del estrés térmico por altas temperaturas bajo dos regímenes hídricos alrededor de floración..... | 53 |
| 4.4.2. Heredabilidad, Correlaciones Genéticas y Ganancias Genéticas..... | 54 |
| 4.4.3. Índices de selección | 58 |
| 4.5. Discusión | 60 |
| 4.5.1. Ventajas del uso de vehículos aéreos en programas de mejoramiento por altas temperaturas | 60 |
| 4.5.2. Efectos del estrés térmico por altas temperaturas sobre el rendimiento en grano bajo condiciones hídricas óptimas vs. restricciones hídricas durante la floración | 60 |
| 4.5.4. La temperatura de Canopeo y el NDVI pueden ser utilizados en programas de mejoramiento | 62 |
| 4.6. Conclusiones..... | 64 |
| CAPÍTULO V: CONSIDERACIONES FINALES | 65 |
| 5.1. Introducción..... | 66 |
| 5.2. Principales aportes..... | 66 |
| 5.2.1. Fisiología del estrés térmico en condiciones de campo | 66 |
| 5.2.2. La fotosíntesis de hoja y su relación con el crecimiento y el rendimiento de maíz bajo episodios de estrés térmico por altas temperaturas..... | 67 |
| 5.2.3. La temperatura de canopeo y el NDVI como herramientas en los programas de mejoramiento por altas temperaturas. | 67 |
| 5.2.4. Breve síntesis de la sección | 69 |
| 5.3. Posibles líneas de investigación basadas en este trabajo de tesis..... | 69 |
| 5.3.1. Duración del estrés por altas temperaturas y su impacto sobre el rendimiento en grano en maíz. | 69 |
| 5.3.2. Altas temperaturas diurnas y nocturnas. | 69 |
| 5.4 Consideraciones finales | 70 |
| REFERENCIAS | 71 |

Índice de Tablas

| | |
|---|-------------|
| <i>Contenido</i> | <i>Pág.</i> |
| Tabla 3.1: Datos correspondientes a las temperaturas medias, mínimas y máximas del aire y la humedad relativa (HR) medidas durante el calentamiento..... | 31 |
| Tabla 3.2: Efectos de los regímenes térmicos sobre la fecha de floración femenina (días a R1) y el intervalo entre floración femenina y masculina (ASI)..... | 34 |
| Tabla 3.3: Concentración promedio de CO ₂ a diferentes niveles del canopeo..... | 35 |
| Tabla 3.4: Efecto de los regímenes térmicos (RT) sobre la fotosíntesis de la hoja de la espiga (Amáx), la tasa de crecimiento del cultivo (TCC), el número de granos (NG), el rendimiento en grano (RG) y el peso de grano (PG)..... | 39 |
| Tabla 3.5: Correlaciones de Pearson entre la fotosíntesis de la hoja de la espiga (Amáx) y la tasa de crecimiento del cultivo (TCC), el número de granos (NG), el rendimiento en grano (RG) y el peso de grano (PG)..... | 39 |
| Tabla 4.1: Valores promedio, mínimos, máximos, así como el primer y tercer cuartil para el rendimiento de grano (RG), la temperatura de canopeo (TC), el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI), los días a floración femenina (Días a R1) y el intervalo entre floración femenina y masculina (ASI)..... | 54 |
| Tabla 4.2: Componentes de la variancia y la heredabilidad del rendimiento de grano (RG), la temperatura de canopeo (TC), el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI), los días a floración femenina (Días a R1) y el intervalo entre floración femenina y masculina (ASI)..... | 56 |
| Tabla 4.3: Correlaciones genéticas entre la temperatura de canopeo (TC), el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI), los días a floración femenina (Días a R1) y el intervalo entre floración femenina y masculina (ASI) con el rendimiento en grano (RG). | 57 |
| Tabla 4.4: Ganancias genéticas esperadas entre las variables medidas en ensayos de altas temperaturas bajo dos condiciones hídricas: sin limitantes hídricas (ET) y con restricciones hídricas en floración (ET+EH)..... | 58 |

Índice de Figuras

Contenido.....Pág.

Figura 1.1: Frecuencias con temperaturas entre 35 y 45°C en el periodo reproductivo de maíz a nivel mundial..... 3

Figura 1.2: Cambios debido a estrés térmico por altas temperaturas en los procesos fisiológicos considerados claves y su impacto en el rendimiento final..... 7

Figura 2.1: Invernáculos tipo túnel (30 m² c/u) utilizados para la aplicación de los regímenes térmicos. Los arcos en cada invernáculo delimitan las sub-parcelas (10 m²) donde fueron sembrados los tres genotipos de genética contrastante..... 14

Figura 2.2: Esquema representativo de un día de calentamiento en los dos momentos donde se realizaron los calentamientos..... 16

Figura 2.3: Efectos del estrés térmico y la recuperación posestrés en la temperatura foliar (TF). Los datos corresponden a tres genotipos de maíz bajo tres regímenes térmicos..... 17

Figura 2.4: Efectos del estrés térmico y la recuperación posestrés en la conductancia estomática (gs) y la transpiración (E)..... 18

Figura 2.5: Efectos del estrés térmico y la recuperación posestrés en la fotosíntesis de hoja (Amáx)..... 19

Figura 2.6: Efectos del estrés térmico y la recuperación posestrés en la eficiencia fotosintética (F_v/F_m)..... 20

Figura 2.7: Daño celular relativo (%) en hojas de la espiga obtenidas en pre- y posfloración a los 7 y 14 días de iniciado el tratamiento térmico..... 22

Figura 2.8: Bi-plots correspondientes al análisis de componentes principales obtenidos con datos durante 120 (A) y 240 (B) min de iniciado el calentamiento..... 23

Figura 3.1: Evolución promedio de la temperatura del aire a nivel de la espiga en parcelas con calentamiento artificial y parcelas control durante el periodo de tratamiento en tres híbridos de maíz..... 32

Figura 3.2: Evolución de la temperatura durante un día de tratamiento en distintas posiciones del canopeo (1, 1,5, 2 y 2,5 m) en un invernáculo cerrado (A) y la evolución

de la temperatura a nivel de la espiga en un invernáculo control y calentado (B)..... 36

Figura 3.3: Respuesta del número de granos a las variaciones en la tasa de crecimiento en el período crítico (TCC_{PC})..... 38

Figura 3.4: Relaciones entre las tasas de crecimiento del cultivo (TCC_{PC} ; TCC_{PRE} y TCC_{POS}) y la fotosíntesis de hoja..... 41

Figura 4.1: Temperaturas y precipitaciones medidas a través del periodo de crecimiento del cultivo expresado en días después de la siembra..... 49

Figura 4.2: Imagen térmica incluyendo el total de parcelas evaluadas en condiciones de alta temperatura con (ET+EH) y sin limitantes hídricas alrededor de la floración (ET).
..... 51

Figura 4.3: Relaciones entre el rendimiento en grano con la temperatura de canopeo (A) y el NDVI (B). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a los tratamientos de altas temperaturas sin limitantes hídricas (ET) y con restricciones hídricas en floración (ET+EH), respectivamente..... 55

Figura 4.4: Bi-plots en función de variables estandarizadas muestra los componentes principales 1 y 2. Las variables utilizadas fueron el rendimiento en grano (RG), la temperatura del canopeo (TC), el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI) y la fecha de floración femenina..... 56

Figura 4.5: Curvas característica operativa del receptor (Curvas ROC) obtenidas para tres índices de selección y temperatura del canopeo (TC)..... 59

Abreviaturas

| | |
|--------------------|---|
| ΔT | Efecto del calentamiento |
| ACP | Análisis de componentes principales |
| Amáx | Fotosíntesis de hoja |
| ASI | Intervalo entre floración femenina y masculina |
| C | Tratamiento control |
| Ci | Concentración de CO ₂ en la cámara sub-estomática |
| CMS | Estabilidad de membranas |
| CP | Componente principal |
| DCR | Daño celular relativo |
| DDS | Días después de siembra |
| E | Transpiración |
| ET | Tratamiento de estrés por altas temperaturas sin limitantes |
| ET+EH | Tratamiento de estrés por altas temperaturas con limitantes hídricas en floración |
| Exp | Experimento |
| F_v/F_m | Eficiencia fotosintética |
| GEN | Genotipo |
| gs | Conductancia estomática |
| H1 | Tratamiento con incremento térmico en prefloración |
| H2 | Tratamiento con incremento térmico en posfloración |
| ITE | Índice de temperaturas estresantes |
| msnm | Metros sobre el nivel del mar |
| NDVI | Índice de vegetación diferencial normalizado |
| NG | Número de granos m ⁻² |
| PG | Peso de granos |
| RG | Rendimiento en grano |
| ROC | Curva ROC |
| RT | Régimen térmico |
| S1 | Índice de selección 1 (RG+ASI+NDVI+TC) |
| S2 | Índice de selección 2 (ASI+NDVI+TC) |
| S3 | Índice de selección 3 (NDVI+TC) |
| TC | Temperatura de canopy |
| TCC | Tasa de crecimiento del cultivo |
| TCC _{PC} | TCC durante el periodo crítico para la fijación de granos |
| TCC _{POS} | TCC durante posfloración |
| TCC _{PRE} | TCC durante prefloración |
| Te | Híbrido templado |
| TF | Temperatura foliar |
| Tr | Híbrido tropical |
| Tx | Híbrido templado x tropical |

Resumen

Respuesta fisiológica de genotipos de maíz (*Zea mays* L.) al estrés térmico por alta temperatura durante el periodo crítico del cultivo.

El incremento de las temperaturas a nivel mundial ha demostrado ser un fenómeno cada vez más preocupante. Numerosos trabajos enfatizan que la frecuencia con temperaturas supra-óptimas aumentará, siendo la intensidad y la duración del estrés los que determinen las mermas en el rendimiento en grano. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del estrés térmico por altas temperaturas sobre procesos fisiológicos y la determinación del rendimiento en diferentes genotipos de maíz. Los ensayos conducidos en este estudio involucraron: (i) altas temperaturas generadas en invernáculos de polietileno aplicadas en pre- y posfloración del cultivo en tres genotipos contrastantes de maíz y (ii) altas temperaturas bajo dos condiciones hídricas en floración analizando 71 genotipos subtropicales de maíz. La fotosíntesis de hoja, la eficiencia fotosintética y la estabilidad de membranas fueron afectadas por las altas temperaturas y se identificaron diferencias en tolerancia al calor en tres genotipos de genética contrastante. Las máximas reducciones en fotosíntesis de hoja se presentaron minutos antes de liberado el estrés, obteniéndose recuperaciones pos-estrés excepcionalmente rápidas comparadas con otras investigaciones. La fotosíntesis de hoja medida durante el periodo crítico del cultivo estuvo asociada con las tasas de crecimiento en dicho periodo. Además, los genotipos que presentaron menores disminuciones en fotosíntesis de hoja fueron los que tuvieron mayor fijación de granos. De esta manera, las reducciones en la fotosíntesis de hoja como resultado de las altas temperaturas estuvieron directamente relacionadas con las variaciones en la tasa de crecimiento del cultivo, el número de granos y el rendimiento. Cuando se pretende evaluar una gran cantidad de genotipos, la temperatura de canopeo y el NDVI (obtenidas por imágenes aéreas) demostraron ser útiles en el proceso de selección por tolerancia a estrés térmico por altas temperaturas. Los genotipos con canopeos más frescos y menos afectados en su índice de verdor (*i.e.*, NDVI) tuvieron las menores mermas en rendimiento en grano. La utilización de índices de selección en ensayos con altas temperaturas bajo dos condiciones hídricas puede significar una potencial mejora en el proceso de selección.

Palabras clave: fotosíntesis, recuperación, cambio climático, rendimiento en grano

Abstract

Physiological response of maize genotypes to heat stress around flowering

Worldwide rising temperatures have proved to be an increasing concern. Various researches highlight that the frequencies with supra-optimum temperatures will increase being intensity and duration of heat stress the factors that determine yield losses. The objective of this thesis was to analyze the heat stress effects on physiological processes and yield determination in different maize genotypes. Field experiments involve: (i) high temperatures achieved by polyethylene shelters in pre- and post-flowering and, (ii) high temperatures under two irrigation conditions around flowering analyzing 71 subtropical maize genotypes. Leaf photosynthesis, photosynthetic efficiency and cell membrane stability were affected by heat stress with differences among three maize genotypes of contrasting background. Maximum leaf photosynthesis reductions were observed minutes before the end of the daily heat stress period. Leaf photosynthesis and others physiological traits presented post-stress recoveries higher than those observed by other researchers. Leaf photosynthesis measured during the critical period for yield determination was associated with crop growth rates during the same period. Furthermore, maize genotypes that presented lower reductions on leaf photosynthesis also presented lower kernel abortion. In this sense, changes on leaf photosynthesis because of high temperatures were directly related to crop growth rate, kernel number and grain yield. Canopy temperature and NDVI (obtained by aerial images) showed to be helpful in the selection process of tolerant maize genotypes under high temperature conditions. Based on assessment of 71 subtropical maize genotypes, lower canopy temperatures and higher NDVI values were associated with higher grain yields. The use of selection indices could contribute to improve the selection process for heat stress tolerance.

Key words: photosynthesis, recovery, climate change, grain yield.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Importancia del estrés térmico causado por altas temperaturas y su relación con el cambio climático

La problemática de las altas temperaturas se ha acentuado en las últimas décadas como consecuencia al cambio climático a nivel mundial. Así, las temperaturas anuales a nivel global tuvieron un incremento de 0,4°C a partir de 1980, con mayores aumentos observados en diferentes regiones del mundo (IPCC, 2014). Aproximadamente desde el 2000, las máximas temperaturas diarias explicaron, con la misma eficacia que las precipitaciones, la variabilidad de los rendimientos históricos en Francia a partir del número acumulado de días con temperaturas máximas por encima de 32°C. (Hawkins *et al.*, 2013).

El estrés térmico por altas temperaturas afecta a los principales cultivos producidos a nivel mundial (Wahid *et al.*, 2007), incluyendo los principales cereales (Barnabás *et al.*, 2008; Eyshi Rezaei *et al.*, 2015). Por ejemplo, las altas temperaturas en el cultivo de trigo están asociadas con reducciones en el número de granos (Stone y Nicolas, 1995; Ferris *et al.*, 1998; Porter y Semenov, 2005), el peso y la calidad de los granos (Spiertz *et al.*, 2006). En el cultivo de arroz, existen evidencias de una alta sensibilidad a las temperaturas tanto diurnas como nocturnas (Mohammed y Tarpley, 2009).

En el cultivo de maíz (*Zea mays* L.), el estrés térmico por altas temperaturas es aquel que se produce al superarse la temperatura considerada óptima para los procesos básicos asociados con el crecimiento, generalmente temperaturas superiores a los 35°C (Ritchie y Smith, 1991). Al igual que para otros estreses abióticos (tales como sombreos, altas densidades, déficit hídrico o nitrogenado), el momento de máxima sensibilidad al estrés por altas temperaturas ha sido determinado alrededor de floración (Rattalino Edreira *et al.*, 2012). Algunos primeros indicios fueron los encontrados por Shaw (1977), quien determinó que las reducciones del rendimiento por efectos del calor o de sequía durante el panojamiento y la emergencia de estigmas, fueron cuantificadas en el orden de un 7% por día de estrés, siendo esta reducción mayor que el de otras causas posibles de estreses abióticos.

La frecuencia de episodios con temperaturas supra-óptimas (comúnmente denominados *golpes de calor*) podría incrementarse en el periodo reproductivo de los cultivos si se mantuviesen las emisiones de gases de efecto invernadero (Teixeira *et al.*, 2013). Estos autores identificaron para maíz en la región norte de Argentina, frecuencias con golpes de calor con intensidades que pasan de ser medias a altas cuando se proyecta una estimación basada en una centena de años (*i.e.*, 1971-2001 vs. 2071-2100; Fig. 1.1). Además, existen evidencias que los efectos de las altas temperaturas sobre el rendimiento en grano no son lineales, conduciendo a fuertes mermas en el rendimiento bajo distintos escenarios de cambio climático (Schlenker *et al.*, 2009). Lobell *et al.* (2011), en un análisis de más de 20.000 ensayos históricos de maíz en la zona Centro-Sur de África bajo condiciones hídricas óptimas, identificaron reducciones en el rendimiento final de 1% por cada grado día acumulado por encima de 30°C.

El estrés causado por altas temperaturas es a menudo definido como un aumento de temperatura por encima de un nivel umbral, por un periodo de tiempo suficiente, para causar daños irreversibles en el crecimiento y desarrollo de la planta (Wahid *et al.*, 2007). Los estudios sobre estrés térmico describen los impactos negativos de las temperaturas sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Eyshi Rezaei *et al.*, 2015). Junto con el estrés hídrico, son los factores abióticos más importantes en las reducciones del rendimiento en grano a nivel mundial (Prasad y Staggenborg, 2008).

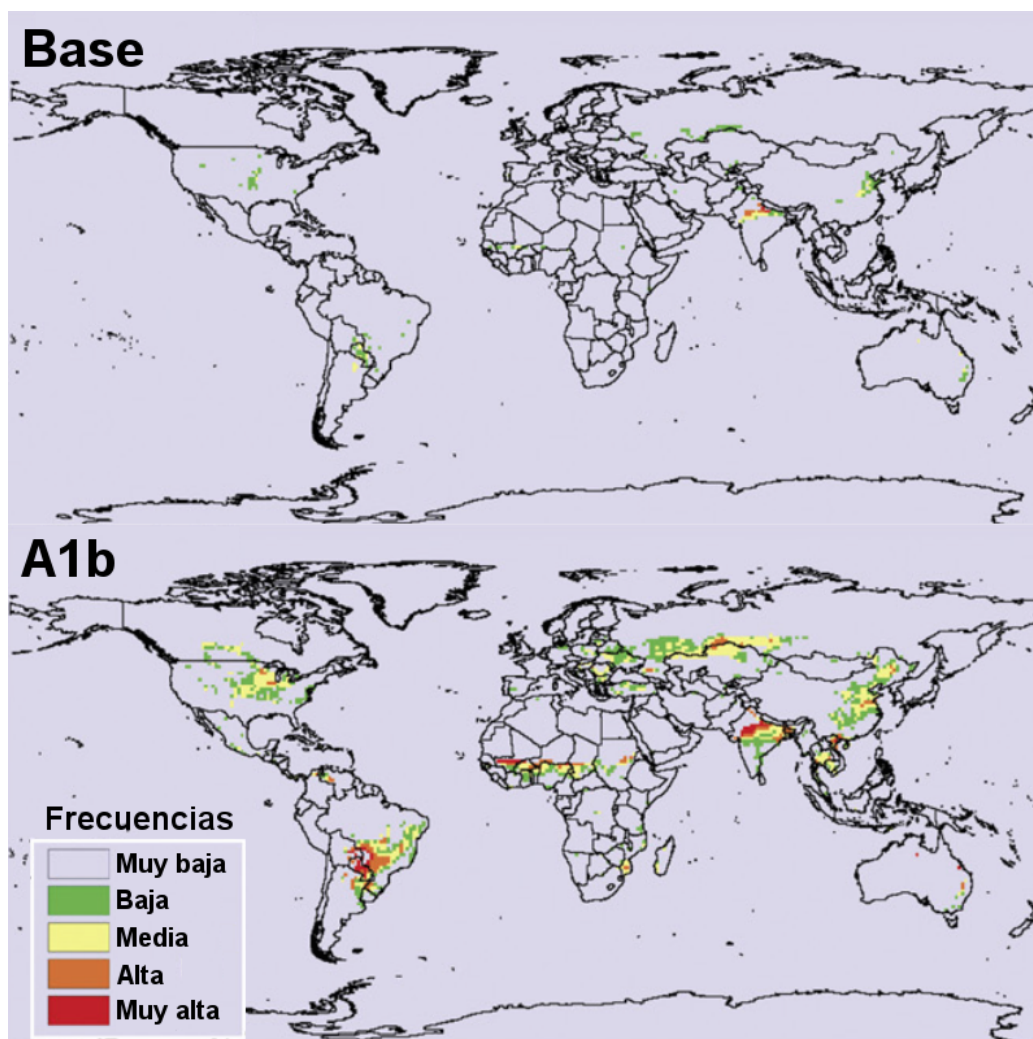


Figura 1.1: Frecuencias con temperaturas entre 35 y 45°C en el periodo reproductivo de maíz a nivel mundial. El escenario base fue calculado con datos de temperatura de los últimos 30 años del siglo XX (1971-2001). El escenario A1b fue modelado para el periodo 2071-2100 con el supuesto que se mantengan las emisiones de gases de efecto invernadero en un rango medio. Adaptado de Teixeira *et al.* (2013).

Debido a que las temperaturas durante el ciclo del maíz en regiones subtropicales a menudo se encuentran por encima de la óptima, un aumento en la temperatura media mundial podría trasladarse a reducciones del rendimiento en grano (Lobell y Gourdji, 2012). Sumado a esto, los mayores impactos negativos ocurrirán en regiones de baja latitud, donde el crecimiento y desarrollo de los cereales ocurre frecuentemente con umbrales térmicos supra-óptimos (Easterling *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados hasta el momento, existe poco conocimiento sobre los nuevos

escenarios en términos de: (i) la distribución espacial (cambios en el clima y nuevas tierras cultivadas) y (ii) la intensidad del daño por estrés (impactos en las tasas de crecimiento y desarrollo en fases críticas) causado a los cultivos por estrés térmico (Teixeira *et al.*, 2013).

Este último aspecto es clave cuando los programas de mejoramiento intentan hacer progresos en el rendimiento a través de la tolerancia al estrés térmico. De esta manera, estudios que permitan abordar los procesos y mecanismos que se encuentren involucrados en la tolerancia al estrés por altas temperaturas, conducirán a generar conocimientos valiosos para comprender las bases del mejoramiento genético como así también las bases de producción. En este sentido, profundizar en estudios sobre los procesos fisiológicos básicos involucrados en la tolerancia a las altas temperaturas constituye un aspecto esencial para el mejoramiento en maíz y merece especial atención, abordándose en el siguiente apartado.

1.2. Principales mecanismos y procesos fisiológicos afectados por altas temperaturas

Las altas temperaturas repercuten directamente sobre los procesos fisiológicos, ocasionando trastornos que finalizan en la muerte de las células (Feder y Hofmann, 1999). Es así que a nivel celular, el estrés térmico induce a un estrés oxidativo a través del efecto perjudicial que causan las especies de oxígeno activado (Powell *et al.*, 2012). La exposición de las plantas a las altas temperaturas, genera un desbalance entre la fotosíntesis y la respiración (Fitter y Hay, 1987). La habilidad para sostener altos niveles fotosintéticos bajo estrés térmico tiene una directa relación con la tolerancia a altas temperaturas (Wahid *et al.*, 2007). La fotosíntesis es un importante rasgo fisiológico para el mejoramiento de la productividad de cultivos por vía del mejoramiento convencional (Richards, 2000) o a partir de cultivos genéticamente modificados (Dunwell, 2000; Sinclair *et al.*, 2004).

El impacto de las altas temperaturas sobre la fotosíntesis puede variar de acuerdo con el genotipo. Es así que el germoplasma de maíz presenta grandes variaciones genéticas relacionadas con la tolerancia al estrés abiótico (Nelson and Goodman, 2008; Tallury and Goodman, 1999; Trachsel *et al.*, 2016). Gran parte de los genotipos tropicales han expresado mejor tolerancia al estrés por altas temperaturas respecto a sus contrapartes templados. No obstante, a menudo los cruzamientos entre germoplasma tropical y templado incrementan la tolerancia a estrés por un mayor grado en la heterosis (Wen *et al.*, 2012). A pesar de los avances en mejoramiento, los mecanismos fisiológicos que explican las variaciones entre genotipos son en gran parte desconocidos (Chen *et al.*, 2010).

En general, temperaturas foliares por encima de 38°C inhiben la fotosíntesis neta en maíz (Berry y Bjorkman, 1980; Crafts-Brandner y Salvucci, 2002). No obstante, la tasa fotosintética de algunos cultivares de maíz no fue reducida hasta temperaturas de 40°C (Massad *et al.*, 2007). Además, existen sustanciales evidencias que genotipos más nuevos exhiben tasas fotosintéticas más altas que genotipos antiguos bajo otros estreses abióticos

(Dwyer y Tollenaar, 1989; Dwyer *et al.*, 1992; Nissanka *et al.*, 1997; Ying *et al.*, 2002; Valentinuz y Tollenaar, 2004).

Si bien las disminuciones en las tasas fotosintéticas indican mecanismos asociados con la tolerancia al estrés térmico, el grado de recuperación pos-estrés podría ser también un rasgo clave para identificar genotipos menos susceptibles a las altas temperaturas. La recuperación pos-estrés se encuentra íntimamente relacionada con la temperatura a la cual las plantas crecen antes de someterlas a estrés térmico (Sinsawat *et al.*, 2004). Estos autores encontraron que plantas de maíz creciendo en alta temperatura aumentan considerablemente la tolerancia del aparato fotosintético al estrés por calor, ya que después de tratamientos con temperaturas cercanas a 50°C, las plantas manifestaron una recuperación completa luego de transcurridos dos días de la liberación del estrés. No obstante, existe una discrepancia entre los estudios sobre la capacidad inherente de aclimatación a la temperatura, teniendo que entender este fenómeno para predecir cómo los cambios de temperatura alterarán las respuestas fotosintéticas (Yamori *et al.*, 2013). Por consiguiente, es importante el estudio de componentes del aparato fotosintético que sean altamente sensibles a las altas temperaturas e identifiquen las variaciones atribuidas al estrés térmico.

Como es bien conocido, la energía solar es absorbida por las moléculas de clorofila para la fotosíntesis y es transformada en energía química (en forma de ATP y NADPH) para la fijación de CO₂. Sin embargo, porciones de esta energía absorbida es disipada en forma de calor o emitida como fluorescencia. En condiciones normales, la energía emitida por fluorescencia es baja. Contrariamente, cuando la fotosíntesis es nula y la emisión de calor es despreciable, la fluorescencia de la clorofila es elevada (Zlatev *et al.*, 2003). Así, bajos niveles de emisión de fluorescencia por parte del fotosistema II (PSII) en dichas condiciones, indican que algunos centros de reacción del PSII se encuentran dañados (fenómeno denominado foto-inhibición), lo cual es a menudo observado en plantas bajo condiciones de estrés térmico (Wang *et al.*, 2009).

Diferentes trabajos han identificado al PSII como el componente más sensible del aparato fotosintético (Karim *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2000). La máxima eficiencia del PSII y otros parámetros relacionados (basados en la teoría de la fluorescencia) son medidas que han mostrado correlación con la tolerancia a las altas temperaturas (Yamada *et al.*, 1996). Por otra parte, el PSII se relacionó con la estabilidad de las membranas celulares. Por ejemplo, con niveles moderados de estrés térmico y cuando el PSII no es deteriorado completamente, pueden surgir inhibiciones de la fotosíntesis debido a alteraciones en la permeabilidad de las membranas del tilacoide, conduciendo a fugas de protones (Pastenes y Horton 1996; Bukhov *et al.*, 1999; Schrader *et al.*, 2004).

El daño de las membranas celulares también está relacionado con la inactivación de la fotosíntesis por altas temperaturas, y es considerado un síntoma primario del daño por calor (Maheswari *et al.*, 1999; Camejo *et al.*, 2005). Las altas temperaturas modifican la función de la membrana, principalmente a causa de la alteración en su fluidez (Barnabás *et al.*, 2008). Esto se produce debido a la ruptura de la membrana celular, dañando severamente su estructura y originando la muerte de la célula. Por ende, la

termo-estabilidad de las membranas es otro factor importante vinculado con la tolerancia al estrés térmico (Rahman *et al.*, 2004). Al igual que otros procesos fisiológicos mencionados anteriormente, existe una respuesta diferencial en la termoestabilidad de las membranas asociada con el componente genotípico. Liu y Huang (2000), señalan que genotipos más tolerantes creciendo en condiciones de campo, poseen menores daños en sus membranas conduciendo a menores impactos en las tasas fotosintéticas.

A lo largo de esta sección, se pretendió abordar algunos de los principales procesos fisiológicos vinculados a la tolerancia al estrés por altas temperaturas. Claramente, la fotosíntesis de hoja es uno de los procesos más sensibles al estrés térmico, afectando las ganancias netas de carbono por parte del cultivo y es el proceso clave en el crecimiento del cultivo. En el siguiente apartado se profundizará sobre los impactos de la fotosíntesis de hoja en el crecimiento del cultivo de maíz.

1.3. Crecimiento y fotosíntesis de hoja: su relación con la biomasa y el rendimiento en grano en el cultivo de maíz

Cuando un cultivo crece sin limitantes hídricas ni nutricionales, la producción de biomasa es el producto de la radiación solar incidente durante el periodo de cultivo (R_i), multiplicada por la cantidad de radiación interceptada por el canopeo del cultivo ($\%I$) y la conversión de esta energía lumínica en materia seca (Ec). Este proceso puede ser expresado simplificado en la ecuación [1] (Richards, 2000):

$$Biomasa = \sum_{Emergencia}^{Madurez} R_i \times \%I \times Ec \quad [1]$$

Los aumentos en el rendimiento en grano de maíz tuvieron resultados a partir del incremento en la acumulación de biomasa debido a que el índice de cosecha en general se ha mantenido constante (Crosbie, 1982; Tollenaar, 1991; Richards, 2000). Es bien conocido que la producción de biomasa de un cultivo está fuertemente relacionada con su área foliar, así como con su tasa fotosintética (Hirasawa y Hsiao, 1999).

En el caso de maíz, breves episodios de estrés térmico en estados vegetativos avanzados están más asociados con disminuciones en la eficiencia de conversión (*i.e.* gramos de materia seca por unidad de energía interceptada) que con cambios en la expansión de tejidos (Cicchino *et al.*, 2010b). Así, las altas temperaturas a menudo conducen a disminuciones en la fotosíntesis neta e incrementos en la respiración nocturna, limitando el crecimiento de la planta (Crafts-Brandner y Salvucci 2004; Fry y Huang, 2004). Existen evidencias que señalan una fuerte correlación entre la temperatura y la acumulación de biomasa en grano, indicando que cualquier cambio significativo en la temperatura repercutirá directamente sobre la capacidad de acumulación y por consiguiente en el rendimiento del cultivo (Kobata y Uemuki, 2004).

El efecto de las altas temperaturas sobre la fotosíntesis de hoja puede afectar tanto el crecimiento como el rendimiento del cultivo. La estabilidad de la fotosíntesis durante y después de episodios de estrés por calor es un buen indicador de termo-tolerancia, ya que está correlacionada con el crecimiento (Wahid *et al.*, 2007). La evaluación del impacto

del estrés por altas temperaturas en maíz se ha centrado en gran medida en las disminuciones sobre el número de granos, el cual ha demostrado ser extremadamente sensible a las altas temperaturas centradas en floración (Rattalino Edreira y Otegui, 2013). La disminución en el número de granos se atribuye a la reducción en la oferta de asimilados derivada de reducciones en la fotosíntesis (Barnabás *et al.*, 2008), así como a los efectos directos de las altas temperaturas sobre los procesos reproductivos (Rattalino Edreira y Otegui, 2013).

Varios estudios sobre estreses abióticos reportan asociaciones entre el número de granos por planta y la tasa de crecimiento por planta durante el periodo de floración. Algunos ejemplos en el cultivo de maíz están relacionados con estrés por alta densidad de plantas (Tollenaar *et al.*, 1992; Andrade *et al.*, 1999; Vega *et al.*, 2001), déficit hídrico y nitrogenado (Andrade *et al.*, 2002) y recientemente, estrés térmico por altas temperaturas (Rattalino Edreira y Otegui, 2013).

En condiciones de estrés por altas temperaturas en maíz, las reducciones relativas sobre la fotosíntesis, el número y las tasas de llenado de granos, han sido ampliamente abordados en forma individual y fragmentada (Fig. 1.2). Por ejemplo, existen estudios que realizaron significativos aportes en cómo el estrés térmico por altas temperaturas modifica la eficiencia fotosintética en plantas de maíz (Crafts-Brandner y Salvucci, 2002; Sinsawat *et al.*, 2004). No obstante, nuestro conocimiento en cómo algunos procesos fisiológicos (*i.e.*, fotosíntesis de hoja) se relacionan con los componentes del rendimiento (*i.e.*, número de granos) es aún limitado bajo episodios con altas temperaturas en maíz.

Por lo tanto, estudios enfocados a integrar las relaciones entre los procesos fisiológicos y los componentes que son determinantes del rendimiento podrían contribuir a mejorar nuestro conocimiento frente a eventos con altas temperaturas.

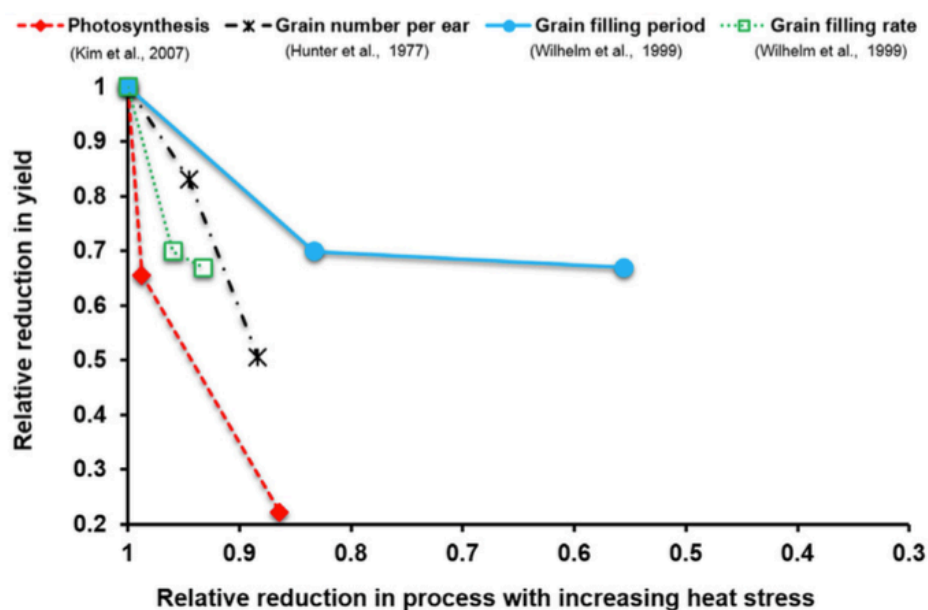


Figura 1.2: Cambios debido a estrés térmico por altas temperaturas en los procesos fisiológicos considerados claves y su impacto en el rendimiento final. Adaptado de Eyshi Rezaei *et al.* (2015).

En este sentido, dilucidar y comprender los mecanismos fisiológicos que

controlan la capacidad de sostener mayores tasas de crecimiento durante el periodo crítico del cultivo, será trascendente para mejorar el rendimiento de maíz en ambientes propensos a episodios con golpes de calor. Este último aspecto, posee una relación directa con la búsqueda de germoplasma adaptado a estrés por alta temperatura, ya que encontrar rasgos fisiológicos que identifiquen tolerancia al estrés son promisorios para el mejoramiento por altas temperaturas.

Sin embargo, los programas de mejoramiento a menudo poseen una gran cantidad de genotipos para su evaluación y los métodos convencionales para cuantificar algunos rasgos fisiológicos insumen una gran cantidad de tiempo, resultando en amplias diferencias de tiempo entre mediciones. Así, para una mejor identificación de la variación genética, es importante que las mediciones se obtengan dentro de un corto período que permitan excluir los factores ambientales (por ejemplo, nubes, los cambios en la intensidad de la radiación), los cuales varían naturalmente a lo largo del día.

A partir de lo mencionado en el párrafo anterior, el uso de índices de vegetación obtenidos a través de sensores remotos tales como el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI) y la temperatura de canopy, podrían ser de utilidad en los programas de mejoramiento. El potencial uso de ambas herramientas con base remota es abordado en la siguiente sección.

1.4. Índices de vegetación y su potencial aporte en los programas de mejoramiento por altas temperaturas

Dado que las plantas no pueden desplazarse de condiciones desfavorables a condiciones favorables de temperatura, la capacidad para soportar y/o adaptarse a variaciones de la temperatura del ambiente es esencial para la supervivencia de las mismas (Yamori *et al.*, 2013). A diferencia de otros estreses, el estrés térmico en cultivos extensivos no posee soluciones tales como abastecer al cultivo con agua de riego (*i.e.*, estrés hídrico) o fertilizarlo (*i.e.*, estrés nutricional). Por lo tanto, la búsqueda de genotipos tolerantes al estrés térmico, junto con el manejo de la fecha de siembra, son las principales prácticas aplicables a cultivos extensivos, tales como el maíz.

A menudo, la alta frecuencia de elevadas temperaturas coincide con bajas disponibilidades hídricas (Tester y Bacic, 2005). Sin embargo, en los programas de mejoramiento y de investigación destinados a evaluar la tolerancia del cultivo de maíz a altas temperaturas, el estrés térmico ha recibido menos atención con respecto al estrés por déficit hídrico (Cairns *et al.*, 2013; Zia *et al.*, 2013).

Con el fin de optimizar el progreso de mejoramiento, es necesario identificar rasgos claves que puedan discriminar entre genotipos tolerantes y sensibles a las altas temperaturas. Los pasos a seguir una vez identificados los procesos fisiológicos involucrados con la tolerancia al estrés térmico (los cuales han sido abordados anteriormente), estarían relacionados con que el rasgo de interés presente las siguientes condiciones: i) ser relevante, ii) poseer variabilidad, iii) ser heredable y iv) fácil de monitorear. Esta última condición (monitoreo fácil y rápido) es crucial en los programas

de mejoramiento donde se evalúan una gran cantidad de genotipos y generalmente limita la contribución práctica de los fisiólogos en dichos programas.

La existencia de distintos métodos se ha incrementado en los últimos años a partir de los avances tecnológicos, los cuales están disponibles para medir rápidamente rasgos secundarios. Actualmente, los satélites basados en teledetección se utilizan con éxito en el apoyo de pruebas de campo a gran escala, pero la resolución espacial no es lo suficientemente alta para medir pequeñas parcelas, tales como las que se utilizan en un programa de mejoramiento (Nebiker *et al.*, 2008).

Los vehículos aéreos no tripulados (UAVs) son prometedores debido a su facilidad de uso y la disponibilidad inmediata de imágenes o datos después del aterrizaje, lo que permite su uso directo en las estaciones experimentales por los investigadores. Sin embargo, los UAVs disponibles en el mercado son a menudo de carga útil restringida (Nebiker *et al.*, 2008). Alternativamente, un avión real puede ser utilizado para la adquisición de imágenes. Las imágenes podrían adquirirse a la misma velocidad que con un UAV pero con cargas más pesadas, lo que permite combinaciones de varias cámaras a la vez. Por ejemplo, podrían tomarse al mismo tiempo imágenes con una cámara térmica y una cámara hiperespectral, con una resolución espacial suficientemente alta para identificar individualmente parcelas típicas de un programa de mejoramiento. Todas las alternativas mencionadas anteriormente pueden darnos información de rápido acceso y permitir evaluar un gran número de genotipos.

Dos rasgos que potencialmente pueden ser utilizados en programadas de mejoramiento para selección de líneas y genotipos de maíz por altas temperaturas son la temperatura de canopeo (TC) y el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI). Por ejemplo, la TC tuvo implicancias prácticas en el cultivo de trigo para la evaluación de germoplasma tolerante al estrés por altas temperaturas y déficit hídrico. Canopeos más frescos se asocian fuertemente con el rendimiento en ambos estreses (Pinto y Reynolds, 2015). La TC es obtenida a partir de sensores remotos que captan longitudes de onda del infrarrojo (a menudo entre 5-15 μm). Existen investigaciones que han utilizado la TC obtenida por termometría infrarroja (Araus *et al.*, 1993; Reynolds *et al.*, 1994; Badaruddin *et al.*, 1999). Los métodos utilizados previamente para medir TC (*i.e.*, termometría infrarroja) sólo permiten la evaluación de un número limitado de genotipos. Actualmente, la TC se puede obtener por imágenes termales aéreas lo cual brinda las bondades de poder evaluar un gran número de parcelas.

Por otra parte, el NDVI refleja el vigor de la vegetación y se obtiene a partir de una relación entre la luz reflejada en el infrarrojo cercano y la luz reflejada en el espectro visible (Henik *et al.*, 2012). Algunos rasgos fenotípicos utilizados en mejoramiento por altas temperaturas, tales como el fogueo de la hoja y la panoja (Chen *et al.*, 2012), podrían ser captados por el NDVI lo que permitiría identificar fácilmente diferencias genotípicas.

El NDVI ha sido utilizado en maíz para el manejo de nutrientes por sitio específico (Boegh *et al.*, 2002; Inman *et al.*, 2005; Chiara *et al.*, 2014; Quemada *et al.*, 2014), evaluación de prácticas de manejo (Verhulst *et al.*, 2010), variabilidad espacial

(Masuka *et al.*, 2012), predicción de rendimiento (Mkhabela *et al.*, 2005), evaluación de heterosis (Araus *et al.*, 2010) y respuesta a la sequía (Suárez *et al.*, 2008; Sepulcre-Canto *et al.*, 2007; Rossini *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestro conocimiento sobre la relación entre el NDVI y el estrés térmico es limitado, siendo prometedor para el fenotipado de alto rendimiento en condiciones de estrés térmico por alta temperatura.

1.5. Hipótesis

- Las disminuciones en fotosíntesis de hoja ante episodios de estrés térmico por altas temperaturas en floración están asociadas con reducciones en la fluorescencia de la clorofila y el daño de las membranas celulares.
- Los genotipos más tolerantes al estrés térmico durante el periodo crítico mantienen mayor tasa de crecimiento del cultivo y menor reducción en el número de granos como resultado de una menor declinación en la fotosíntesis de hoja y una mayor dinámica en la recuperación pos-estrés.
- La temperatura del canopeo y el NDVI permiten seleccionar genotipos de maíz tolerantes a estrés por altas temperaturas.

1.6. Objetivos

1.6.1. Generales:

- Estudiar el efecto del estrés térmico por altas temperaturas sobre procesos fisiológicos relacionados con la fotosíntesis de hoja y la determinación del rendimiento en diferentes genotipos de maíz como base para la identificación de germoplasma tolerante.

1.6.2. Específicos:

- Comparar la respuesta fisiológica en tratamientos por altas temperaturas de distintos genotipos en base a estudios de fotosíntesis, eficiencia fotosintética y estabilidad de membranas.
- Analizar el crecimiento y la determinación del número de granos en genotipos de maíz en respuesta a eventos de estrés por altas temperaturas durante el periodo crítico del cultivo.
- Evaluar la temperatura de canopeo y NDVI en función de su heredabilidad, correlación con el rendimiento y ganancias genéticas para su utilización como indicadores de tolerancia a estrés térmico en programas de mejoramiento por altas temperaturas.

CAPÍTULO II: PRINCIPALES MECANISMOS Y PROCESOS FISIOLÓGICOS AFECTADOS POR ALTAS TEMPERATURAS

2.1 Introducción

La fotosíntesis es el proceso que conduce a la acumulación de materia de seca por parte de las plantas. En esto radica la importancia de que las plantas mantengan altas tasas fotosintéticas durante el día así como durante toda la estación de crecimiento. Sin embargo, la presencia de estreses ambientales (tales como el estrés por altas temperatura) conducen a que las plantas generalmente no se encuentren en su máxima capacidad fotosintética aún cuando reciban altos niveles de radiación solar.

A menudo, las variables relacionadas con el intercambio gaseoso y aquellas que influyen en el estado de los fotosistemas no han sido ampliamente abordadas en estudios de campo. Como se ha presentado en el Capítulo I, dichas variables pueden ser fuertemente afectadas por temperaturas supra-óptimas y conducir a limitaciones en la fotosíntesis de hoja. Este capítulo pretende abordar los cambios en algunas de las variables que se relacionan con el proceso fotosintético durante episodios de altas temperaturas. La recuperación una vez liberado el estrés térmico y las diferencias genotípicas entre materiales son también aspectos considerados relevantes en este capítulo.

2.2 Objetivo

Comparar la respuesta fisiológica de tres genotipos de maíz bajo episodios de altas temperaturas en base a estudios de intercambio de gases, eficiencia fotosintética y estabilidad de las membranas celulares.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Establecimiento de los experimentos

Los experimentos se realizaron en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNNE, Corrientes, Argentina (27°28'S; 58°49'O; 70 msnm). Dicha área posee un clima subtropical húmedo. Los ensayos presentaron temperaturas medias diarias de 25,2°C alrededor de la floración del cultivo, con temperaturas máximas absolutas de 43,5°C a la altura de la espiga. El suelo se encuentra clasificado como Udipsament ácuico hipertérmico correspondiente a la serie Ensenada Grande (Escobar *et al.*, 1996).

El ensayo se condujo sin limitantes hídricas ni nutricionales. La humedad del suelo se mantuvo por encima del 50% de la capacidad de campo en el primer metro del perfil durante toda la estación de crecimiento del cultivo. Esta condición, se logró mediante riego por goteo, erogando entre 4 a 10 mm de lámina de agua por turno de riego, conforme a la demanda hídrica del cultivo. Las parcelas fueron fertilizadas con un total de 250 kg N ha⁻¹, 60 kg P ha⁻¹ y 199 kg K ha⁻¹. Los fertilizantes aplicados fueron incorporados a través del sistema de riego. Así, entre 7 y 72 días después de la siembra (DDS), la solución fertilizante fue incorporada a las parcelas cada tres días por medio de un tubo de venturi. La concentración de la solución fertilizante fue modificada cada tres semanas (Sampathkumar y Pandian, 2010), siguiendo el siguiente programa: 7-28 DDS (25, 30 y 25% del total de NPK, respectivamente), 29-50 DDS (50% del total de NPK) y 51-72 DDS (25, 20 y 25% del total de NPK).

La siembra se realizó manualmente a razón de tres semillas por golpe de siembra con su posterior raleo en V3, quedando definida la densidad de plantas (7,5 plantas m⁻²). El distanciamiento entre hileras fue de 0,50 m y la distancia entre plantas dentro de la hilera fue de 0,25 m. Se utilizaron tres genotipos (GEN) de genética contrastante: DK747 VT3Pro (Te), DK390 VT3Pro (Tr) y Exp 8282 VT3Pro (Tx), todos pertenecientes a Monsanto Argentina. La tecnología VT3Pro confirmó la resistencia a algunos lepidópteros aéreos, tales como el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) y la resistencia a glifosato (<http://www.vtriplepro.com.ar/>). El genotipo DK747 VT3Pro ha sido uno de los genotipos más extensamente distribuido en diferentes regiones de Argentina, incluyendo el área de estudio. El Exp 8282 VT3Pro fue un genotipo pre-comercial al momento de los experimentos. El genotipo DK390 VT3Pro fue ampliamente sembrado en toda la región norte de Argentina.

Con el fin de sincronizar la fecha de floración entre los materiales seleccionados, se utilizaron tres fechas de siembra basadas en experimentos previos. De esta manera, los genotipos fueron sembrados el 18 (Tr), 20 (Tx) y 21 (Te) de enero del 2014, respectivamente. Los experimentos fueron dispuestos en un diseño en parcelas divididas con tres repeticiones. Los regímenes térmicos (RT) fueron asignados aleatoriamente a la parcela principal, mientras que los genotipos fueron asignados aleatoriamente en las sub-parcelas, dentro de cada parcela principal. Las parcelas principales estuvieron constituidas por invernáculos de polietileno (150 µm de espesor), los cuales fueron utilizados para el incremento de la temperatura por encima de la ambiental (Fig. 2.1). Dichos invernáculos fueron sub-divididos en tres sub-parcelas, perfectamente delimitadas por dos arcos correspondientes a la estructura metálica de cada invernáculo. Los genotipos de genética contrastante fueron sembrados en cada sub-parcela. Cada genotipo se sembró en ocho surcos lineales de 2,5 m de longitud (*i.e.*, sub-parcelas, 10 m²).

2.3.2 Generación del estrés térmico

Las altas temperaturas fueron inducidas durante un periodo de 15 días antes de floración femenina (H1: R1-15 días a R1) y durante un periodo de 15 días después de transcurridos dos días del inicio de floración femenina (H2: R1+2 días a R1+17 días). En el tratamiento control (C), las temperaturas presentaron niveles de temperatura similares a la ambiental. Los invernáculos permanecieron abiertos durante todo el ciclo del cultivo y fueron cerrados durante el periodo de tratamiento térmico (*i.e.*, H1 y H2) o se mantuvieron abiertos en sus laterales (C). Las temperaturas en H1 y H2 fueron incrementadas entre 4 y 10°C. El calentamiento diario se inició a partir de las 10 h y finalizó a las 14 h conforme con la re-apertura de las cortinas. Dicho procedimiento se repitió diariamente durante el periodo de calentamiento accionando manualmente las cortinas laterales instaladas en los invernáculos (Fig. 2.2). Las plantas dispuestas en las líneas 1 y 8 en cada parcela principal, correspondieron a las borduras laterales separadas a 0,25 m de las cortinas de cada invernáculo. Cuando era necesario, dichas borduras fueron parcialmente defoliadas para facilitar el libre movimiento de las cortinas. Durante el calentamiento en los tratamientos H1 y H2, las cortinas no fueron cerradas en su totalidad, dejando 0,50 m de apertura en la parte basal, con el fin de lograr un adecuado intercambio gaseoso y evitar un excesivo calentamiento de las parcelas.



Figura 2.1: Invernáculos tipo túnel ($30 \text{ m}^2 \text{ c/u}$) utilizados para la aplicación de los regímenes térmicos. Los arcos en cada invernáculo delimitan las sub-parcelas (10 m^2) donde fueron sembrados los tres genotipos de genética contrastante.

2.3.3 Mediciones de intercambio gaseoso, temperatura de hoja y fluorescencia de clorofila.

Las mediciones de intercambio gaseoso correspondieron a mediciones de fotosíntesis neta de hoja ($A_{\text{máx}}$, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiración (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), conductancia estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la concentración interna de CO_2 en la cámara sub-estomática (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Dichas mediciones se realizaron en hojas de la espiga totalmente expandidas por medio de un equipo medidor de intercambio de gases (LI-COR 6400, Lincoln, NE, USA). La cámara de la cubeta empleada (6400-40) entregó $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de fotones fotosintéticamente activos en un superficie foliar de 2 cm^2 , excluyendo la nervadura central. El flujo a través de la cámara y de cada IRGA (del inglés: analizador de gases infrarrojos) fue de $500 \mu\text{mol s}^{-1}$. Todas las mediciones se realizaron con una concentración interna de CO_2 en la cámara de referencia de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$, la cual fue provista por un cilindro de CO_2 presurizado. Con el fin de evaluar la evolución diaria de $A_{\text{máx}}$, E , g_s y C_i , las mediciones se realizaron a 0, 120 y 240 minutos después de iniciado el calentamiento y cada 30 minutos una vez removido el estrés térmico. Dichas mediciones fueron obtenidas a la mitad (7 días) y cercanas al final (14 días) de cada tratamiento. La temperatura foliar (TF) fue adquirida por medio de la

termocupla ubicada en la base de la cámara de la cubeta utilizada para las mediciones de intercambio gaseoso (LICOR, 6400-40).

Las mediciones de fluorescencia de clorofila fueron cuantificadas como la máxima eficiencia del fotosistema II (F_v/F_m). Dicha variable fue medida en hojas de la espiga adaptadas a la oscuridad, utilizando pinzas especiales pertenecientes a un equipo de medición de fluorescencia (Handy PEA, Hansatech, Reino Unido). En cada medición, la fuente de radiación emitió un pulso de 1 segundo con una intensidad de $3500 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ sobre una superficie foliar de 4 mm de diámetro. Los registros de F_v/F_m se realizaron al mismo tiempo que las mediciones de intercambio gaseoso descriptas arriba.

2.3.4 Determinación de Estabilidad de Membranas

Las mediciones se realizaron en soluciones obtenidas a partir de muestras de hojas de la espiga, a las cuales se les midió su conductividad eléctrica de acuerdo a la metodología propuesta por Sullivan (1972) que se describe a continuación.

De cada hoja seleccionada, se extrajeron con un saca bocados 20 discos de tejido foliar de 1 cm de diámetro en dos series paralelas a lo largo de la nervadura central, destinadas como testigo y otra como tratamiento de calentamiento, respectivamente. En el laboratorio se lavaron los discos con agua desionizada a fin de eliminar todos los electrolitos generados al realizar el corte. Luego, por cada tubo de ensayo, 10 discos pertenecientes a cada tratamiento fueron colocados adhiriendo 2 mL de agua desionizada, cerrando los tubos con tapones para evitar la evaporación. Un grupo de tubos fue sometido a calentamiento durante una hora a 45°C en un baño termostático. El otro grupo se mantuvo en condiciones de laboratorio (25°C) conformando el tratamiento control. Luego de transcurrido este periodo, se adicionaron 10 mL a cada tubo. Las muestras se mantuvieron a 10°C durante 24 h. Transcurrido dicho tiempo, se procedió a realizar en todos los tubos una primera medición de conductividad eléctrica. Para destruir totalmente el tejido, las muestras fueron llevadas a autoclave (1,4 atm) durante 15 minutos. Una vez que las muestras alcanzaron 25°C , se realizó la segunda medición de conductividad con el mismo instrumento.

El % de daño celular relativo (DCR) fue obtenido como se detalla en la Eq. [2]:

$$DCR (\%) = 1 - CMS (\%) \quad [2]$$

Donde CMS (del inglés: *cell membrane stability*) corresponde a la estabilidad de la membrana celular, obtenida a partir de la Eq. [3]:

$$CMS (\%) = \left[\frac{1 - \left(\frac{T_1}{T_2}\right)}{1 - \left(\frac{C_1}{C_2}\right)} \right] \times 100 \quad [3]$$

Donde: C y T corresponden al tratamiento control y al tratamiento calentado, respectivamente, y los subíndices 1 y 2 corresponden a la conductividad eléctrica inicial y final (llevados a autoclave), respectivamente.

Análisis Estadístico

El nivel de significancia entre el momento de medición, los regímenes térmicos, los genotipos y las interacciones entre factores se analizaron con ANAVA. El coeficiente de correlación de Pearson se utilizó para identificar el grado de asociación entre Amáx y las otras variables medidas. Un análisis de componentes principales (ACP) fue utilizado para identificar las combinaciones de los rasgos evaluados asociados con la variación entre los tratamientos. Todos los análisis fueron realizados con el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2015).

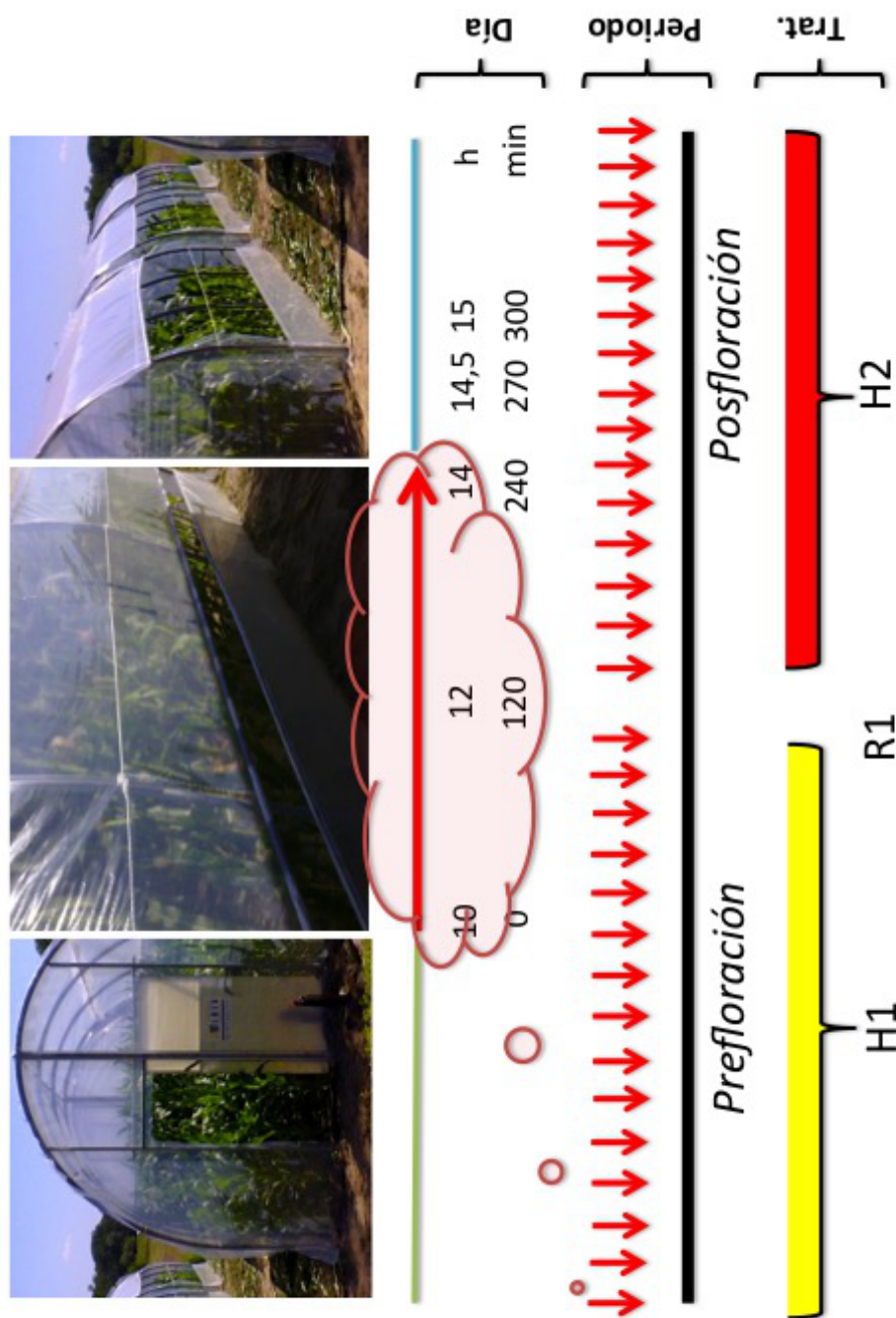


Figura 2.2: Esquema representativo de un día de calentamiento (día) en los dos momentos donde se realizaron los calentamientos (periodo). H1 y H2 representan los tratamientos térmicos (trat.) en pre y posfloración, respectivamente.

2.4 Resultados

2.4.1. Efecto de los regímenes térmicos sobre la temperatura foliar y las variables relacionadas con el intercambio gaseoso

La temperatura foliar (TF) medida en la hoja de la espiga varió significativamente entre los días de medición ($p \leq 0,0001$), el régimen térmico aplicado ($p \leq 0,0001$) y la interacción entre ambos factores (Día*RT, $p \leq 0,0001$). Los tratamientos térmicos (*i.e.*, H1 y H2) presentaron diferencias medias de TF respecto a sus controles de 7,5°C y 9,4°C a los 120 min y 240 min de iniciado el calentamiento, respectivamente (Fig. 2.3). Las temperaturas de la hoja de la espiga no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los genotipos ensayados.

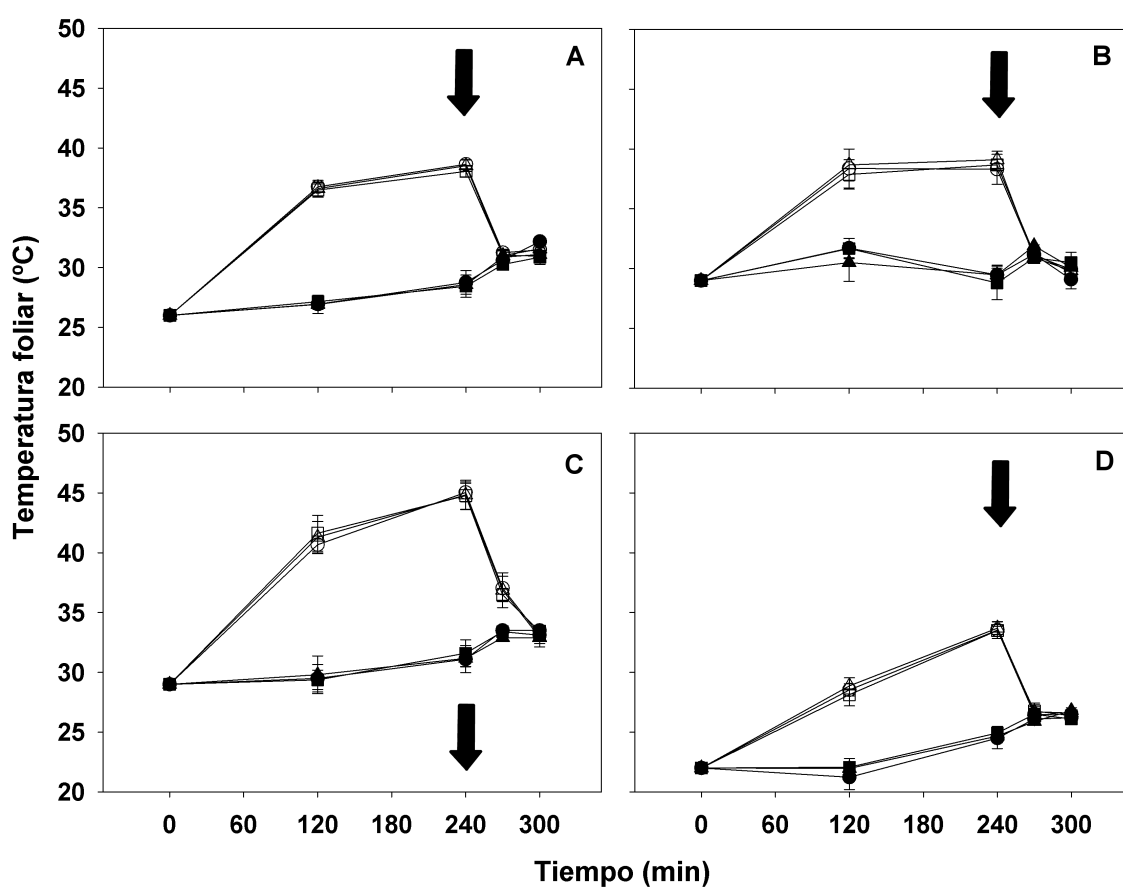


Figura 2.3: Efectos del estrés térmico y la recuperación posestrés en la temperatura foliar (TF). Los datos corresponden a tres genotipos de maíz (círculos, templado; triángulos, templado x tropical y cuadrados, tropical) bajo tres regímenes térmicos: H1 (A y B), calentamiento durante un periodo de 15-d antes de R1; H2 (C y D) calentamiento durante R1+2-d a R1+17-d y un tratamiento control. Los símbolos vacíos representan el calentamiento artificial en H1 y H2 respecto de los símbolos llenos (tratamiento control). La temperatura foliar se grafica en función del tiempo. El cero corresponde al inicio de los tratamientos térmicos y las flechas indican el momento de re-apertura de los invernáculos. Las mediciones fueron realizadas a 7-d (A y C) y 14-d (B y D) de iniciado el tratamiento térmico.

El calentamiento afectó significativamente las variables relacionadas con el intercambio gaseoso ($p \leq 0.001$), excepto la concentración interna de CO_2 en la cámara sub-estomática (Ci). En general, el calentamiento diario condujo a un cierre estomático y a una disminución en la transpiración (E) del tejido (Fig. 2.4). Esta tendencia se presentó en ambos tratamientos térmicos (*i.e.*, H1 y H2) en los distintos días de medición.

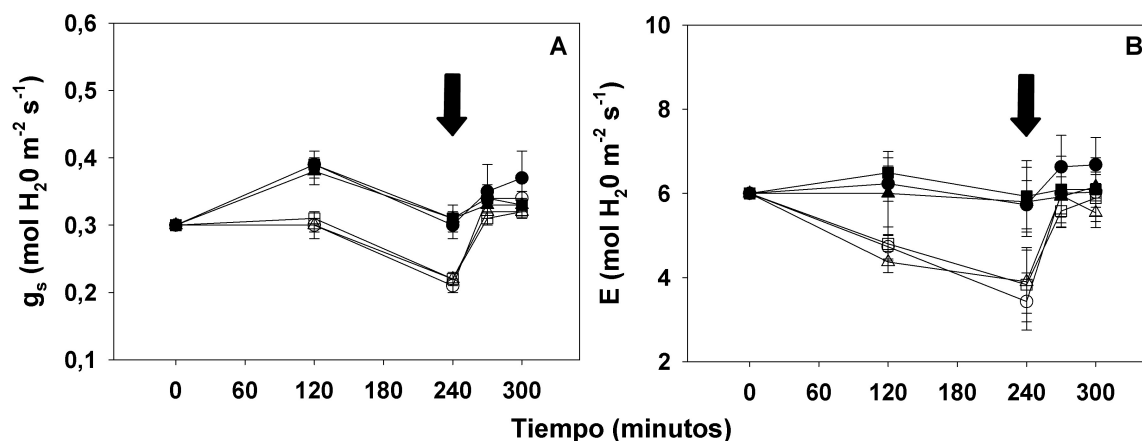


Figura 2.4: Efectos del estrés térmico y la recuperación posestrés en la conductancia estomática (g_s) y la transpiración (E). Los datos corresponden a tres genotipos de maíz (círculos, templado; triángulos, templado x tropical y cuadrados, tropical) en un día de medición (7 días después de R1). Los símbolos vacíos representan el calentamiento artificial en H2 respecto de los símbolos llenos (tratamiento control). g_s y E se grafican en función del tiempo. El cero corresponde al inicio de los tratamientos térmicos y las flechas indican el momento de re-apertura de los invernáculos.

La aplicación de altas temperaturas produjo disminuciones en $A_{máx}$ tanto en el tratamiento en prefloración (Fig. 2.5 A y B) como en posfloración (Fig. 2.5 C y D). Ambos tratamientos térmicos (*i.e.*, H1 y H2) presentaron un efecto similar sobre $A_{máx}$ medida en hojas de la espiga (Fig. 2.5). La fotosíntesis de hoja expuesta a altas temperaturas disminuyó considerablemente dependiendo del genotipo. Las reducciones medias de $A_{máx}$ en el genotipo Te (23,9 y 26,8% relativo al tratamiento control para H1 y H2, respectivamente) y Tr (28,4 y 26,2%) fueron menores a las del genotipo Tx (32,0 y 34,2%). Dicha variación genotípica dependió del momento de medición durante el calentamiento (*i.e.*, 120 o 240 min) y del día de medición (7 o 14 días desde iniciado el tratamiento). Luego de 7 días de iniciado el cierre diurno de los invernáculos (Fig. 2.5 A y C), se observaron diferencias genotípicas en $A_{máx}$ entre los genotipos expuestos a altas temperaturas ($p \leq 0,05$). Esto fue válido en ambos tratamientos térmicos a los 120 min de iniciado el calentamiento, tanto en H1 como para H2. Sin embargo, al finalizar los tratamientos térmicos (14 días, Fig. 2.5 B y D), no se observaron diferencias significativas entre genotipos durante el calentamiento.

Por otra parte, dentro de los primeros 30 minutos de liberado el estrés térmico, la recuperación pos-estrés (Fig. 2.5) indicó que la fotosíntesis alcanzó valores de 88,6% respecto del tratamiento control (valores medios entre genotipos). Luego de finalizado el calentamiento diario, los genotipos presentaron diferencias significativas en la recuperación de $A_{máx}$ (*i.e.*, 270 y 300 min). Así, Te y Tr alcanzaron valores más cercanos a sus controles no calentados respecto de Tx (Fig. 2.5 B y D).

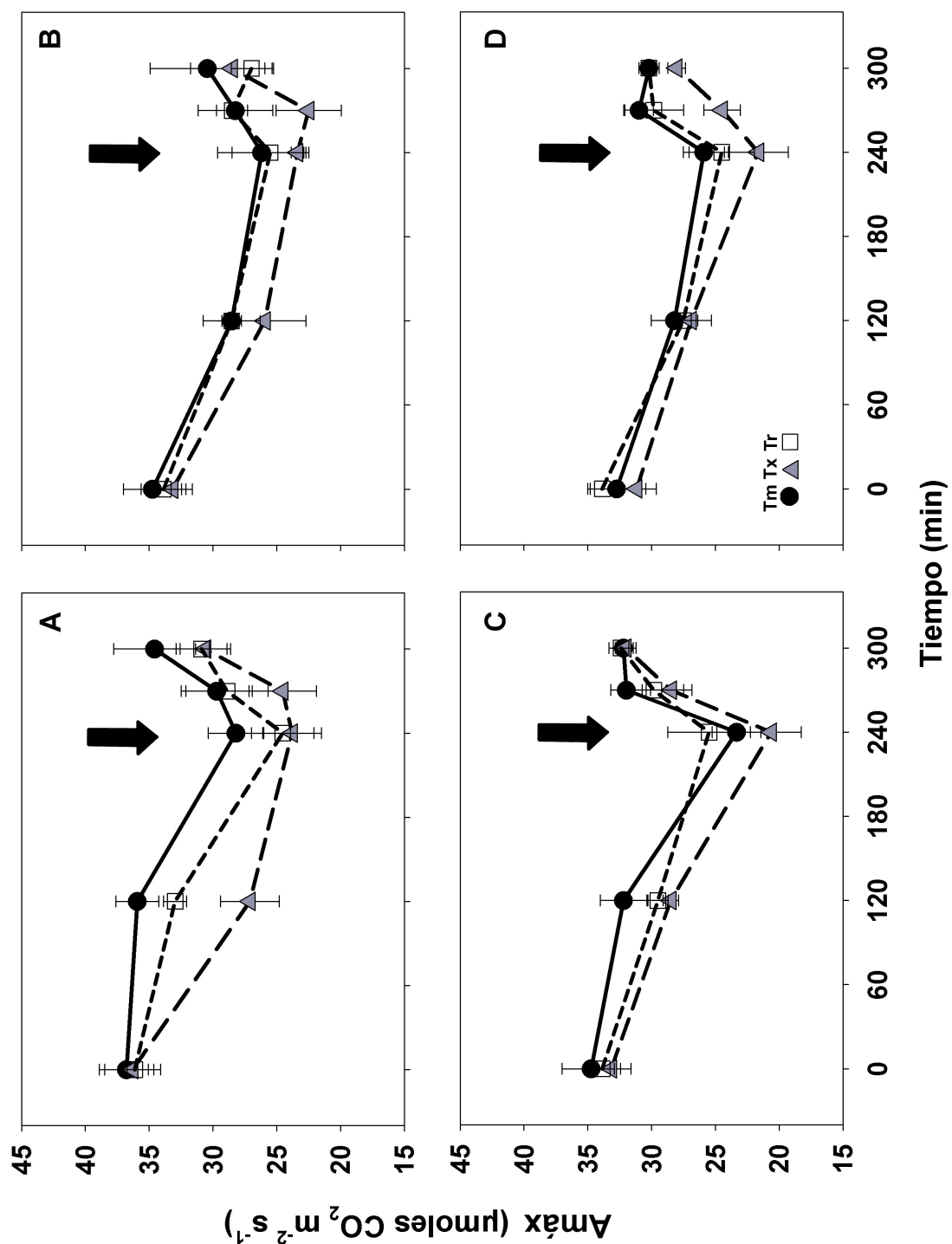


Figura 2.5: Efectos del estrés térmico y la recuperación posestrés en la fotosíntesis de hoja (A_{max}). Los datos corresponden a tres genotipos de maíz (círculos negros, templado; triángulos grises, templado x tropical y cuadrados blancos, tropical) bajo dos regímenes térmicos: H1 (A y B), calentamiento durante un periodo de 15-d antes de R1 y H2 (C y D) calentamiento durante R1+2-d a R1+17-d. A_{max} se grafica en función del tiempo. El cero corresponde al inicio de los tratamientos térmicos y las flechas indican el momento de re-apertura de los invernáculos. Las mediciones fueron realizadas a 7- (A y C) y 14-d (B y D) de iniciado el tratamiento térmico.

2.4.2. Variaciones en la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) y el daño celular relativo (DCR) debido a estrés por altas temperaturas.

El calentamiento afectó significativamente ($p \leq 0,001$) la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) tanto en pre- como en posfloración (Fig. 2.6).

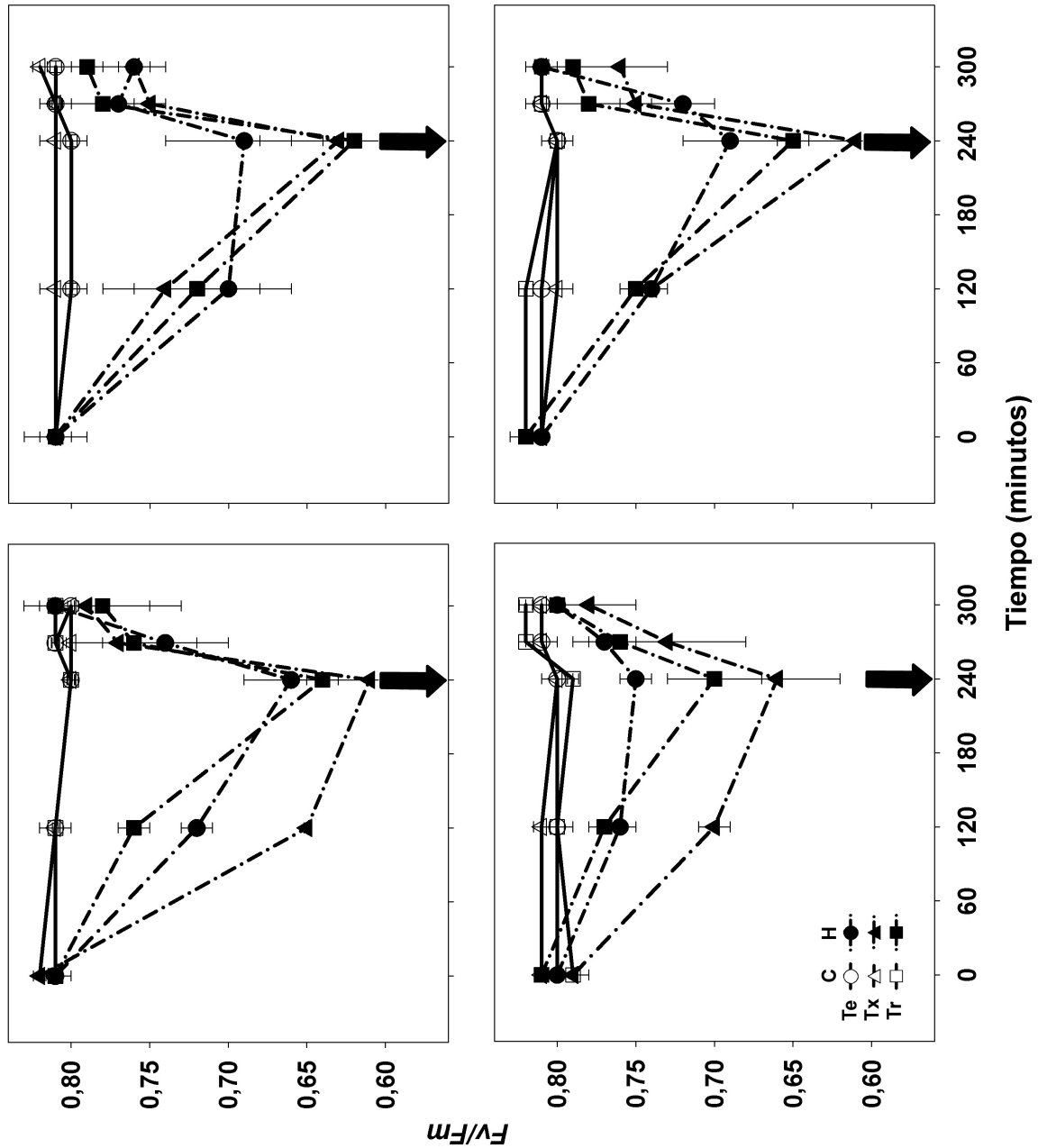


Figura 2.6: Efectos del estrés térmico y la recuperación posestrés en la eficiencia fotosintética (Fv/Fm). Los datos corresponden a tres genotipos de maíz (círculos, templado; triángulos, templado x tropical y cuadrados, tropical) bajo tres regímenes térmicos: H1 (A y B), calentamiento durante un periodo de 15-d antes de R1; H2 (C y D) calentamiento durante R1+2-d a R1+17-d y un tratamiento control. Los símbolos llenos representan el calentamiento artificial en H1 y H2 respecto de los símbolos vacíos (tratamiento control). Fv/Fm se grafica en función del tiempo. El cero corresponde al inicio de los tratamientos térmicos y las flechas indican el momento de re-apertura de los invernáculos. Las mediciones fueron realizadas a 7- (A y C) y 14-d (B y D) de iniciado el tratamiento térmico.

Minutos antes de finalizar el calentamiento diario, las reducciones promedio de F_v/F_m fueron prácticamente el doble (18,7%; valores medios entre genotipos y días de medición) respecto de aquellas efectuadas en la mitad del tratamiento (9,4%). Al igual que para Amáx, las diferencias genotípicas en F_v/F_m fueron significativas a los 120 min de iniciado el calentamiento diario en los dos regímenes térmicos aplicados. La recuperación de la eficiencia fotosintética alcanzó valores promedio de 94% respecto al tratamiento control en los primeros 30 minutos de liberado el estrés.

El daño celular relativo (DCR , Fig. 2.7) medido a los 120 min del calentamiento varió significativamente ($p \leq 0.05$) con el día de medición (D), el régimen térmico (RT), el genotipo (GEN) y las interacciones simples entre D*RT y RT*GEN. También se presentó una interacción doble entre D*RT*GEN ($p = 0,013$) indicando que las diferencias en DCR se encuentran afectadas por múltiples fuentes de variación. El daño en la membranas (promedio entre genotipos) presentó valores más altos en posfloración (61,3 y 74,0% para controles y H2, respectivamente) que los registrados en prefloración (36,0 y 61,3% para controles y H1, respectivamente).

Simultáneamente, se presentaron diferencias genotípicas en el DCR entre los tratamientos control y calentados (Fig. 2.7). Así, la mayor tolerancia al calentamiento se manifestó en los genotipos Te (diferencias promedio de 8,0% entre tratamientos calentados vs. controles) y Tr (12,1%) respecto del genotipo Tx (34,3%).

2.4.3. La fotosíntesis de hoja (Amáx) y su asociación con los rasgos medidos

La mayoría de las variables medidas estuvieron asociadas con Amáx. Esto dependió del momento de medición durante el calentamiento diario (*i.e.*, 120 o 240 min) y la componente genotípica. La temperatura foliar (TF) estuvo correlacionada en forma negativa con Amáx a los 120 min del calentamiento sólo en los genotipos Tx ($r = -0,45$; $p = 0,03$) y Tr ($r = -0,51$; $p = 0,01$). Sin embargo, a los 240 min de transcurrido el calentamiento, TF se correlacionó significativamente con los tres genotipos evaluados. Las variables relacionadas con la conductancia estomática (gs) y la transpiración (E) se correlacionaron en forma positiva con Amáx a los 120 y 240 min de iniciado el calentamiento en los tres genotipos evaluados. Por otra parte, no existieron correlaciones significativas entre Amáx y Ci.

La eficiencia fotosintética (F_v/F_m) estuvo correlacionada en forma positiva con Amáx durante los dos periodos de calentamiento. Promediado a través de ambos momentos de medición (*i.e.*, 7 y 14 días), las correlaciones fueron significativas para Te ($r = 0,46$ y $0,41$ para 120 y 240 min, respectivamente), Tx ($r = 0,65$ y $0,83$) y Tr ($r = 0,77$ y $0,79$). Por otra parte, las correlaciones entre DCR y Amáx fueron significativas sólo para el genotipo Tx ($r = -0,59$; $p = 0,003$).

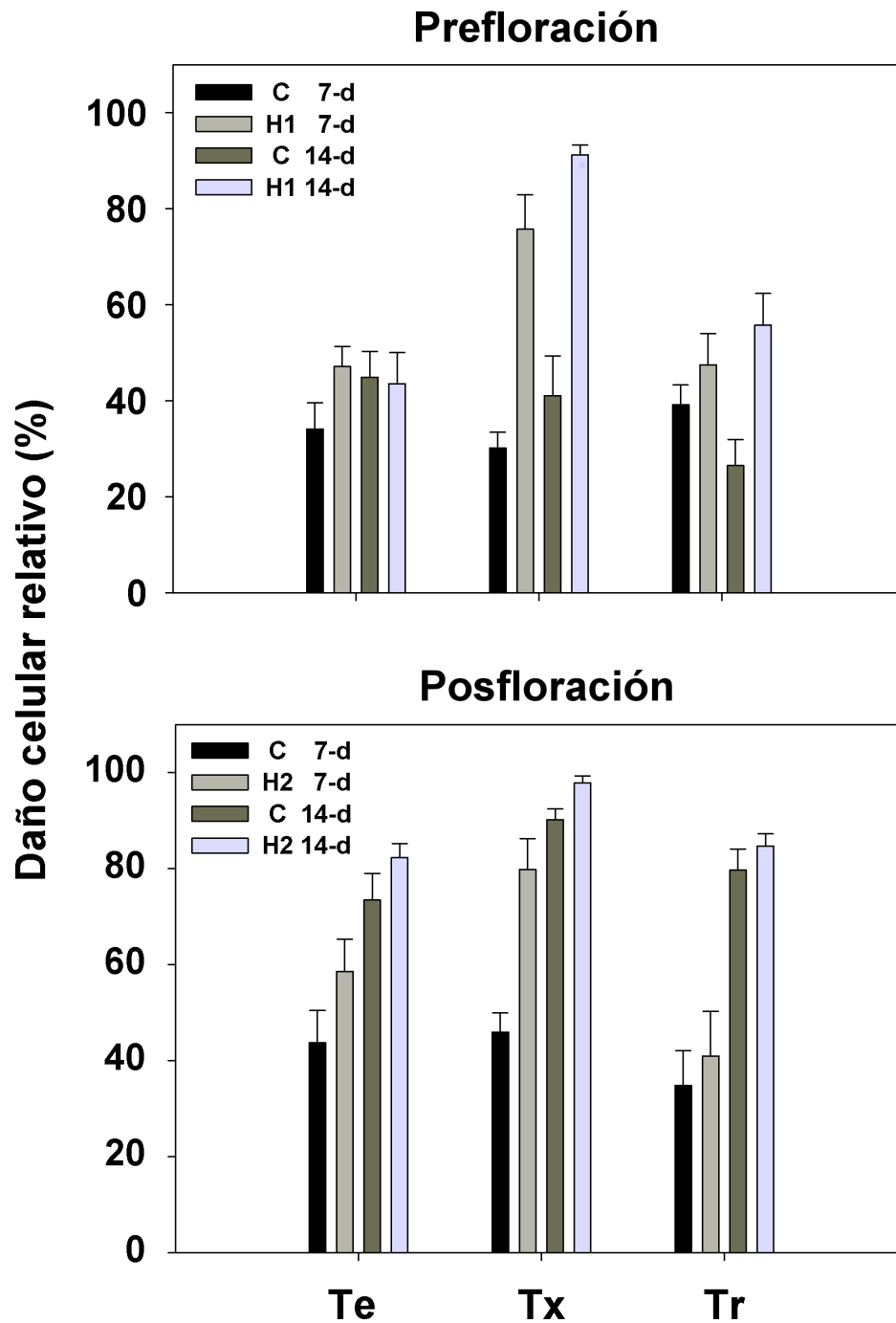


Figura 2.7: Daño celular relativo (%) en hojas de la espiga obtenidas en pre- y posfloración a los 7 y 14 días de iniciado el tratamiento térmico (*i.e.*, H1 y H2). Los datos corresponden a tres genotipos de maíz de genética contrastante (Te: templado, Tx: tropical x templado y Tr: tropical).

El análisis de componente principales (ACP, Fig. 2.8) permitió diferenciar las variables asociados positivamente (*gs*, *E*, y *Fv/Fm*) y aquellas asociadas negativamente (TF y *DCR*) con Amáx. Esta tendencia se mantuvo en ambos momentos de medición durante el calentamiento (*i.e.*, 120 y 240 min; Fig. 2.8 A y B). Las componentes principales (CP1 y CP2) explicaron el 93,2 y el 98,4 % de la variación para las mediciones realizadas a los 120 y 240 min, respectivamente.

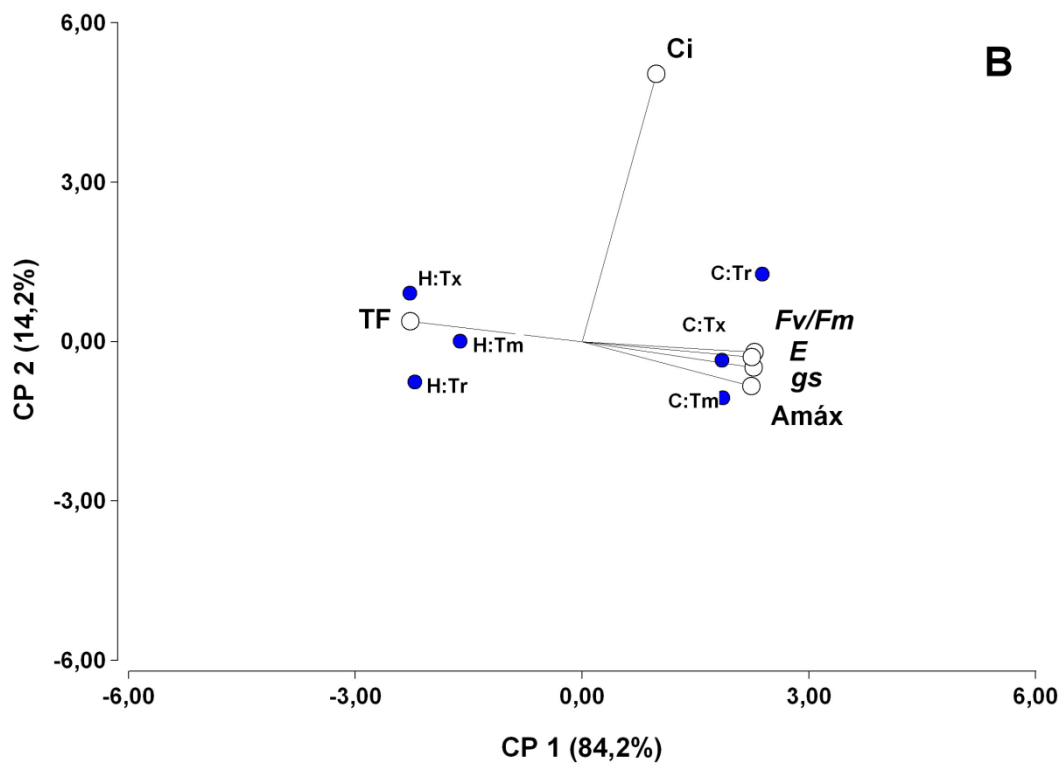
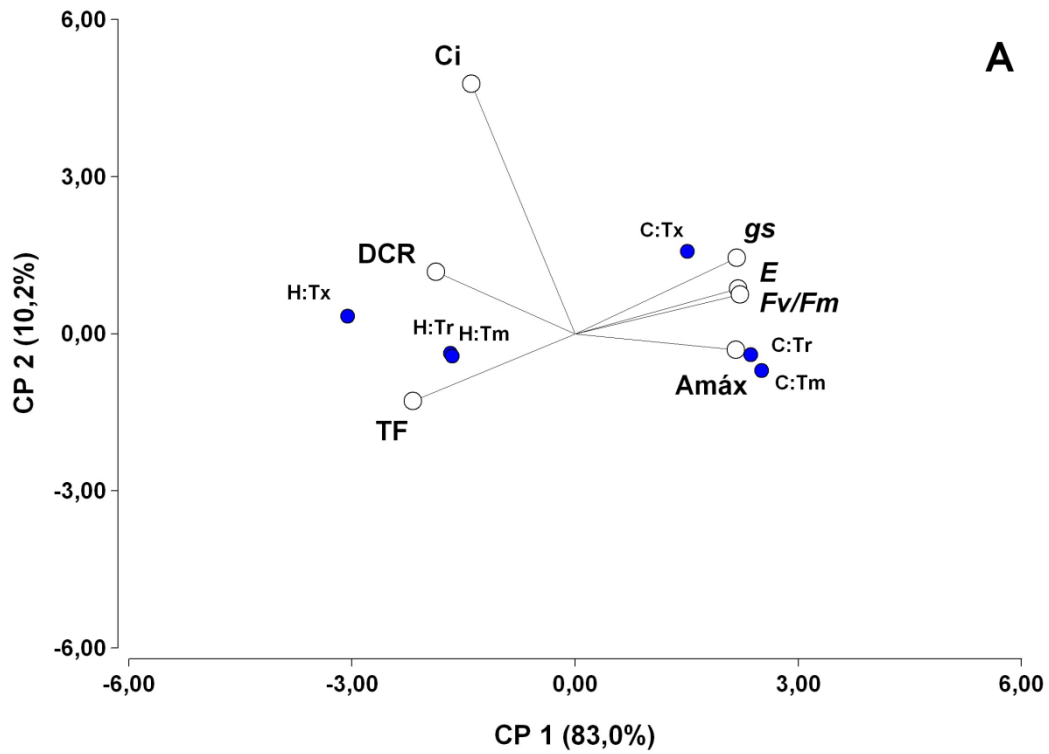


Figura 2.8: Biplots correspondientes al análisis de componentes principales obtenidos con datos durante 120 (A) y 240 (B) min de iniciado el calentamiento. Los datos corresponden a tres genotipos de maíz de genética contrastante (Te, templado; Tx, tropical x templado y Tr; tropical).

2.5. Discusión

2.5.1. Efectividad de los tratamientos

Las diferencias en las temperaturas foliares (TF) se presentaron durante el calentamiento en ambos tratamientos de pre- y posfloración, estableciendo la efectividad de los tratamientos térmicos. Las máximas diferencias en TF se dieron minutos antes de la apertura de los invernáculos. Además, el cerramiento de los invernáculos se tradujo en aumentos significativos de la temperatura de la hoja en los primeros 120 minutos del calentamiento (*i.e.*, medio día). Debido a que las condiciones del experimento fueron semi-controladas, la temperatura varió en función de las condiciones meteorológicas diarias, presentándose diferencias significativas ($p < 0,01$) en TF entre los distintos días de medición.

Desde el punto de vista de los umbrales térmicos, la temperatura óptima para la fotosíntesis en maíz citada en la literatura se encuentra en un rango entre 35 y 40°C (Crafts-Brandner y Salvucci, 2002; Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Massad *et al.*, 2007). A pesar de haber superado este rango de temperaturas en gran parte de los calentamientos diarios, las condiciones de ensayo a campo no permitieron generar un número constante de horas con temperaturas estresantes. Por otra parte, no se presentaron diferencias significativas en la TF de los genotipos evaluados.

2.5.2. Modificaciones en la conductancia estomática (gs) y la transpiración (E) durante el calentamiento

A los 7 días de iniciado el cierre diurno de los invernáculos en prefloración, la conductancia estomática (gs) y la transpiración (E) fueron reducidas durante el calentamiento diario, presentándose una tendencia similar en los restantes días de medición. Las causas que produjeron el cierre estomático no son del todo claras. En contraposición a los resultados presentados en este capítulo, varios estudios en maíz y otras especies identifican incrementos en gs en ensayos de estrés térmico por altas temperaturas (Djanaguiraman *et al.*, 2014, 2010; Farquhar y Sharkey, 1982).

Si bien la temperatura influye sobre la apertura estomática, es bien conocido que dicho proceso es regulado por un conjunto de factores. Así, la apertura estomática demostró estar influenciada por la concentración externa de CO₂, la concentración de CO₂ en la cámara sub-estomática (Ci), la disponibilidad hídrica y las variaciones en la concentración de algunos reguladores de crecimiento (Mohammed y Tarpley, 2010; Raschke, 1970; Farquhar y Sharkey, 1982; Djanaguiraman *et al.*, 2011). Dado que el aporte de CO₂ fue constante durante la medición (400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) y el cultivo se condujo sin limitantes hídricas, estas dos fuentes de variación pueden ser descartadas en este apartado.

A pesar de las diferencias con numerosos estudios (Djanaguiraman *et al.*, 2014, 2010; Farquhar y Sharkey, 1982), en este capítulo se presentan reducciones en gs (y consecuentemente en E) tal como fue publicado por Heckathorn *et al.* (1998). Estos autores identificaron disminuciones en la gs en tratamientos de estrés térmico en maíz sin diferencias significativas en Ci entre las plantas control y calentadas. Aparentemente, la

acumulación de CO₂ en la cámara sub-estomática, como resultado de una disminución en la asimilación de CO₂ debido a otros factores, podrían explicar las disminuciones en gs (y consecuentemente en *E*), conduciendo a una menor capacidad de refrigeración por parte del tejido.

2.5.3. Efectos del calentamiento sobre la fotosíntesis de hoja (Amáx), la eficiencia fotosintética (*Fv/Fm*) y la estabilidad de las membranas celulares

El calentamiento diario condujo a reducciones en Amáx, siendo máximas minutos antes de la re-apertura diaria de los invernáculos. Las máximas reducciones en Amáx se presentaron dos semanas después de iniciados los tratamientos, indicando que los ciclos repetidos de calentamiento diario generaron un efecto acumulativo del estrés por altas temperaturas. En cuanto a los genotipos, las diferencias en Amáx encontradas a los 7 días de medición en ambos periodos durante el calentamiento no se mantuvieron hacia el final del tratamientos (*i.e.*, 14 días).

Las disminuciones en Amáx estuvieron acordes a las obtenidas en estudios previos (Berry y Bjorkman, 1980; Crafts-Brandner y Salvucci, 2002; Heckathorn *et al.*, 1997; Sinsawat *et al.*, 2004). No obstante, las recuperaciones de Amáx luego de la re-apertura de los invernáculos fueron excepcionalmente rápidas comparada con otros estudios (Heckathorn *et al.*, 1998; Karim *et al.*, 1999; Sinsawat *et al.*, 2004), las cuales alcanzaron en promedio el 80% de los controles luego de los primeros 30 minutos de liberado el estrés. Las posibles causas de estas diferencias en tiempos de recuperación podrían ser atribuibles a la intensidad y duración del periodo de calentamiento. En efecto, luego de dos ciclos de calentamiento de 20 horas a 45°C se necesitaron de 4 días para la completa recuperación de la tasa fotosintética a los niveles del control (Heckathorn *et al.*, 1998). Sinsawat *et al.* (2004) identificaron que plántulas de maíz creciendo a 25°C alcanzaron valores similares al control después de 4 horas de liberado el estrés cuando fueron llevadas a 35°C durante 20 minutos, y mostraron un daño permanente cuando fueron llevadas a 45°C. Si bien, debido a la naturaleza del experimento que se reporta en este capítulo (*i.e.*, condiciones de campo), las temperaturas del calentamiento no se mantuvieron constantes, las condiciones de estrés térmico generadas en los invernáculos representan un valioso intento de simular los golpes de calor (*i.e.*, 4 h alrededor de medio día) que con frecuencia ocurren durante la floración del cultivo maíz en la región.

Durante el calentamiento y la recuperación pos-estrés, la eficiencia fotosintética (*Fv/Fm*) mostró una tendencia similar a la alcanzada por la fotosíntesis de hoja. Asimismo, las diferencias entre genotipos se observaron aproximadamente dos horas después del inicio del calentamiento en *Fv/Fm* (Fig. 2.5 A y C). En este sentido, *Fv/Fm* estuvo asociada significativamente con la fotosíntesis de hoja en los tres genotipos evaluados. Numerosos estudios ya han demostrado la sensibilidad del Fotosistema II al estrés por altas temperaturas (Yamada *et al.*, 1996; Karim *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009). Los resultados expuestos en este capítulo representan un avance en términos de encontrar diferencias genotípicas durante episodios de estrés térmico en maíz (Fig. 2.5 A y C). Una contribución adicional estaría dada por el componente experimental que refleja condiciones similares de cultivo de maíz a campo.

Al igual que para la fotosíntesis de hoja, los tiempos de recuperación en la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) presentaron una dinámica diferente a la identificada en estudios previos. En este sentido, después de una hora del momento de re-apertura diaria de los invernáculos, las diferencias en F_v/F_m entre tratamientos calentados y no calentados prácticamente desaparecieron. El tiempo de recuperación de F_v/F_m en este trabajo fue sustancialmente más corto que lo encontrado por Sinsawat *et al.* (2004). Estos autores identificaron la completa recuperación de F_v/F_m una vez transcurridas 48 h de finalizado el tratamiento de estrés por alta temperatura.

La estabilidad de las membranas celulares, expresada como el daño celular relativo ($DCR [\%] = 100 - CMS$), fue alterada por las altas temperaturas. La estabilidad de las membranas declinó a medida que se acumularon los días con tratamiento térmico. Tanto en pre- como en posfloración, los mayores daños a nivel de membrana se presentaron a las dos semanas de iniciados los tratamientos. Estos resultados confirman el efecto residual de los calentamientos diarios anteriormente discutidos a nivel de fotosíntesis y eficiencia fotosintética. A diferencia de los resultados obtenidos por Chen *et al.* (2010), las diferencias entre genotipos fueron significativas incluso entre las controles no calentados artificialmente. Este último aspecto podría indicar un estrés térmico *per se* en los controles, como consecuencia de la condición subtropical donde fueron realizados los experimentos. Dicha especulación será retomada desde otra perspectiva en la sección de la discusión del Capítulo III.

Por otra parte, el calentamiento produjo diferencias máximas en daño celular relativo entre genotipos del orden del 50% (Fig. 2.6 A; 14 días), siendo el genotipo Tx el más sensible respecto de Tr y Te. Las diferencias en daño celular relativo entre los genotipos fueron sustancialmente superiores a las obtenidas por Coskun *et al.* (2011). Si bien estos autores identificaron diferencias significativas entre diez genotipos evaluados, los valores mínimos y máximos de daño relativo rondaron 60 y 70%, respectivamente (diferencias de 10% en DCR). Una posible causa de esta discrepancia podría estar relacionada con el momento de las mediciones. Mientras Coskun *et al.* [2011] realizaron las determinaciones en estado vegetativo temprano, las mediciones informadas en esta sección fueron realizadas en estado vegetativo avanzado-reproductivo.

2.6. Conclusiones

Las altas temperaturas siempre condujeron a una reducción de la fotosíntesis de hoja. Independientemente del periodo de aplicación del calentamiento (pre y posfloración) y de los genotipos, la fotosíntesis de hoja disminuyó aproximadamente a las dos horas del inicio del calentamiento (*i.e.*, medio día). Las diferencias entre los genotipos se detectaron después de una semana de calentamiento, tanto en pre (H1) como en posfloración (H2). Las máximas disminuciones en fotosíntesis de hoja se alcanzaron luego de transcurridas dos semanas de iniciado los tratamientos térmicos. La eficiencia fotosintética explicó, en gran parte, las variaciones en fotosíntesis de hoja durante el calentamiento en pre y posfloración. Ambas variables mostraron una rápida recuperación después de la re-apertura de los invernáculos. La estabilidad de las membranas fue afectada por el calentamiento y los mayores daños se presentaron al final de los tratamientos. Los resultados expuestos en el presente Capítulo muestran diferencias entre genotipos en términos de su respuesta fisiológica durante el calentamiento y la recuperación pos-estrés.

CAPÍTULO III: ALTAS TEMPERATURAS DURANTE EL PERIODO CRÍTICO EN MAÍZ: EFECTOS SOBRE LA FOTOSÍNTESIS Y EL RENDIMIENTO EN GRANO

3.1 Introducción

Las ganancias netas de carbono y otras variables relacionadas han demostrado ser afectadas por las altas temperaturas alrededor de la floración del maíz (Capítulo II). Es bien conocido que la generación del rendimiento subyace en la partición de asimilados hacia los órganos de cosecha generados en la fotosíntesis a lo largo de la estación de crecimiento. No obstante, debido a que la demanda de asimilados en el periodo crítico del cultivo es máxima, las disminuciones en las tasas fotosintéticas podrían conducir a las mayores mermas en el rendimiento.

En un intento de vincular procesos que aborden distintas escalas o niveles de organización, este capítulo pretende examinar el grado de asociación entre la fotosíntesis de hoja y la tasa de crecimiento del cultivo en el periodo crítico. Además de las conocidas relaciones entre el número de granos y las tasas de crecimiento establecidas en la introducción general, se procura establecer la existencia de relaciones entre el rendimiento en grano y la fotosíntesis medidas en condiciones semi-controladas. Las diferencias genotípicas establecidas en el Capítulo II, relacionadas con la tolerancia al estrés térmico mediada por procesos fisiológicos, serán evaluadas a nivel de tasas de crecimiento de cultivo y rendimiento en grano en esta sección.

3.2 Objetivo

El objetivo de este Capítulo fue analizar los efectos de tratamientos de altas temperaturas en condiciones de campo sobre la fotosíntesis de hoja, la tasa de crecimiento del cultivo, el número de granos y el rendimiento de tres genotipos de maíz.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Manejo del cultivo y diseño experimental

Los experimentos se llevaron a cabo en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, dependiente de la Universidad Nacional del Nordeste (27°28'S; 58°49'O; 70 masl). Los detalles de la siembra, el manejo del cultivo y el diseño experimental se encuentran descriptos en el Capítulo II. En este Capítulo, se analizan los resultados de dos experimentos, los cuales fueron sembrados en enero de 2013 y enero de 2014 (Exp. 1 y 2, respectivamente). Brevemente, el ensayo se condujo sin limitantes hídricas ni nutricionales. Los genotipos (GEN) seleccionados fueron: DK747 VT3Pro (Te, templado), DK390 VT3Pro (Tr, tropical), y Exp 8282 VT3Pro (Tx, templado x tropical), todos pertenecientes a Monsanto Argentina. Los experimentos fueron dispuestos en un diseño en parcelas divididas con tres repeticiones. Los regímenes térmicos (RT) fueron asignados aleatoriamente a la parcela principal, mientras que los genotipos fueron asignados aleatoriamente en las sub-parcelas, dentro de cada parcela principal. Las parcelas principales fueron invernáculos de polietileno que permitieron el incremento de la temperatura por encima de la ambiental. Dichos invernáculos fueron sub-divididos en tres sub-parcelas donde fueron sembrados los tres genotipos contrastantes.

3.3.2 Regímenes térmicos y generación del estrés térmico

El estrés térmico por altas temperaturas fue generado durante un periodo de 15 días antes de floración femenina (H1: R1-15 d a R1) y durante un periodo de 15 días después de transcurridos dos días del inicio de floración femenina (H2: R1+2 d a R1+17 d), tal como se detalló en el Capítulo II. En el tratamiento control (C), las temperaturas presentaron niveles similares al de la temperatura ambiental y los invernáculos cumplieron la función de mantener niveles similares de radiación en todos los tratamientos.

Acorde con Rattalino Edreira *et al.* (2011), con el fin de evitar restricciones en la polinización debido al calentamiento, cada mañana se colectó polen fresco de plantas creciendo fuera del área de los invernáculos correspondientes a los mismos genotipos, polinizando las espigas de los invernáculos que presentaban estigmas expuestos. De esta manera, las polinizaciones manuales se realizaron diariamente a partir de las 9:00 h y continuaron hasta no presentarse nuevos estigmas expuestos. La detención de la elongación de los estigmas 24 h después de la polinización fue considerada como una evidencia del éxito de la polinización, tal como ha sido descrito en otros estudios (Bassetti y Westgate, 1993a, 1993b). Con el fin de evitar daños en el polen por el calentamiento en H2, las cortinas de los invernáculos permanecieron abiertas en los primeros dos días luego que las parcelas alcanzaron el estado de R1. Transcurrido R1+2 d, el cerramiento de las cortinas se inició en las parcelas de H2 y las espigas se polinizaron manualmente tal como se describió arriba. Utilizando este procedimiento, se descartaron efectos confundidos en la fijación del número de granos producidos por la baja viabilidad del polen o la esterilidad de la panoja debido a efectos del calentamiento artificial.

La temperatura del aire (Exp 1 y Exp 2; Fig. 3.1) y la humedad relativa (Exp 2) en todos los invernáculos fueron registradas cada 5 o 15 minutos (temperatura o humedad relativa, respectivamente) por medio de sensores conectados a data-loggers (Temp y Hum-Logger, Cavadevices, Buenos Aires, Argentina) durante todo el periodo de tratamiento. Dichos sensores fueron colocados al nivel de la espiga en el centro de cada parcela principal. Los datos de temperatura obtenidos en cada invernáculo fueron utilizados para el cálculo de las temperaturas medias durante el calentamiento (*i.e.*, 4 h por día durante un lapso de 15 días de tratamiento). Con el fin de monitorear el perfil de temperatura del canopeo en los invernáculos calentados, se colocaron sensores adicionales a 1, 1,5, 2 y 2,5 m de la superficie (datos disponibles sólo para el Exp 2). La temperatura de la hoja también fue medida en fechas específicas durante el periodo de tratamiento (Exp. 2) mediante un termómetro infrarrojo (HI 99556, Hanna Instruments). Las mediciones fueron realizadas en las hojas EL - 3, EL y EL + 3, donde EL representa la hoja de la espiga. Las hojas EL - 3 y EL + 3 corresponden a tres hojas por debajo y por encima de EL, respectivamente.

El efecto del calentamiento (ΔT) fue calculado como la diferencia en las temperaturas medias entre las parcelas control y calentadas (Tabla 3.1). Con el fin de

identificar el grado de calentamiento, se propuso un índice de temperaturas estresantes (*ITE*, °C h⁻¹) definido en la Eq. [4]:

$$ITE = \sum_1^N (T_i > T_o) / (h > T_o) \quad [4]$$

Donde $T_i > T_o$ indica la acumulación de temperaturas a nivel de la espiga por encima de T_o , T_o representa la temperatura óptima (34°C) propuesta por Cicchino *et al.* (2010a) y $h > T_o$ es el número de horas con temperaturas por encima de T_o .

La concentración de CO₂ en la atmósfera del canopeo fue medida durante el periodo de calentamiento con un sistema de medición portátil de intercambio gaseoso LI-6400 (LI-COR). La concentración de CO₂ fue analizada a partir de un cajón buffer que fue ubicado a 1, 1,5, 2 y 2,5 m de altura por encima del nivel del suelo (Tabla 3.3).

3.3.3. Mediciones de fotosíntesis de hoja (Amáx)

Las mediciones de fotosíntesis de la hoja de la espiga (Amáx, μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) fueron obtenidas por medio de un medidor portátil de intercambio gaseoso (LI-COR 6400). Los detalles de la cubeta empleada y las condiciones de medición se encuentran especificadas en el Capítulo II. Los datos de Amáx utilizados en este Capítulo corresponden a las mediciones obtenidas en días soleados en horas cercanas al medio día (120 min luego de iniciado el calentamiento diario) y se encuentran expresados como el promedio de al menos cinco días de medición en cada periodo analizado (tanto en precomo en posfloración). En todos los casos, previo al registro de los datos, se alcanzaron las condiciones de estabilidad establecidas por defecto en el equipo de medición (LI-COR 6400). Esta condición se logró aproximadamente entre dos a cinco minutos después del inicio de la medición.

Tabla 3.1: Datos correspondientes a las temperaturas medias, mínimas y máximas del aire y la humedad relativa (HR) medidas durante el calentamiento. El efecto de los tratamientos térmicos (ΔT , obtenido como la diferencia en las temperaturas medias entre las parcelas control y calentadas) y el índice de temperaturas estresantes (*ITE*) fueron incluidos. La fracción de tiempo con temperaturas mayores a 34°C ($h > T_o$) también fue calculada durante el calentamiento diario (4 h al rededor de medio día). Todas las mediciones fueron registradas al nivel de la espiga. Las altas temperaturas fueron inducidas durante el periodo de prefloración (H1) y posfloración (H2).

| Exp. | RT | T. Media | ΔT | T. Mín. | ΔT | T. Máx. | ΔT | $h > T_o$ | <i>ITE</i> | HR |
|-------|----|----------|------------|---------|------------|---------|------------|--------------------|------------|------|
| | | | | °C | | | h | °C h ⁻¹ | % | |
| Exp 1 | C | 29,0 | - | 22,7 | - | 34,0 | - | 6,80 | 62,8 | - |
| | H1 | 33,1 | +4,1 | 25,4 | +2,7 | 39,7 | +5,7 | 27,20 | 191,3 | - |
| | H2 | 36,1 | +7,1 | 24,2 | +1,5 | 42,4 | +8,4 | 32,40 | 369,0 | - |
| Exp 2 | C | 31,2 | - | 21,9 | - | 37,6 | - | 0,08 | 5,3 | 54,1 |
| | H1 | 35,5 | +4,3 | 24,6 | +2,7 | 42,8 | +5,2 | 17,00 | 101,8 | 45,8 |
| | H2 | 35,9 | +4,7 | 27,5 | +5,6 | 43,5 | +5,9 | 35,43 | 268,7 | 54,5 |

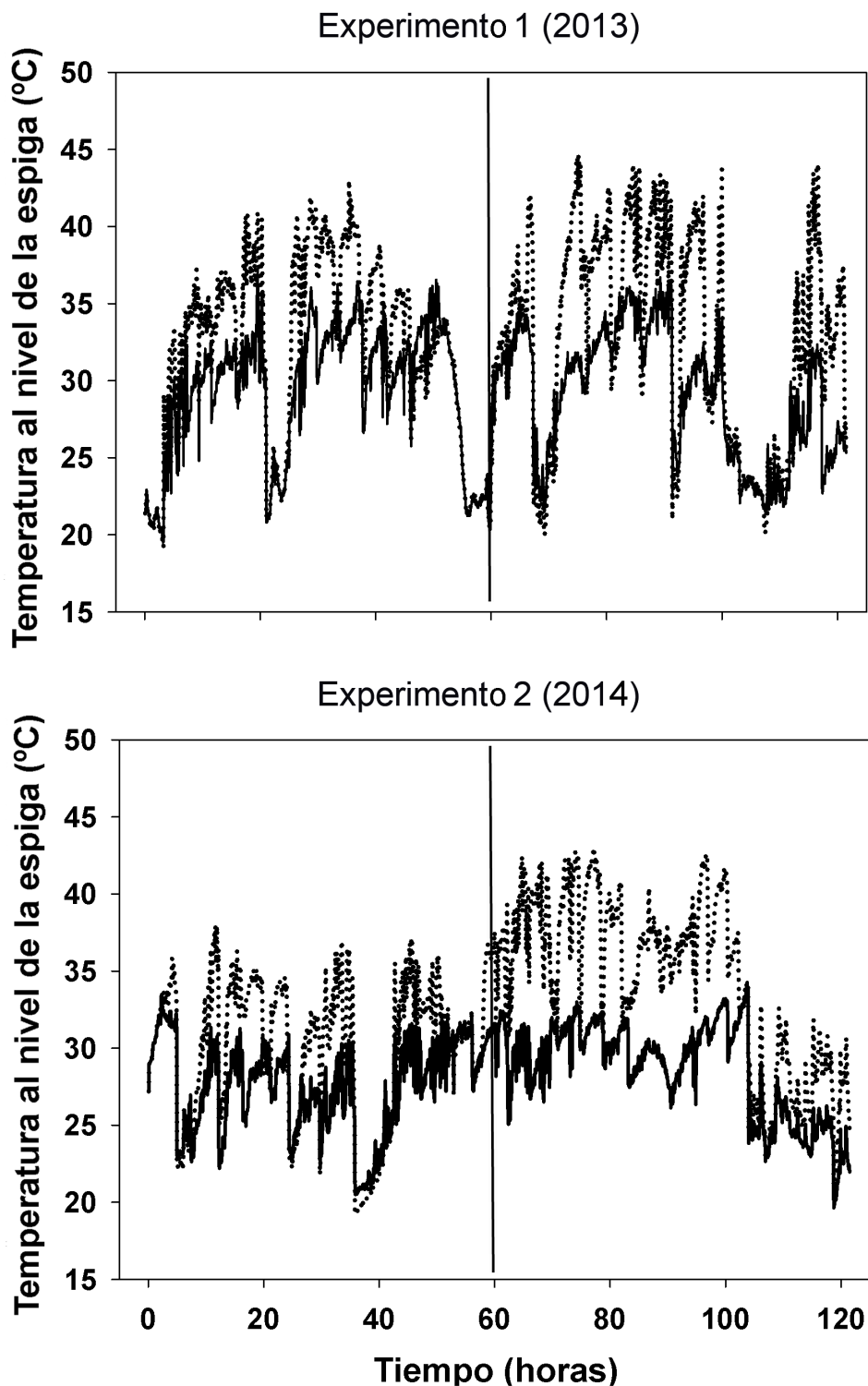


Figura 3.1: Evolución promedio de la temperatura del aire a nivel de la espiga en parcelas con calentamiento artificial (línea de puntos) y parcelas control (línea continua) durante el período de tratamiento en tres genotipos de maíz. La línea vertical representa el final (H1) o el inicio (H2) de los tratamientos térmicos. Los datos corresponden al momento en que se aplicaron los tratamientos de calentamiento.

3.3.4. Rasgos agronómicos y procesamiento de las muestras

La biomasa aérea fue medida durante el periodo crítico del cultivo. Esto se logró a partir de muestreos destructivos realizados 15 días antes de floración femenina (R1) y 15 días después de R1 (Exp. 1). Cada muestreo consistió en cortes de cinco plantas consecutivas de los líneas laterales (excluyendo las borduras) en cada sub-parcela. En el Exp. 2, un corte adicional fue llevado a cabo en R1, permitiendo el cálculo de la tasas de crecimiento del cultivo en pre- (TCC_{PRE}) o posfloración (TCC_{POS}). En todos los casos, las áreas de muestreo resultaron adecuadamente rodeadas con sus respectivas borduras. Las muestras se separaron en espiga y el resto de la planta, las cuales fueron secadas en estufa (con circulación de aire a 60°C) hasta alcanzar peso constante, para luego ser pesadas. La tasa de crecimiento del cultivo durante el periodo crítico (TCC_{PC}) fue calculada como el cociente entre la diferencia de la biomasa producida 15 días antes de R1 y 15 días después de R1 y el tiempo transcurrido entre estos muestreos. Para el cálculo de TCC_{PRE} y TCC_{POS}, el muestreo realizado en R1 fue utilizado como el punto de cómputo final o inicial, respectivamente.

Las fechas de antesis y floración femenina fueron registradas cuando el 50% de las plantas dentro de cada sub-parcela se encontraban liberando polen y el 50% de las plantas presentaron espigas con estigmas expuestos, respectivamente. El intervalo entre floración femenina y masculina (ASI; del inglés *anthesis-silking interval*) fue calculado como la diferencia entre los días a floración femenina y floración masculina. El rendimiento en grano fue determinado a madurez fisiológica por medio de la cosecha manual de 10 plantas de los dos surcos centrales de cada parcela. Las espigas fueron desgranadas individualmente para luego determinar el número de granos por conteo manual. El peso de grano fue calculado como el cociente entre el rendimiento y el número de granos por planta a madurez fisiológica.

3.3.5. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando un modelo lineal mixto:

$$Y_{hjlmn} = \mu + \alpha_h + \lambda_j + \alpha_h\lambda_j + E_l + \alpha_h E_{ml} + \lambda_j E_{ml} + \alpha_h\lambda_j E_{ml} + b_m(E_{ml}) + b_m(E_{ml})\lambda_j + r_n + e_{hjlmn}$$

Donde: Y_{hjlmn} es el valor de la variable respuesta de el h^{th} genotipo ($h = 3$) para el j^{th} régimen de térmico ($j = 3$; Control, H1, H2), el l^{th} año experimental ($l = 2$; 2013, 2014), el m^{th} bloque ($m = 3$) y la n^{th} repetición ($n = 3$); μ ; corresponde a la media general, α_h ; el efecto principal del genotipo, λ_j ; el efecto principal del régimen térmico, $\alpha_h\lambda_j$; el efecto de la interacción genotipo x régimen térmico, E_{ml} ; el efecto del año experimental, $\alpha_h E_{ml}$; la interacción genotipo x año experimental, $\lambda_j E_{ml}$; la interacción régimen térmico x año experimental, $\alpha_h\lambda_j E_{ml}$; la doble interacción genotipo x régimen térmico x año experimental, $b_m(E_{ml})$; los efectos del bloque dentro de cada año experimental, $b_m(E_{ml})\lambda_j$; los efectos del bloque dentro de los regímenes térmicos y el error experimental (e_{hjlmn}).

Los efectos de b_m , r_n , E_{ml} y las interacciones asociadas fueron contempladas como efectos aleatorios, mientras que todas las fuentes de variaciones restantes fueron consideradas como efectos fijos. Se utilizó la prueba t para muestras independientes con el fin de analizar si las temperaturas medias de los tratamientos térmicos fueron significativamente diferentes unas de otras. Los datos se compararon mediante ANAVA, correlaciones de *Pearson* entre los rasgos, análisis de regresión lineal y no lineal para las comparaciones por pares. Todas las pruebas se realizaron con el software estadístico Infostat 2011 (InfoStat, <http://www.infostat.com.ar>).

Tabla 3.2: Efectos de los regímenes térmicos sobre la fecha de floración femenina (días a R1) y el intervalo entre floración femenina y masculina (ASI). Los datos corresponden a tres genotipos de maíz (Te, templado; Tx, templado x tropical y Tr, tropical) bajo tres regímenes de temperatura: C, control; H1, altas temperaturas durante un periodo 15-d antes de floración femenina (R1); H2, altas temperaturas durante un periodo a partir de R1 + 2-d a R1 + 17-d. Dos años de experimentos fueron analizados (*i.e.*, Exp. 1 y 2).

| Experimento | Genotipo | Régimen Térmico | Fecha de siembra | d | |
|-------------|----------|-----------------|------------------|------------|-----------|
| | | | | Días a R1 | ASI |
| Exp 1 | Te | C | 18-Ene-13 | 57,3 ± 0,6 | 1,7 ± 0,6 |
| | | H1 | 18-Ene-13 | 57,7 ± 0,6 | 2,3 ± 0,6 |
| | | H2 | 18-Ene-13 | 58,0 ± 1,0 | 1,7 ± 1,1 |
| | Tx | C | 17-Ene-13 | 58,7 ± 1,1 | 1,3 ± 1,5 |
| | | H1 | 17-Ene-13 | 59,7 ± 1,5 | 2,3 ± 1,1 |
| | | H2 | 17-Ene-13 | 59,3 ± 0,6 | 1,7 ± 0,6 |
| | Tr | C | 15-Ene-13 | 61,3 ± 0,6 | 1,0 ± 1,0 |
| | | H1 | 15-Ene-13 | 61,3 ± 0,6 | 1,7 ± 0,6 |
| | | H2 | 15-Ene-13 | 60,7 ± 2,1 | 1,3 ± 2,3 |
| Exp 2 | Te | C | 21-Ene-14 | 56,7 ± 2,1 | 1,3 ± 1,5 |
| | | H1 | 21-Ene-14 | 55,3 ± 2,1 | 1,7 ± 1,5 |
| | | H2 | 21-Ene-14 | 56,3 ± 1,5 | 1,7 ± 1,1 |
| | Tx | C | 20-Ene-14 | 56,7 ± 1,5 | 1,3 ± 1,5 |
| | | H1 | 20-Ene-14 | 58,0 ± 1,0 | 2,3 ± 1,5 |
| | | H2 | 20-Ene-14 | 57,0 ± 1,0 | 1,7 ± 1,1 |
| | Tr | C | 18-Ene-14 | 58,7 ± 1,1 | 1,0 ± 1,0 |
| | | H1 | 18-Ene-14 | 59,0 ± 1,0 | 1,3 ± 0,6 |
| | | H2 | 18-Ene-14 | 59,3 ± 0,6 | 1,7 ± 1,1 |

3.4 Resultados

3.4.1. Condiciones ambientales en los invernáculos: Temperatura, Humedad relativa y Concentración de CO₂

Las temperaturas registradas a nivel de la espiga fueron mayores en el Exp. 1 que en el Exp. 2 debido a que el primer año de ensayo fue más cálido respecto al segundo (Fig. 3.1). En el Exp. 1, la temperatura a nivel de la espiga en las parcelas calentadas presentó un incremento promedio de 4,1°C durante H1 y de 7,1°C durante H2 comparado con las parcelas controles (Tabla 3.1). En el Exp. 2, los aumentos de temperatura fueron de 4,3 y 4,7°C en H1 y H2, respectivamente. Las temperaturas medias registradas a la altura de la espiga no fueron significativamente distintas entre H1 y H2 (Exp. 2, $t = 1,34$ y $p = 0,18$). Sin embargo, el índice de temperaturas estresantes (*ITE*) arrojó valores de 101,7 y 268,7°C h⁻¹ para H1 y H2, respectivamente (Tabla 3.1).

Como resultado del calentamiento artificial, se observó un incremento gradual en la temperatura de los invernáculos calentados desde la base al tope del canopeo (Fig. 3.2 A). Las diferencias de temperatura foliar entre los regímenes térmicos fueron también apreciadas en las mediciones tomadas en tres posiciones de hoja (Fig. 3.2 B). La humedad relativa no fue afectada durante el periodo de calentamiento bajo los distintos regímenes térmicos (Tabla 3.1). Por otra parte, la concentración de CO₂ en el estrato superior del canopeo (2,5 m de altura) fue de 310, 284 y 267 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ para el control, H1 y H2, respectivamente. Dichos valores de concentración de CO₂ y aquellos registrados en los estratos inferiores (0,5; 1; 1,5 y 2 m) no presentarían limitaciones para la fotosíntesis (Tabla 3.3).

Tabla 3.3: Concentración promedio de CO₂ ([CO₂]) a diferentes niveles del canopeo. Los datos corresponden a tres genotipos de maíz (Te, templado; Tx, templado x tropical y Tr, tropical) bajo tres regímenes de temperatura: C, control; H1, altas temperaturas durante un periodo 15-d antes de floración femenina (R1); H2, altas temperaturas durante un periodo a partir de R1 + 2-d a R1 + 17-d. Las mediciones fueron realizadas al medio día durante el calentamiento.

| Altura de medición (m) | Régimen de Temperatura | [CO ₂] ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) |
|------------------------|------------------------|---|
| 0,5 | C | 362 ± 69 a |
| | H1 | 367 ± 68 a |
| | H2 | 367 ± 68 a |
| 1 | C | 360 ± 67 a |
| | H1 | 355 ± 56 a |
| | H2 | 353 ± 57 a |
| 1,5 | C | 365 ± 61 a |
| | H1 | 365 ± 67 a |
| | H2 | 368 ± 68 a |
| 2 | C | 348 ± 49 a |
| | H1 | 342 ± 46 a |
| | H2 | 335 ± 31 a |
| 2,5 | C | 310 ± 17 a |
| | H1 | 284 ± 89 b |
| | H2 | 267 ± 68 b |

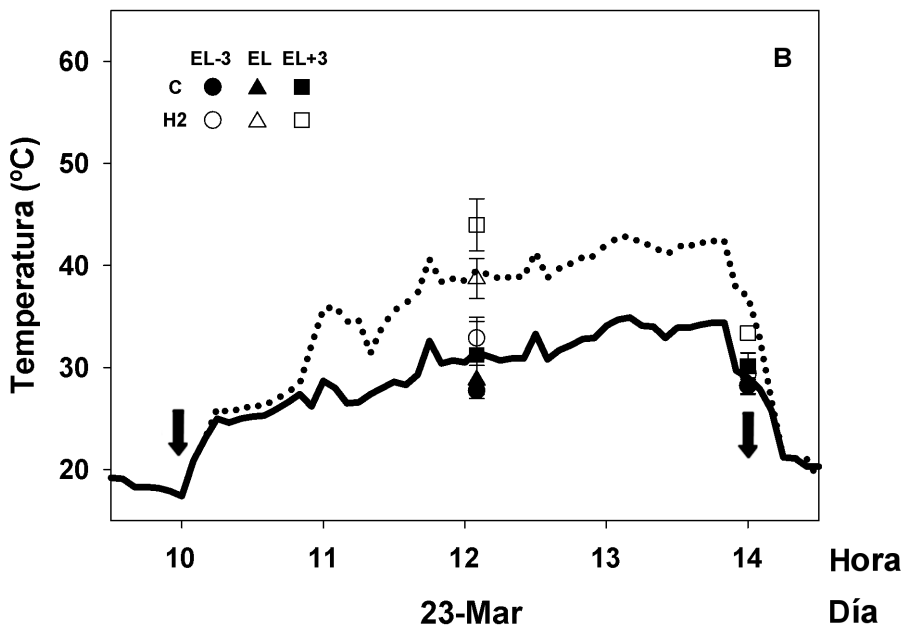
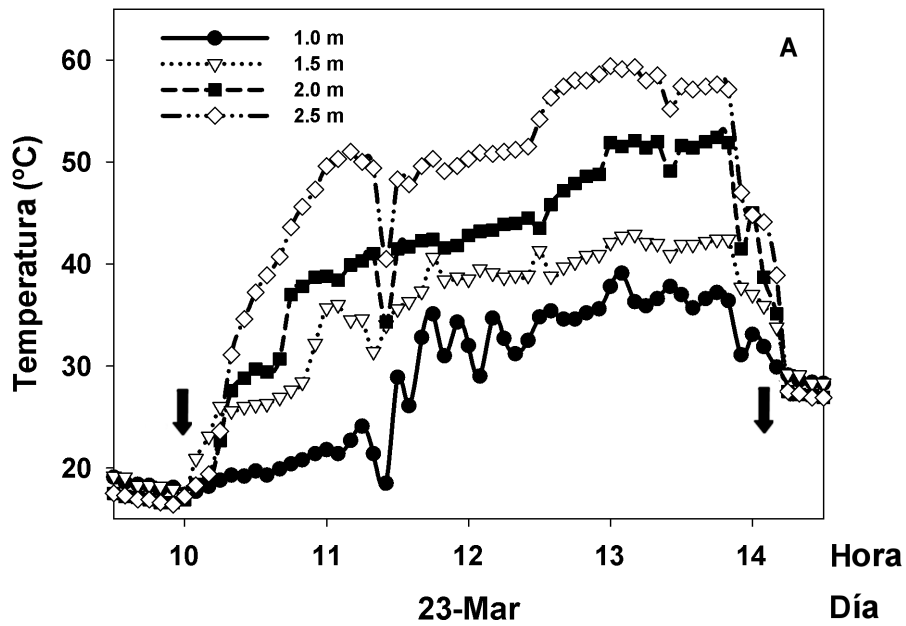


Figura 3.2: Evolución de la temperatura durante un día soleado de tratamiento (23 de marzo de 2014) en distintas posiciones del canopeo (1, 1,5, 2 y 2,5 m) en un invernáculo cerrado (A) y la evolución de la temperatura a nivel de la espiga en un invernáculo control y calentado (B). Las flechas indican el momento en que los invernáculos fueron cerrados y se volvieron a abrir al final del tratamiento térmico (datos correspondientes al Exp. 2). Los símbolos en B, corresponden a la temperatura de la hoja obtenida mediante termometría infrarroja en tres posiciones de la hoja: la hoja correspondiente a la de la espiga (EL), EL-3 y EL + 3 expresan tres hojas por debajo o por encima de EL, respectivamente.

3.4.2. Efectos del calentamiento

El escalonamiento de las fechas de siembra de los genotipos evaluados permitió obtener fechas similares de floración. Los tratamientos térmicos no modificaron significativamente ($p > 0.05$) la fenología y los valores de ASI (Tabla 3.3). Los regímenes térmicos afectaron significativamente ($p < 0,01$) todos los rasgos evaluados (excepto el peso de grano, Tabla 3.4). La fotosíntesis de hoja (Amáx) fue reducida 16,7 y 16,3% en H1 y H2, respectivamente (promedio entre tratamientos y genotipos). Al mismo tiempo, la TCC_{PC} de las parcelas calentadas disminuyó en ambos tratamientos. Dichas reducciones de TCC_{PC} relativas al tratamiento control fueron mayores en H2 (31,1 y 21,9% para Exp. 1 y Exp. 2, respectivamente) que en H1 (22,4 y 11,2%).

Las plantas sometidas al calentamiento en prefloración (H1) presentaron una recuperación de la TCC_{POS} luego de transcurrido el periodo de tratamiento, tal como lo indicaron los valores de la TCC_{POS} , los cuales no presentaron diferencias significativas con los obtenidos en las parcelas control. A pesar de que la TCC_{POS} en H1 mostró un efecto de recuperación, el rendimiento en grano no alcanzó los mismos niveles que el tratamiento control.

En concordancia con las reducciones en las TCC, las altas temperaturas en H2 condujeron a mayores reducciones en el número de granos (1546 granos m^{-2} , valores promedio entre experimentos y genotipos relativos al control) comparado con el tratamiento en H1 (213 granos m^{-2}). Como resultado, el rendimiento en grano fue reducido en 9,8 (H1) y 44,6% (H2) relativo a las parcelas control (valores promedio entre experimentos y genotipos, Tabla 3.4).

El número de granos presentó asociaciones significativas con la TCC_{PC} . En este sentido, cuando se combinaron los datos correspondientes a los distintos genotipos, los regímenes térmicos y los años de ensayo, se presentó un ajuste de las funciones que expresan la dependencia del número de granos con la TCC_{PC} (Fig. 3.3). Claramente, el momento en el que se produjo el calentamiento fue clave para la fijación del número de granos, ya que esta componente se redujo considerablemente cuando las altas temperaturas fueron aplicadas en H2 (44,5% en relación con las parcelas control; datos promedio de experimentos y genotipos) en comparación con H1 (6,7%).

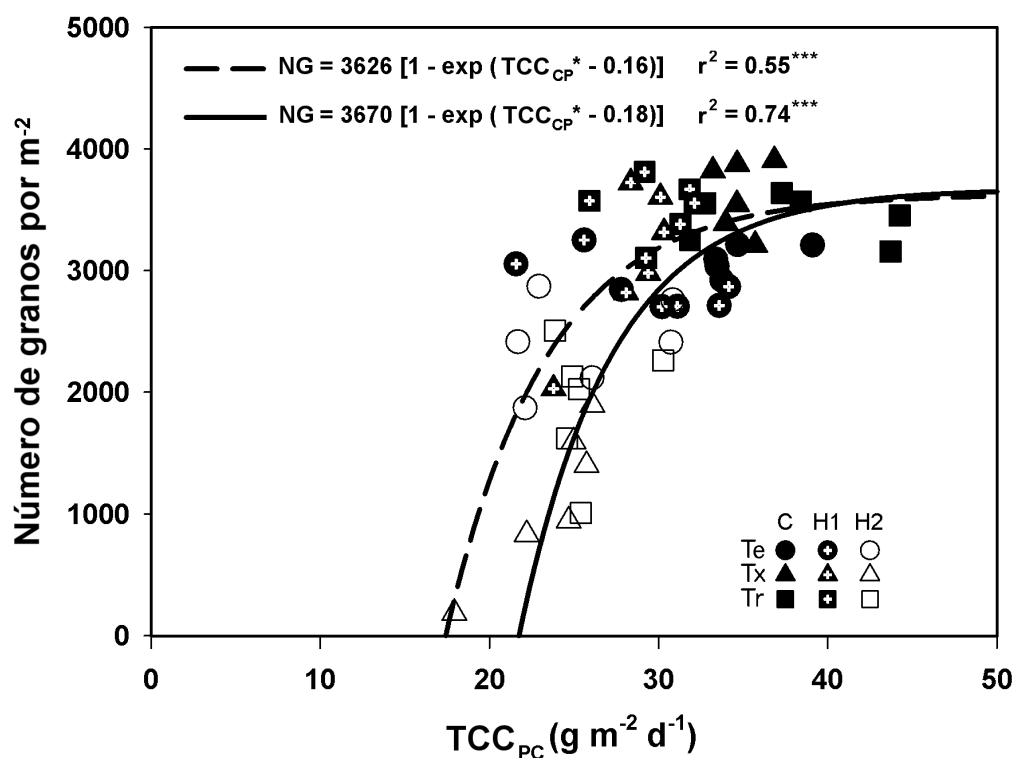


Figura 3.3: Respuesta del número de granos a las variaciones en la tasa de crecimiento en el período crítico (TCC_{PC}). La TCC_{PC} incluyó 30-d alrededor de la floración femenina. Los datos corresponden a tres genotipos de maíz (círculos, templados; triángulos, templadas × tropical; cuadrados, tropicales) bajo tres regímenes de temperatura: C, control (símbolos llenos); H1, altas temperaturas en prefloración durante un período de 15-d antes de la emisión de estigmas (símbolos semi-llenos); H2, altas temperaturas en posfloración desde R1 + 2-d para R1 + 17-d (símbolos abiertos). Las líneas llenas (Exp. 1) y punteadas (Exp. 2) representan dos años de experimentos.

4.4.3. La fotosíntesis de hoja ($Amáx$): su relación con el crecimiento y el rendimiento del cultivo

La fotosíntesis de la hoja de la espiga estuvo significativamente correlacionada con todos los rasgos medidos (excepto con el peso de grano, Tabla 3.5). Las reducciones en TCC_{PC} , TCC_{PRE} y TCC_{POS} por efecto de las altas temperaturas en H1 y H2 (Tabla 3.4), pudieron ser potencialmente explicadas por las disminuciones en $Amáx$. Estas afirmaciones se desprenden de las correlaciones significativas entre $Amáx$ y la TCC_{PC} , ($r = 0,78$ y $0,73$, [$p \leq 0,001$] para Exp. 1 y Exp. 2, respectivamente), la TCC_{PRE} ($r = 0,39$, $p \leq 0,05$, Exp 2) y la TCC_{POS} ($r = 0,51$, $p \leq 0,01$, Exp 2).

Tabla 3.4: Efecto de los regímenes térmicos (RT) sobre la fotosíntesis de la hoja de la espiga (Amáx), la tasa de crecimiento del cultivo (TCC), el número de granos (NG), el rendimiento en grano (RG) y el peso de grano (PG). La TCC_{PC} incluyó 30-d alrededor de floración femenina (R1). TCC_{PRE} y TCC_{POS} representan el periodo comprendido entre 15-d antes o después de R1, respectivamente. Los datos examinados corresponden a tres genotipos de maíz (Te, templado; Tx, templado x tropical y Tr, tropical) en dos años de experimentos (*i.e.*, Exp. 1 y 2).

| Exp. | RT | GEN | Amáx | TCC _{PRE} | TCC _{POS} | TCC _{PC} | NG | RG | PG |
|--------|----|-----|--------------------------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-------|
| | | | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | | $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ | | m^{-2} | g m^{-2} | mg |
| Exp. 1 | C | Te | 37,7 | - | - | 33,5 | 2992 | 800,7 | 271,2 |
| | | Tx | 35,6 | - | - | 34,2 | 3747 | 998,5 | 267,2 |
| | | Tr | 35,8 | - | - | 40,2 | 3389 | 1055,6 | 303,7 |
| | H1 | Te | 31,1 | - | - | 26,1 | 3003 | 740,8 | 258,9 |
| | | Tx | 28,3 | - | - | 27,4 | 3119 | 844,3 | 274,4 |
| | | Tr | 32,1 | - | - | 29,0 | 3684 | 1056,5 | 287,0 |
| | H2 | Te | 31,4 | - | - | 22,2 | 2386 | 616,2 | 271,1 |
| | | Tx | 27,2 | - | - | 21,7 | 871 | 315,0 | 289,6 |
| | | Tr | 32,4 | - | - | 24,6 | 1712 | 505,5 | 298,4 |
| Exp. 2 | C | Te | 33,6 | 32,2 | 33,1 | 32,7 | 3113 | 987,2 | 316,2 |
| | | Tx | 34,3 | 31,2 | 41,5 | 36,3 | 3502 | 1162,1 | 329,9 |
| | | Tr | 33,9 | 31,6 | 38,9 | 35,3 | 3485 | 1150,9 | 307,1 |
| | H1 | Te | 30,3 | 27,5 | 36,9 | 32,2 | 2761 | 872,6 | 317,4 |
| | | Tx | 25,2 | 24,2 | 33,9 | 29,0 | 3038 | 993,3 | 325,4 |
| | | Tr | 27,0 | 26,3 | 35,4 | 30,9 | 3345 | 1024,9 | 335,3 |
| | H2 | Te | 30,1 | 31,1 | 27,2 | 29,2 | 2430 | 719,0 | 306,0 |
| | | Tx | 26,2 | 32,4 | 22,0 | 27,2 | 1412 | 466,3 | 361,0 |
| | | Tr | 29,1 | 29,7 | 27,3 | 28,5 | 2140 | 696,1 | 331,8 |
| ANAVA | | | | | | | | | |
| RT | | | <0.0001† | 0.0467 | 0.0047 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | ns |
| GEN | | | <0.0001 | ns‡ | ns | ns | 0.0283 | 0.0046 | ns |
| RT*Hyb | | | 0.0265 | ns | ns | ns | <0.0001 | 0.0004 | ns |

† *p* valores de los efectos principales y sus interacciones.

‡ no significativo (*p* > 0,05).

Tabla 3.5: Correlaciones de Pearson entre la fotosíntesis de la hoja de la espiga (Amáx) y la tasa de crecimiento del cultivo (TCC), el número de granos (NG), el rendimiento en grano (RG) y el peso de grano (PG). La TCC_{PC} incluyó 30-d alrededor de floración femenina (R1) y TCC_{PRE} y TCC_{POS} representan el periodo comprendido entre 15-d antes o después de R1, respectivamente.

| Fotosíntesis de hoja | Rasgos Agronómicos | Experimento 1 | | Experimento 2 | |
|----------------------|--------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | | r | <i>p</i> valor | r | <i>p</i> valor |
| Amáx | TCC _{PC} | 0,78 | <0,0001 | 0,73 | <0,0001 |
| | TCC _{PRE} | - | - | 0,39 | 0,0453 |
| | TCC _{POS} | - | - | 0,51 | 0,0062 |
| | NG | 0,53 | 0,0044 | 0,49 | 0,0091 |
| | RG | 0,59 | 0,0013 | 0,46 | 0,0156 |
| | PG | 0,25 | ns† | -0,35 | ns |

† no significativo (*p* > 0,05).

Además de las correlaciones significativas entre Amáx y las tasas de crecimiento del cultivo, los efectos negativos del calentamiento sobre las TCC presentaron regresiones lineales con Amáx en los tres genotipos evaluados (Fig. 3.4). Estas conclusiones se encuentran apoyadas por el fuerte contraste de Amáx entre las parcelas calentadas artificialmente y las parcelas control (+5,4 y +7,1°C por encima de las máximas medias de temperatura de los controles para H1 y H2, respectivamente).

Si bien la respuesta del número de granos (NG) y el rendimiento en grano (RG) a las altas temperaturas fue diferente en los tratamientos H1 y H2, Amáx también explicó las variaciones observadas en el número de granos (NG) a través de la correlación significativa entre el NG ($r = 0,53$ y $0,49$ [$p \leq 0,01$] para Exp 1 y Exp. 2, respectivamente) y el RG ($r = 0,59$ [$p \leq 0,01$] y $0,46$ [$p \leq 0,05$]). Estos resultados resaltan la importancia de mantener altas tasas fotosintéticas ante la ocurrencia de episodios de alta temperatura alrededor de floración.

3.4.4. Interacciones entre los genotipos y los regímenes térmicos

Se presentaron interacciones significativas entre los genotipos y los regímenes térmicos para Amáx ($p = 0,03$), NG ($p \leq 0,0001$) y RG ($p = 0,0004$) indicando diferentes respuestas de los genotipos a través de los tratamientos térmicos. Las variaciones en Amáx debido a los regímenes térmicos y la respuesta diferencial entre los genotipos evaluados fue abordada en el Capítulo II. En forma resumida, las disminuciones en Amáx relativas al control en H1 (13,6, 23,5 y 15,1% para Te, Tx y Tr, respectivamente) y H2 (13,5, 23,6 y 11,7%) demostraron una respuesta diferencial de los genotipos a la aplicación de altas temperaturas.

Por otra parte, las reducciones de la TCC_{PRE} en H1 del genotipo Tx (22,4% relativo a las parcelas control; Exp. 2) fueron mayores que las observadas para los genotipos Te y Tr (14,4 y 16,7%, respectivamente). Por otra parte, la aplicación de altas temperaturas en posfloración (H2) condujo a las máximas reducciones de la TCC_{POS} en el genotipo Tx (47,2% relativo a las parcelas control) seguido por Tr (29,9%) y Te (18,1%).

El número de granos mostró una tendencia similar a la observada para la fotosíntesis de hoja (Amáx) en los tres genotipos evaluados. Así, conforme con las reducciones en Amáx, Tx presentó las mayores reducciones en el número de granos (67,7%) respecto de Te (20,8%) y Tr (45,2%). Como resultado, el rendimiento en grano fue reducido en 65,2, 24,8 y 48,8% debido a las altas temperaturas generadas en H2 y en 14,6, 7,6 y 2,6% bajo el tratamiento de altas temperaturas en prefloración (H1) para Tx, Te y Tr, respectivamente.

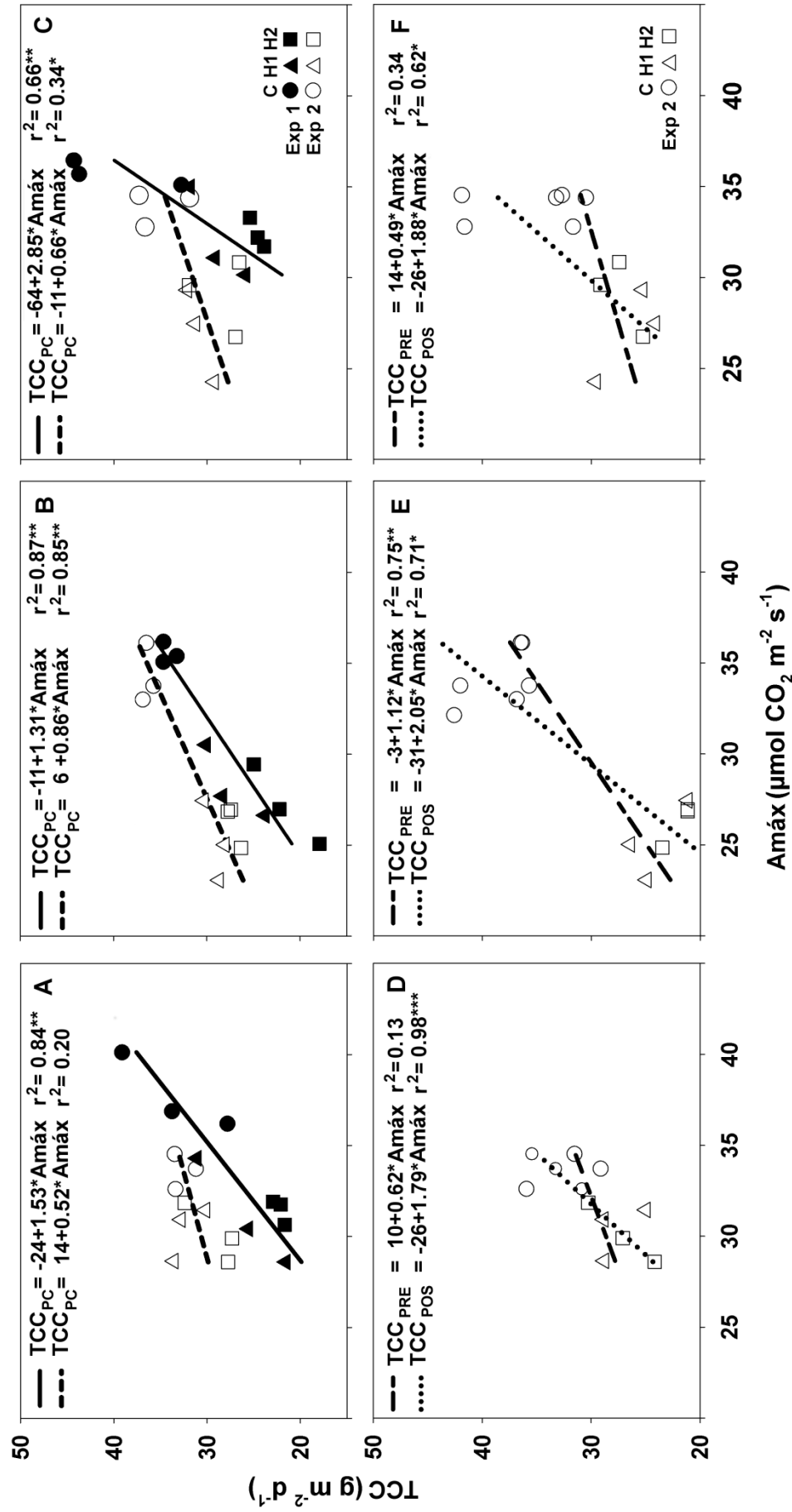


Fig. 3.4: Relaciones entre la tasa de crecimiento del cultivo (TCC_{PC} ; TCC_{PRE} y TCC_{POS} para H1 y H2, respectivamente) y la fotosíntesis de hoja ($Amáx$). La TCC_{PC} fue obtenida en un periodo de 30 días centrado en floración. TCC_{PRE} y TCC_{POS} representan las tasas de crecimiento 15 días antes o después de R1. Los datos corresponden a tres genotipos de maíz, templado (A y D); tropical x templado (B y E) y tropical (C y F), bajo tres regímenes de temperatura: C, control (círculos); H1, calentamiento durante un periodo de 15-d antes de R1 (triángulos); H2, calentamiento a partir de R1 + 2-d a R1 + 17-d (cuadrados). Las líneas llenas (Exp. 1) y punteadas (Exp. 2) representan dos años de experimentos.

3.5 Discusión

3.5.1. Consecuencias del calentamiento artificial

La utilización de invernáculos de polietileno permitió alcanzar diferencias de temperatura de hasta 10°C a nivel de la espiga entre las parcelas calentadas y controles (Fig. 3.1). El periodo de calentamiento diario fue relativamente corto (4 h) con el fin de simular un régimen de calentamiento acorde al momento en el que se dan las máximas temperaturas diarias y perturbar lo menos posible la atmósfera del canopeo en los invernáculos calentados. Las parcelas calentadas artificialmente presentaron valores similares de humedad relativa durante los periodos de tratamiento respecto a las parcelas control. Por otra parte, a pesar que la cobertura plástica de los invernáculos disminuyó la cantidad de radiación entre 10 y 12% (datos no mostrados), los invernáculos estuvieron presentes en todos los tratamientos, no esperándose ninguna desviación entre los tratamientos por el efecto de reducciones en la cantidad y/o calidad de la radiación incidente.

En el estrato superior del canopeo, las concentraciones de CO₂ en los tratamientos con altas en temperaturas en pre- (H1) y posfloración (H2) fueron más bajas que en los controles. Dichos valores en los invernáculos calentados (aprox. 260-280 μmol mol⁻¹), los cuales fueron ~15% más bajos que los controles, podrían limitar sólo ligeramente la fotosíntesis de hoja en maíz (Bunce, 2005). Además, en las restantes posiciones del canopeo donde se analizó la concentración de CO₂ (*i.e.*, 0,5, 1, 1,5 y 2 m), éstas no fueron significativamente diferentes entre las parcelas calentadas y no calentadas (Tabla 3.3). Por otra parte, las mediciones de fotosíntesis en la hoja de la espiga (Amáx) presentaron concentraciones de CO₂ en la cámara sub-estomática cercanas a 130 μmol mol⁻¹, las cuales no se espera que causen disminuciones en Amáx en el rango de temperaturas obtenido (Massad *et al.*, 2007).

3.5.2. Efectos generales de las altas temperaturas alrededor de floración

Con el fin de cuantificar el grado de calentamiento se propuso un índice de temperaturas estresantes (*ITE*), el cual contempló la intensidad del calentamiento como la sumatoria de temperaturas por encima de una temperatura óptima umbral y la duración de dicho periodo. El cálculo de la temperatura óptima no se pudo llevar a cabo como resultado de la falta de diferencias significativas en la fenología del cultivo por efectos del calor. Debido a esto, se utilizó 34°C como temperatura óptima (Cicchino *et al.*, 2010a). Estos autores obtuvieron dicho valor como resultado de cálculos entre las sumatorias de tiempo térmico de las floraciones masculinas y femeninas en parcelas de maíz con y sin calentamiento artificial a campo. El índice propuesto en este Capítulo (*ITE*) mostró ser útil para inferir sobre las disminuciones en rendimiento en grano por efectos de las altas temperaturas. Inclusive, el *ITE* ayudó a explicar las diferencias entre las parcelas control en los dos años de experimentos, donde los controles en el Exp. 1 (*ITE* = 62,8°C h⁻¹) rindieron en promedio 16% menos que los controles en el Exp. 2 (*ITE* = 5,3°C h⁻¹).

Por otra parte, los valores de fotosíntesis de hoja de la espiga (Amáx) en las parcelas control fueron levemente menores relativos con otros estudios (Sadras *et al.*,

2000; Takele y Farrant, 2013). Esta discrepancia podría ser explicada por las diferencias en las metodologías de medición de Amáx, presentándose menores tiempos de aclimatación en este trabajo. Debido a que la metodología de medición de Amáx fue similar en todos los regímenes térmicos, se pueden descartar diferencias entre tratamientos relacionadas con esta cuestión.

Por otra parte, las reducciones en fotosíntesis de hoja (Amáx) debido al estrés por altas temperaturas fueron más bajas que las reducciones de la TCC_{PC} . Por un lado, las disminuciones medias en Amáx calculadas en este capítulo corresponden a aquellas medidas un mayor número de veces en la mitad del calentamiento diario (*i.e.*, 120 min), encontrándose las mayores diferencias genotípicas pero no las mayores disminuciones en Amáx (*i.e.*, 240 min; Capítulo II). Por otra parte, las mayores temperaturas en los estratos superiores al de la hoja de la espiga pudieron conducir a reducciones más pronunciadas en la fijación de CO_2 . Como consecuencia, las mediciones de Amáx medidas en la mitad del calentamiento, probablemente condujeron a sub-estimar las reducciones de esta variable.

Las disminuciones en la tasa de crecimiento del cultivo (TCC) y el número de granos (y consecuentemente, en el rendimiento) estuvieron asociadas con los efectos de las altas temperaturas sobre Amáx en ambos experimentos, como lo han indicado las correlaciones entre Amáx y TCC_{PC} ($r = 0,78$ y $0,73$ [$p \leq 0,001$]; Exp. 1 y Exp. 2, respectivamente), NG ($r = 0,53$ y $0,49$ [$p \leq 0,01$]), RG ($r = 0,59$ [$p \leq 0,01$] y $0,46$ [$p \leq 0,05$]). Estos resultados concuerdan con estudios que identificaron relaciones curvilíneas entre el número de granos y la fotosíntesis en floración (Edmeades y Daynard, 1979) o variaciones en el número de granos atribuibles a cambios en la tasa de crecimiento por planta alrededor de floración (Tollenaar *et al.*, 1992; Andrade *et al.*, 1999; Echarte *et al.*, 2004; Rattalino Edreira y Otegui, 2013).

Al igual que las recuperaciones de Amáx y otras variables fisiológicas discutidas en el Capítulo II, también se presentaron efectos de recuperación en la TCC_{POS} en el calentamiento en prefloración (H1), alcanzando esta variable los mismos niveles del tratamiento control. Dicha recuperación estuvo en concordancia con Rattalino Edreira y Otegui (2012). Estos autores evidenciaron que luego de removido el estrés térmico, las plantas que recibieron el tratamiento de altas temperaturas alrededor de floración presentaron recuperaciones en sus tasas de crecimiento, alcanzando valores similares a los testigos nunca calentados. A pesar de las recuperaciones observadas en este Capítulo, los aumentos en los niveles de Amáx y en la TCC_{POS} una vez liberado el estrés, no se trasladaron en incrementos en el número de granos. Este último aspecto se encuentra vinculado a que el estrés aplicado días antes de la floración resulta en el aborto de ovarios atribuidos a efectos del estrés (Edmeades *et al.*, 2000), así como a reducciones en la disponibilidad de asimilados (Otegui y Bonhomme, 1998). En otras palabras, las recuperaciones en Amáx y TCC_{POS} luego de la eliminación del estrés por calor no fueron capaces de revertir este proceso.

Los resultados obtenidos en este Capítulo sugieren que los efectos de las altas temperaturas sobre la TCC, el número de granos y el rendimiento fueron mayores durante

el calentamiento en posfloración comparado con el calentamiento en prefloración. Las disminuciones en NG ($r = 0,81$; $p \leq 0.001$) y RG ($r = 0,85$; $p \leq 0,001$) se encontraron fuertemente asociadas con las reducciones en la TCC_{POS} . A pesar que la TCC_{PRE} se vio afectada por el estrés por calor en prefloración, esta variable no presentó correlaciones significativas con los componentes del rendimiento. En relación con otros estudios, los efectos negativos del calor expuestos en este Capítulo, estuvieron asociados principalmente con la reducción de las TCC en pre- y posfloración como ha sido informado ante deficiencias hídricas y de N (Muchow y Davis, 1988; Uhart y Andrade, 1995; Andrade *et al.*, 2002) y más recientemente bajo estrés por altas temperaturas (Rattalino Edreira y Otegui, 2013).

Las reducciones en la fotosíntesis de hoja durante el calentamiento en posfloración (H2) condujeron a reducciones de ~28% en la TCC_{PC} y disminuciones de al menos 40% en el número y el rendimiento en grano durante este período. El fuerte descenso del número de granos en respuesta a las disminuciones de la TCC y el umbral más alto de TCC para el inicio de la fijación de granos en comparación con otros estudios (Andrade *et al.*, 1999; Fig. 1, 2), estarían indicando que la disminución del número de granos no fue completamente atribuible a las reducciones de la TCC por efecto del estrés térmico. En este sentido, Rattalino Edreira y Otegui (2013) establecieron que las pérdidas en el número de granos no estuvieron enteramente relacionadas con el flujo de asimilados hacia la espiga. Estos hallazgos indicarían la presencia de efectos directos de las altas temperaturas en la fijación del número de granos.

3.5.3. Potenciales mecanismos de tolerancia al estrés térmico que expliquen las diferencias genotípicas

Las mayores disminuciones en fotosíntesis de hoja fueron identificadas en el genotipo templado x tropical (Tx), seguidas por el tropical (Tr) y el templado (Te). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en el Capítulo II para el mismo set de genotipos. No obstante, este *ranking* genotípico se contradice con lo reportado en estudios previos utilizando un ejemplar (*i.e.*, Te, Tx y Tr) de cada grupo de germoplasma (Rattalino Edreira y Otegui 2012, 2013). Estos autores reportaron menor rendimiento de un genotipo Te luego de episodios de altas temperaturas comparado con sus contrapartes Tr y Tx. Las causas de estas discrepancias no son del todo claras. Por un lado, un número limitado de genotipos en ambos estudios hace difícil realizar amplias inferencias. Además, las condiciones climáticas (subtropicales en este estudio y templadas en Rattalino Edreira y Otegui 2012, 2013) presentes en ambos estudios así como la duración (4 h vs. ~12 h) y la intensidad del estrés térmico (43,5 vs. 40,0°C de temperaturas máximas a nivel de la espiga) fueron disímiles en ambas investigaciones. Estas diferencias podrían potencialmente explicar las diferencias entre ambos estudios.

A pesar que los genotipos Tr y Te presentaron una mayor tolerancia a las altas temperaturas en comparación con el genotipo Tx, en condición control el genotipo Te rindió menos que los controles de Tr y Tx. Posiblemente, la condición de clima subtropical en este estudio condujo a una penalidad en el rendimiento del genotipo Te bajo la situación control.

En relación con los esfuerzos de los programas de mejoramiento por altas temperaturas, la identificación de germoplasma tolerante al calor ha mostrado ser una tarea difícil debido a la baja heredabilidad del rendimiento en grano (Weber *et al.*, 2012) y la amplia interacción genotipo x ambiente en estas condiciones (Cairns *et al.*, 2013). Considerando la fuerte correlación entre la fotosíntesis de hoja con las tasas de crecimiento del cultivo, el número de granos y el rendimiento, como así también las bajas heredabilidades y la difícil obtención de germoplasma tolerante al calor (Cairns *et al.*, 2013), la fotosíntesis de hoja o rasgos secundarios asociados con fenómenos de autorregulación (*i.e.*, homeostasis) son de uso potencial en la selección de genotipos tolerantes. Las investigaciones recientes relacionadas con la utilización de cámaras multi-espectrales y termales montadas a vehículos aéreos son promisorias en programas de mejoramiento y serán abordadas en el siguiente Capítulo.

3.6 Conclusiones

La fotosíntesis de hoja fue afectada de igual manera por las altas temperaturas durante el periodo de prefloración comparado con posfloración, con distintos efectos en los genotipos evaluados en este estudio. Además, las reducciones en la fotosíntesis de hoja como resultado de las altas temperaturas estuvieron directamente relacionadas con las variaciones en la tasa de crecimiento del cultivo, el número de granos y el rendimiento. Las mayores reducciones del rendimiento en grano tuvieron lugar cuando el estrés térmico fue aplicado en posfloración. Adicionalmente, el genotipo Tx resultó ser más sensible a los efectos del calor y tuvo las mayores disminuciones en las variables medidas en comparación Te y Tr. Las correlaciones entre la fotosíntesis de hoja y los rasgos medidos fueron consistentes en los tres genotipos de genética contrastante.

CAPÍTULO IV: TEMPERATURA DE CANOPEO Y NDVI, SU POTENCIAL APORTE EN PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO POR ESTRÉS TÉRMICO ALREDEDOR DE FLORACIÓN

4.1. Introducción

En los capítulos anteriores se pretendió avanzar en el conocimiento de la respuesta fisiológica ante eventos de estrés térmico por altas temperaturas y cómo dichos procesos fisiológicos se pueden relacionar directamente con el rendimiento de maíz. Algunas de las mediciones realizadas en los experimentos planteados anteriormente, pueden ser difíciles de abordar en programas de mejoramiento que involucren una gran cantidad de genotipos. De ahí la necesidad de buscar rasgos que sean rápidamente medibles y demuestren estar relacionados con las ganancias genéticas en cada ciclo de selección.

Este capítulo pretende abordar caracteres fisiológicos que puedan asistir al mejoramiento por altas temperaturas. Con el fin de contrastar la respuesta de los distintos genotipos evaluados ante episodios de estrés térmico, se incorporó la ocurrencia de dos condiciones hídricas alrededor de la floración.

4.2. Objetivos:

El objetivo de este capítulo fue evaluar la temperatura de canopeo y NDVI en función de su heredabilidad, correlación con el rendimiento y ganancias genéticas para su utilización en programas de mejoramiento por estrés térmico por altas temperaturas bajo dos condiciones hídricas.

4.3. Materiales y Métodos:

4.3.1. Condiciones ambientales y características del germoplasma utilizado

El experimento fue conducido en la Estación Experimental de Ciudad de Obregón, Sonora, México (27°20' N, 109°54' W, 38 msnm), la cual pertenece al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Las temperaturas medias fueron de 29,8°C durante el ciclo de cultivo y de 31,2°C alrededor de floración, con temperaturas mínimas y máximas absolutas obtenidas por imágenes aéreas de 25°C y 50°C, respectivamente. Dichas temperaturas generaron condiciones de estrés térmico similares en intensidad a las obtenidas artificialmente por medio de invernáculos en los Capítulos II y III. Las temperaturas y las precipitaciones obtenidas en casilla meteorológica durante el ciclo del cultivo son presentadas en la Fig. 4.1.

El ensayo estuvo compuesto por 71 genotipos de maíz sembrados el 23 de mayo de 2013. Cada parcela consistió en dos líneas de 5 metros de largo, con un distanciamiento entre plantas de 0,19 metros en el línea y 0,80 metros en el entre línea. Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño en bloques incompletos al azar con dos repeticiones. El experimento fue conducido bajo dos condiciones hídricas contrastantes: (i) sin limitantes hídricas y (ii) con déficit hídrico en floración. En el tratamiento sin limitantes hídricas (en adelante referido como tratamiento de estrés térmico sin limitantes hídricas; ET), el cultivo fue continuamente regado durante todo su ciclo. Por otro lado, el tratamiento con limitantes hídricas en floración (en adelante referido como tratamiento de estrés térmico más hídrico; ET+EH), el riego fue reducido al 50% relativo al tratamiento sin limitantes hídricas, iniciándose dos semanas antes de floración y finalizando la restricción hídrica dos semanas después de floración.

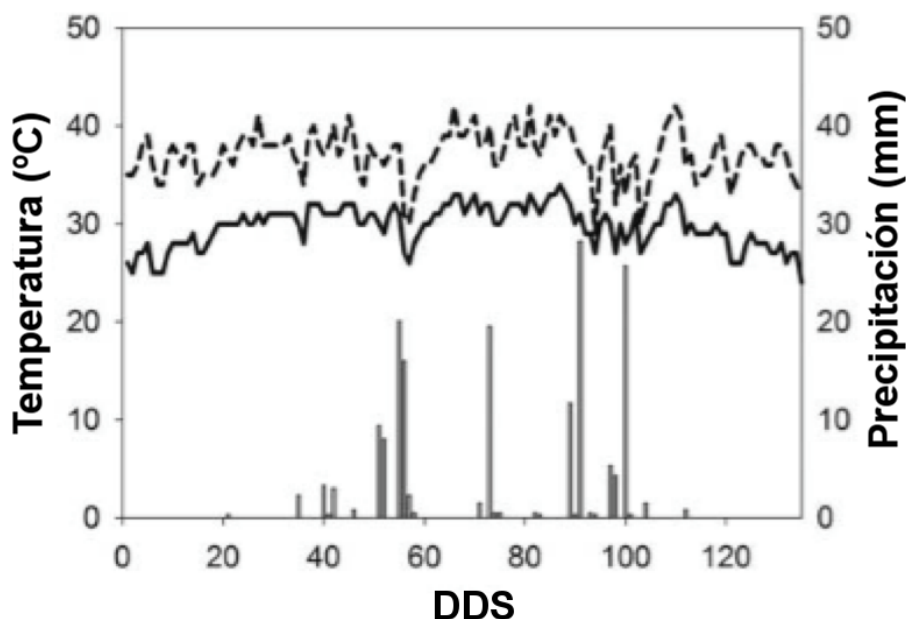


Figura 4.1: Temperaturas medias (línea continua) y máximas (línea discontinua) y precipitaciones (barras) medidas a través del periodo de crecimiento del cultivo expresado en días después de la siembra (DDS).

Los tratamientos de ET o ET+EH fueron designados aleatoriamente constituyendo las parcelas principales, mientras que los genotipos fueron asignados al azar en la parcela principal, conformando las sub-parcelas. La siembra se realizó manualmente, colocando dos semillas por orificio efectuando el raleo correspondiente en el estado V3. La densidad final de plantas fue 6,68 plantas m⁻². Al momento de la siembra, todas las parcelas recibieron una aplicación de 100 kg ha⁻¹ de fosfato monoamónico [(NH₄) H₂PO₄] y 500 kg ha⁻¹ de sulfato de amonio [(NH₄)₂ SO₄]. Una segunda aplicación de 250 kg ha⁻¹ de sulfato de amonio fue realizada en V5. Siempre que fuere necesario, se realizó el control de malezas, plagas y enfermedades. El riego por goteo se aplicó semanalmente utilizando una tasa de 5 mm/h. Los turnos de riego fueron semanales con una duración de 6 a 14 h dependiendo de la evapotranspiración potencial del cultivo.

4.3.2 Rasgos agronómicos

Las fechas de antesis y R1 fueron registradas cuando el 50% de cada sub-parcela alcanzó la liberación del polen e inició la emisión de estigmas, respectivamente. El intervalo entre antesis-emisión de estigmas (ASI, del inglés *Anthesis-Silking Interval*) fue calculado como la diferencia entre los días a R1 y los días a antesis. Cuando las parcelas alcanzaron la madurez fisiológica, todas las plantas fueron cosechadas manualmente para la obtención del rendimiento en grano, el cual fue expresado en peso seco.

4.3.3 Mediciones de Temperatura de Canopeo y NDVI utilizando un vehículo aéreo

Con el fin de contrastar los tratamientos, la campaña de vuelo fue realizada entre las 12:30 y 13:00 h en Agosto de 2013 (dos semanas después de la fecha media de antesis de los genotipos). El plan de vuelo fue diseñado para sobrevolar el lugar en dirección este a oeste y de oeste a este. La altitud de vuelo fue de 270 m por encima de la superficie, a una velocidad de avance de 33,33 m s⁻¹. La campaña de vuelo se llevó a cabo con una

cámara multispectral (Tetracam, Chatsworth, CA) y una cámara térmica (cámara infrarroja A600, Flir, Wilsonville, OR). Ambas cámaras fueron a bordo de un avión tripulado Piper PA-16 Clipper (Piper, Vero Beach, FL). Las imágenes térmicas de alta resolución permitieron identificar píxeles puros de vegetación en cada bloque experimental para extraer la temperatura del canopy (Fig. 4.2). La cámara multispectral presentó una resolución radiométrica de 10 bits, configurados a seis bandas de longitud de onda; 550, 670, 700, 710, 750, 800 nm. El NDVI se calculó basándose en longitudes de onda medidas con el sensor multispectral.

4.3.4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con un modelo lineal mixto abarcando la media general (μ), los efectos genotípicos (α_j), el efectos de los bloques (β_i) y el error experimental (ε_{ij}). Los efectos de bloque fueron considerados aleatorios en el modelo. Con el fin de explicar la variable respuesta (γ_{ij}), el modelo quedó conformado de la siguiente manera:

$$\gamma_{ij} = \mu + \beta_i + \alpha_j + \varepsilon_{ij}$$

Se obtuvieron los componentes de la varianza, la heredabilidad y la mejor predicción lineal no sesgada (BLUP). Los componentes de la varianza se estimaron por máxima verosimilitud restringida y la heredabilidad fue calculada como la relación entre las variaciones genéticas y fenotípicas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \sigma_e^2/r}$$

Los BLUPs para los efectos genotípicos (utilizados como predictores de corrección) fueron obtenidos utilizando una matriz de notación de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\alpha = \hat{\mathbf{G}}\mathbf{Z}'\hat{\mathbf{V}}^{-1}(\mathbf{y} - \mathbf{1}\mu)$$

Donde: \mathbf{y} es el vector de la variable respuesta, $\hat{\mathbf{G}}$ es la matriz de variancia y co-variancia de los efectos aleatorios, \mathbf{Z} es la matriz diseñada para los efectos aleatorios del modelo, $\hat{\mathbf{V}}$ es la variancia estimada de \mathbf{y} , $\mathbf{1}$ es un vector de uno y μ representa la media general, que es el único parámetro fijo en el modelo. Con el objetivo de disminuir los efectos causados por la diferencia de ciclo entre los genotipos, todos los resultados de rendimiento en grano fueron corregidos por la fecha de antesis, siendo esta última incluida como co-variable en el modelo.

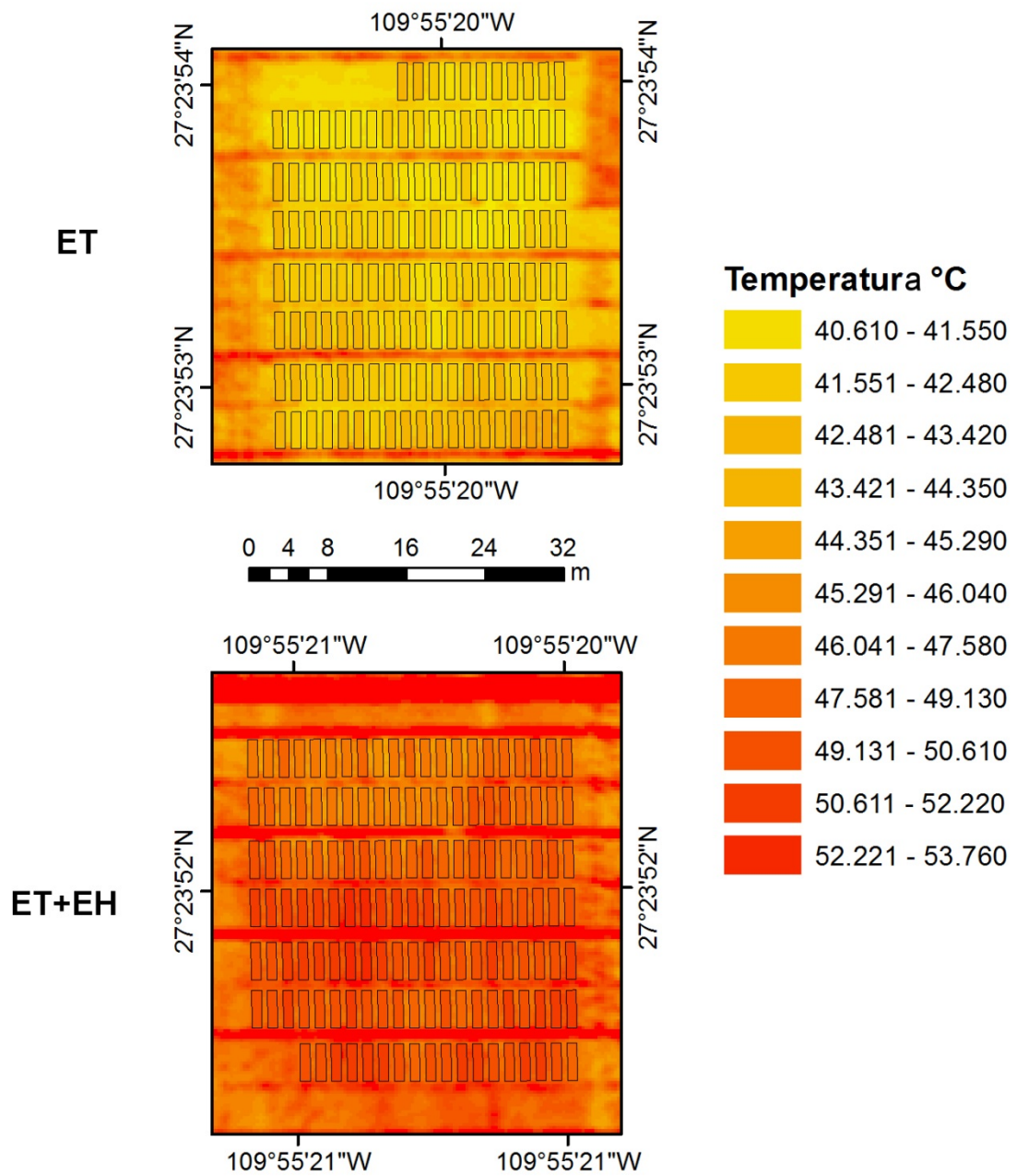


Figura 4.2: Imagen térmica incluyendo el total de parcelas evaluadas en condiciones de alta temperatura con (ET+EH) y sin limitantes hídricas alrededor de la floración (ET).

Las correlaciones genéticas entre los rasgos medidos fueron estimadas por el método descrito por Cooper y Hammer (1996). La ganancia genética esperada (GE) de un rasgo (1) seleccionado a partir de una medición indirecta (2) fue una función de la raíz cuadrada de la heredabilidad de estos dos rasgos (h_1 y h_2), la correlación genética entre ellos (r_{12}), la variabilidad fenotípica del rasgo de interés (s_1), el desvío estándar y la presión de selección (i):

$$GE = is_2h_1h_2r_{12}$$

Si la selección fue realizada directamente por el rasgo de interés, entonces r_{12} es igual a 1 y h_1 por h_2 es la heredabilidad del rasgo:

$$EG = is_1h_1^2$$

Debido a que el rasgo de mayor interés es el rendimiento en grano y que i , s_2 y h_1 permanecen constantes, con independencia de la medición indirecta utilizada para la selección, se calculó la ganancia genética relativa para comparar los diferentes criterios de selección:

$$REG = h_2r_{12}/h_1$$

Nótese que para la selección directa, REG es igual a 1.

Un análisis de componentes principales (ACP), basado en la matriz de correlaciones genéticas, fue utilizado para identificar las combinaciones de los rasgos asociados con la variación genética del rendimiento en grano como una función de las correlaciones genéticas bajo altas temperaturas en las dos condiciones hídricas ensayadas.

4.3.4.1 Índices de selección

El efecto de la selección fue examinado con tres índices diferentes. El primer índice (S1) incluyó rendimiento en grano, ASI, NDVI y temperatura de canopy; para el segundo (S2) el rendimiento en grano fue excluido y el tercer índice (S3) constó solamente de temperatura de canopy y NDVI. Para estos diferentes índices, se calculó la ganancia genética esperada relativa para el rendimiento. Se utilizó el índice de selección de Smith (Smith, 1936), obteniéndose éste por un código propio escrito en SAS por el cuerpo de bioestadística de CIMMYT (Alvarado *et al.*, 2015).

Las curvas ROC (del inglés: *receiving operating characteristic*) fueron utilizadas para evaluar los diferentes índices de selección propuestos. En un primer paso de la construcción de las curvas ROC, se obtuvo una selección diferencial utilizando únicamente el rendimiento en grano como variable predictiva, clasificando todos los genotipos ya sea "seleccionado" o "no seleccionado". De esta manera, la selección se llevó a cabo utilizando un índice de selección o un rasgo secundario en una tabla de contingencia (2×2), donde las filas representaron los genotipos seleccionados en base a los diferentes índices, mientras que las columnas reflejan los genotipos seleccionados o no seleccionados en base al rendimiento en grano. Para cada presión de selección, se calculó la sensibilidad y especificidad. La primera indica el porcentaje de entradas

seleccionadas por la medición indirecta con respecto a la selección basada en el rendimiento de grano (sensibilidad) y la segunda indica el porcentaje de entradas no seleccionados por la medición indirecta con respecto a la selección basada en rendimiento (especificidad). Los resultados en las curvas ROC se muestran como la especificidad graficada en función de 1-sensibilidad. Una medida global de la calidad del método es el área bajo la curva (ABC), donde 1 y 0,5 indican una selección perfecta y al azar, respectivamente. Las curvas ROC se calcularon utilizando la sentencia PROC LOGÍSTICO de SAS. Finalmente, se realizaron pruebas de comparación entre los diferentes índices propuestos.

4.4. Resultados

4.4.1. Efectos del estrés térmico por altas temperaturas bajo dos regímenes hídricos alrededor de floración

El rendimiento en grano (RG) varió entre 0,33 y 4,19 Mg ha⁻¹ en condiciones de estrés térmico sin limitantes hídricas y entre 0 y 1,37 Mg ha⁻¹ cuando se combinó estrés térmico con limitantes hídricas alrededor de floración (Tabla 4.1). No se observaron incidencias importantes de plagas durante la estación de crecimiento del cultivo, lo que sugiere que las altas temperaturas resultaron en disminuciones en el rendimiento en comparación con los mismos genotipos sembrados en otras estaciones experimentales del CIMMYT. Cabe destacar que, bajo condiciones óptimas, los 71 genotipos subtropicales evaluados obtuvieron rendimientos promedio por encima de los 10 Mg ha⁻¹ (datos no mostrados).

La combinación de altas temperaturas y déficit hídrico redujo el rendimiento en grano 83,4% respecto al tratamiento de estrés térmico sin limitantes hídricas (reducciones medias entre genotipos). Dichas reducciones estuvieron asociadas con el incremento de la temperatura de canopeo, alcanzando 42,5°C en el tratamiento de estrés térmico sin limitantes hídricas (ET) y 49,5°C cuando se restringió el riego alrededor de floración (ET+EH). Otros efectos de ET+EH relativos a ET fueron disminuciones promedio en el NDVI (-0,06) y alargamientos en las fechas de floración femenina (+3 días). En ET+EH, los mayores valores promedio de ASI (+4 días respecto a ET), causados por la reducción en la disponibilidad de agua, tal vez contribuyeron a las reducciones en rendimiento. Los genotipos evaluados presentaron una amplia variación en el número de días a floración femenina (R1), con diferencias de 12 y 26 días entre la primera y la última fecha a R1 en ET y ET+EH, respectivamente.

Tabla 4.1: Promedio, mínima, máxima, así como el primer y tercer cuartil para el rendimiento de grano (RG), la temperatura de canopeo (TC), el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI), los días a floración femenina (Días a R1) y el intervalo entre floración femenina y masculina (ASI). Los datos corresponden a ensayos de altas temperaturas bajo dos condiciones hídricas: sin limitantes hídricas (ET) y con restricciones hídricas en floración (ET+EH).

| | | RG Mg ha ⁻¹ | TC °C | NDVI - | Días a R1 d | ASI |
|---------------|-------|---------------------------|----------|-----------|----------------|------|
| ET | Media | 2,35 | 42,1 | 0,54 | 71,1 | 2,95 |
| | Mín. | 0,33 | 40,6 | 0,49 | 64,0 | 0,0 |
| | Máx. | 4,19 | 45,3 | 0,59 | 76,0 | 9,0 |
| | Q1 | 1,69 | 41,6 | 0,52 | 69,0 | 2,0 |
| | Q3 | 3,05 | 42,5 | 0,55 | 73,0 | 4,0 |
| ET + EH | Media | 0,32 | 49,5 | 0,48 | 74,2 | 6,58 |
| | Mín. | 0,00 | 46,0 | 0,45 | 62,0 | -1,0 |
| | Máx. | 1,37 | 53,8 | 0,52 | 88,0 | 19,0 |
| | Q1 | 0,07 | 48,4 | 0,48 | 69,0 | 2,0 |
| | Q3 | 0,49 | 50,7 | 0,48 | 81,0 | 12,0 |

La temperatura de canopeo se correlacionó negativamente con el rendimiento en grano (Fig. 4.3 A) en ambos tratamientos ($r = -0,56$ y $r = -0,75$ para ET y ET+EH, respectivamente). La variancia genotípica correspondiente a la temperatura de canopeo fue significativa solamente bajo la condición de altas temperaturas y riego restringido, mientras que la variancia genotípica para el NDVI fue significativa únicamente para el tratamiento de estrés térmico sin limitantes hídricas (Tabla 4.2). Una correlación fenotípica positiva ($r = 0,45$) entre el NDVI y el rendimiento en grano fue también detectada en el tratamiento de estrés térmico sin limitantes hídricas (Fig. 4.3 B).

4.4.2. Heredabilidad, Correlaciones Genéticas y Ganancias Genéticas

La heredabilidad de los rasgos medidos fue generalmente más alta bajo la condición de estrés térmico sin limitantes hídricas (ET) respecto a la combinación de estrés térmico e hídrico en floración (ET+EH). Una fuerte reducción en la heredabilidad fue observada para el NDVI, la cual fue de $h^2 = 0,79$ en ET y $h^2 = 0,36$ en ET+EH, mientras que las diferencias en heredabilidad entre ambos tratamientos fueron menores en los rasgos relacionados con la floración (*i.e.*, fecha de Antesis, R1 y ASI; Tabla 4.2). La temperatura de canopeo fue el único rasgo que presentó mayor heredabilidad bajo ET+EH comparado con ET ($h^2 = 0,52$ y $h^2 = 0,32$, respectivamente).

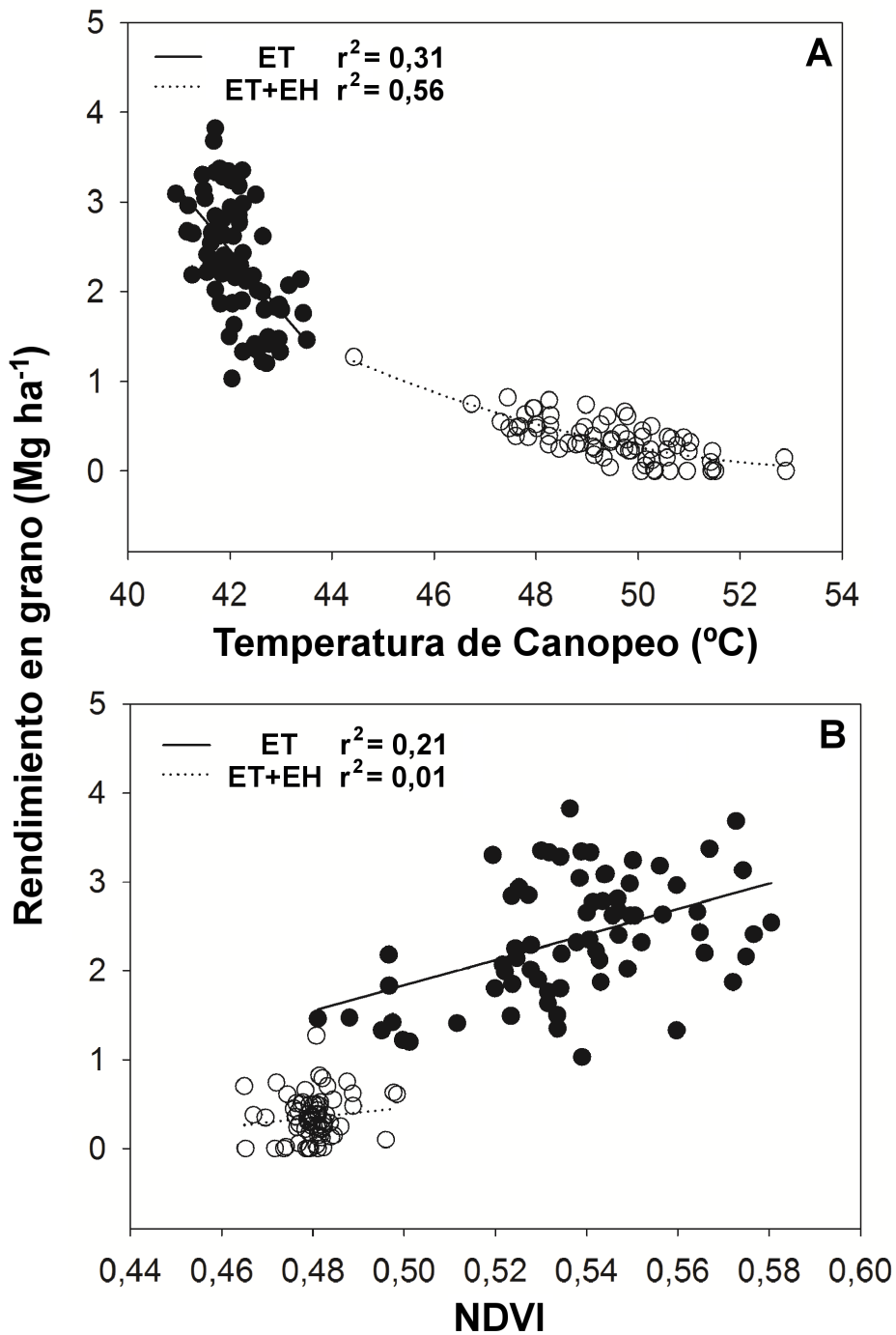


Figura 4.3: Relaciones entre el rendimiento en grano con la temperatura de canopeo (A) y el NDVI (B). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a los tratamientos de altas temperaturas sin limitantes hídricas (ET) y con restricciones hídricas en floración (ET+EH), respectivamente.

Tabla 4.2: Componentes de la variancia y la heredabilidad del rendimiento de grano (RG), la temperatura de canopeo (TC), el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI), los días a floración femenina (Días a R1) y el intervalo entre floración femenina y masculina (ASI). Los datos corresponden a ensayos de altas temperaturas bajo dos condiciones hídricas: sin limitantes hídricas (ET) y con restricciones hídricas en floración (ET+EH).

| | | RG | | TC | | NDVI | | Días a R1 | | ASI | |
|----|------------|-------|---------|------|---------|------|---------|-----------|---------|-------|---------|
| | | Est. | p-valor | Est. | p-valor | Est. | p-valor | Est. | p-valor | Est. | p-valor |
| ET | Bloque | 0,003 | 0,013 | 0,31 | 0,003 | 0 | 0,015 | 1,1 | 0,037 | 0,162 | 0,429 |
| | Genotipo | 0,024 | <0,001 | 0,04 | 0,187 | 0 | <0,001 | 3,62 | <0,001 | 0,727 | 0,064 |
| | Residual | 0,013 | | 0,17 | | 0 | | 2,13 | | 2,332 | |
| | H^2 | 79,0 | | 32,0 | | 78,5 | | 77,3 | | 38,4 | |
| | | RG | | TC | | NDVI | | Días a R1 | | ASI | |
| ET | Bloque | 0,005 | 0,037 | 1,18 | 0,002 | 0 | 0,025 | 10,1 | 0,019 | 2,823 | 0,204 |
| | + Genotipo | 0,019 | <0,001 | 0,29 | 0,015 | 0 | 0,101 | 11,9 | 0,004 | 4,451 | 0,194 |
| EH | Residual | 0,01 | | 0,39 | | 0 | | 17 | | 21,54 | |
| | H^2 | 79,8 | | 52,2 | | 36,0 | | 58,3 | | 29,2 | |

El análisis de componentes principales (ACP) permitió diferenciar los genotipos evaluados sobre la base de la temperatura de canopeo y el NDVI. En ambos tratamientos, la CP1 permitió distinguir genotipos con mayores valores de NDVI y altos rendimientos de aquellos con alta temperatura de canopeo, fechas de floración más tardías y extensos valores de ASI (Fig. 4.4). Así, en episodios de estrés por alta temperatura con diferentes regímenes hídricos (*i.e.*, ET y ET+EH), la temperatura de canopeo estuvo negativamente asociada con el rendimiento en grano y el NDVI.

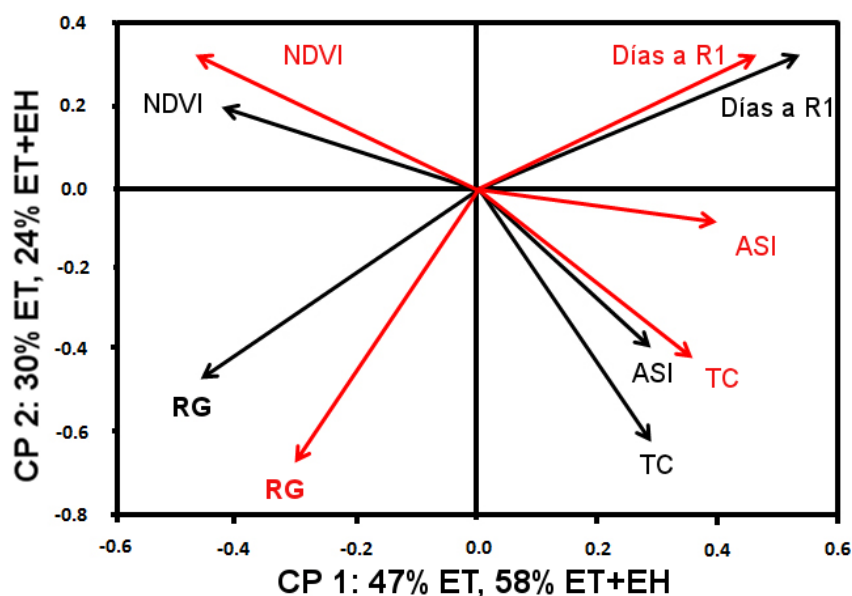


Figura 4.4: Bi-plots en función de variables estandarizadas mostrando las componentes principales (CP) 1 y 2. Las variables utilizadas fueron el rendimiento en grano (RG), la temperatura del canopeo (TC), el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI), la fecha de floración femenina (Días a R1) y el ASI. Los datos pertenecieron a 71 genotipos subtropicales en ensayos de altas temperaturas bajo dos condiciones hídricas: sin limitantes hídricas (flechas negras) y con restricciones hídricas en floración (flechas rojas). La longitud de las flechas indica las cargas para las distintas variables.

Las correlaciones genéticas variaron con el tratamiento y los rasgos medidos (Tabla 4.3). Bajo condiciones de estrés térmico sin limitantes hídricas, la correlación genética entre temperatura de canopeo y rendimiento en grano fue prácticamente inexistente. Esto pudo surgir a partir de que la variancia genética fue muy baja como resultado de una amplia disponibilidad hídrica en este tratamiento. Sin embargo, bajo estrés térmico y restricciones hídricas, la correlación genética entre temperatura de canopeo y rendimiento en grano fue baja y negativa ($r = -0,14$). Este comportamiento podría ser atribuible a que, en el tratamiento ET+EH, las temperaturas absolutas fueron más altas en relación con el tratamiento ET, lo que resulta en una mayor variación entre los genotipos y un rango de temperaturas de canopeo más amplio. Por otra parte, se detectó una correlación genética débil entre el NDVI y el rendimiento de grano en ambos tratamientos ($r = 0,37$ para ET y $r = 0,16$ para ET+EH).

Tabla 4.3: Correlaciones genéticas entre la temperatura de canopeo (TC), el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI), los días a floración femenina (Días a R1) y el intervalo entre floración femenina y masculina (ASI) con el rendimiento en grano (RG). Los datos corresponden a ensayos de altas temperaturas bajo dos condiciones hídricas: sin limitantes hídricas (ET) y con restricciones hídricas en floración (ET+EH).

| Rasgo | ET | ET+EH |
|------------------|-----------|--------------|
| TC | 0,023 | -0,142 |
| NDVI | 0,365 | 0,156 |
| Días a R1 | -0,899 | -0,835 |
| ASI | 0,041 | -0,225 |

El número de días a floración femenina (días a R1) presentó una fuerte correlación genética con el rendimiento en grano para ambos tratamientos, indicando la ventaja de los ciclos más cortos en episodios de estrés térmico bajo las dos condiciones hídricas evaluadas. Cabe aclarar que por más que el rendimiento en grano se corrigió por la fecha de floración masculina (*i.e.*, anátesis del cultivo), las correlaciones genéticas entre los días a R1 y rendimiento fueron mayores respecto de los demás rasgos medidos. La variancia genética para el intervalo entre floración masculina-femenina (ASI) no fue significativa para ninguno de los tratamientos evaluados (*i.e.*, ET y ET+EH).

Las potenciales ganancias genéticas presentaron un patrón similar al descripto para las correlaciones genéticas (Tabla 4.4). Así, mientras el NDVI presentó ganancias genéticas esperadas de $0,364 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$ de selección bajo ET y $0,11 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$ bajo ET+EH, la temperatura de canopeo mostró una ganancia genética esperada de $-0,115 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$ de selección en el tratamiento de estrés combinado (ET+EH).

Tabla 4.4: Ganancias genéticas esperadas entre las variables medidas en ensayos de altas temperaturas bajo dos condiciones hídricas: sin limitantes hídricas (ET) y con restricciones hídricas en floración (ET+EH). Los rasgos evaluados correspondieron al rendimiento de grano (RG), la temperatura de canopeo (TC), el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI), los días a floración femenina (Días a R1) y el intervalo entre floración femenina y masculina (ASI).

| | | RG | TC | NDVI | Días a R1 | ASI |
|---------|-----------|--------|--------|--------|-----------|--------|
| ET | RG | | 0,015 | 0,364 | -0,889 | 0,029 |
| | TC | 0,036 | | -0,930 | 0,033 | 0,492 |
| | NDVI | 0,366 | -0,379 | | -0,427 | -0,124 |
| | Días a R1 | -0,909 | 0,014 | -0,434 | | 0,286 |
| | ASI | 0,059 | 0,409 | -0,253 | 0,576 | |
| ET + EH | RG | | -0,115 | 0,105 | -0,714 | 0,136 |
| | TC | -0,175 | | -0,724 | 0,450 | 0,235 |
| | NDVI | 0,232 | -0,707 | | | -0,651 |
| | Días a R1 | -0,977 | 0,403 | -0,573 | -0,927 | 0,431 |
| | ASI | -0,372 | 0,419 | -0,802 | -0,860 | |

4.4.3. Índices de selección

El análisis de las curvas ROC por medio del área bajo la curva (ABC) permitió establecer la efectividad de los índices propuestos. Así, para todos los índices de selección, las ABC fueron más altas en el tratamiento de estrés térmico sin limitantes hídricas (ET) que aquel con restricciones hídricas alrededor de la floración (*i.e.*, ET+EH; Fig. 4.5). Por otra parte, los índices con mayor número de variables de entrada (*e.g.*, S1), generalmente presentaron mejores predicciones (ABC de 0,64 y 0,69 para ET y ET+EH, respectivamente) comparado con aquellos índices que contaron con unas pocas variables en su constitución. En este sentido, la selección realizada solamente por temperatura de canopeo presentó ABC similares a una selección al azar (*i.e.*, ABC = 0.5)

El índice de selección "S1" presentó las mayores ganancias genéticas esperadas para el rendimiento en grano, tanto para ET (+0,486 Mg ha⁻¹) como para ET+EH (+0.015 Mg ha⁻¹). Al igual que para S1, los índices S2 y S3 mostraron una mejora en la ganancia genética esperada bajo estrés térmico sin limitantes hídricas (S2: +0,322 Mg ha⁻¹; S3: +0,237 Mg ha⁻¹), pero esta mejora fue despreciable (S2: 0,002 Mg ha⁻¹) o incluso negativa (S3: -0,027 Mg ha⁻¹) cuando estos índices se utilizaron en el tratamiento de estrés térmico con restricciones hídricas en floración.

Independientemente del índice de selección utilizado, los genotipos que tuvieron un mejor desempeño bajo estrés por calor sin limitantes hídricas no siempre coincidieron con aquellos que presentaron un mayor rendimiento bajo la combinación de estrés térmico e hídrico. En efecto, de los 14 genotipos con mayores rendimiento en condiciones de estrés por calor con buena disponibilidad hídrica (20% del total de los genotipos), sólo tres genotipos [(CML321 / CML384 // CL106595); (CML384 / CML444 // CL106583) y (CML384 / CML444 // CL106655)] coincidieron con aquellos genotipos que lograron los mayores rendimientos bajo el tratamiento de estrés térmico con restricciones hídricas en floración.

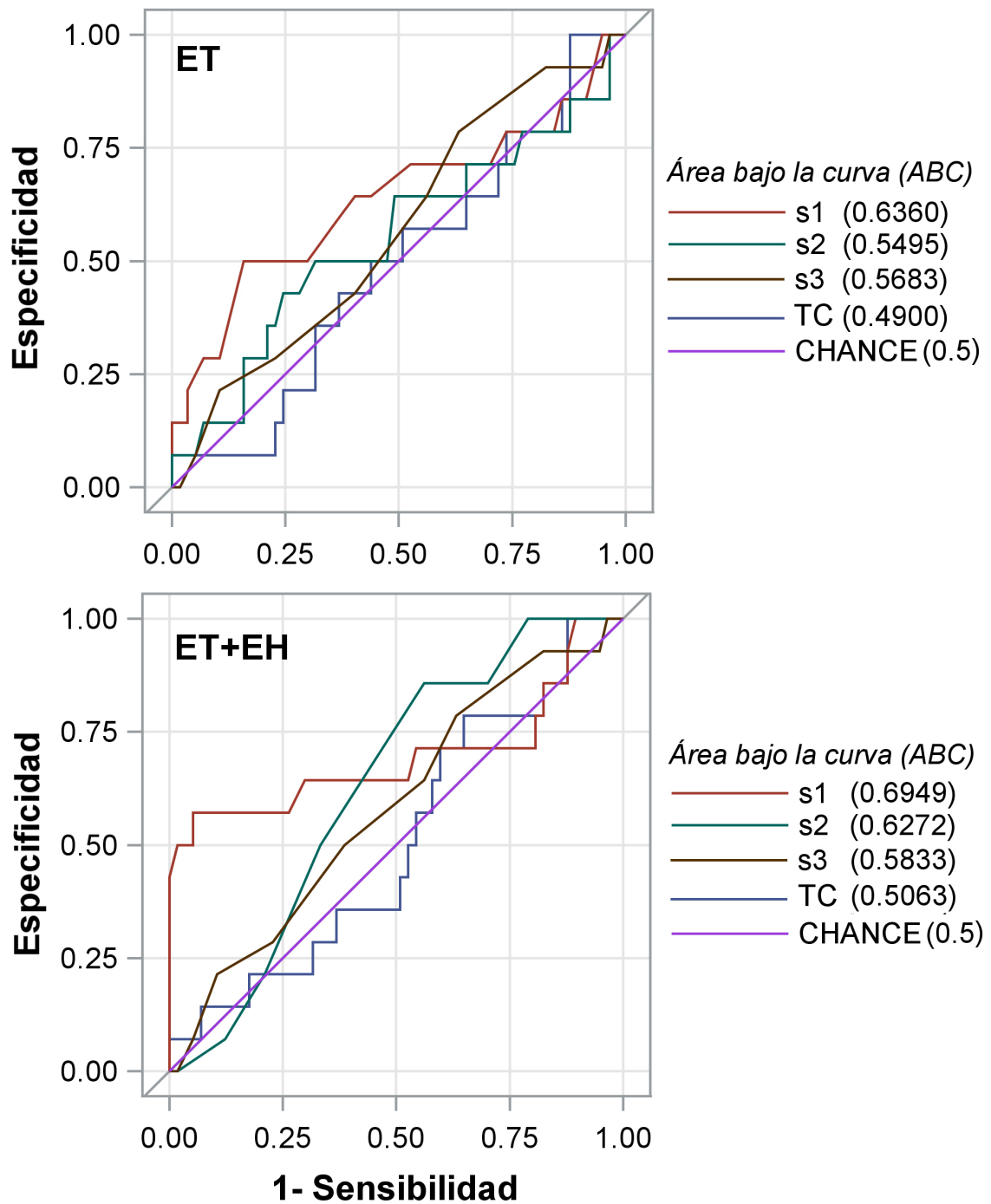


Figura 4.5: Curvas características operativas del receptor (Curvas ROC) obtenidas para tres índices de selección y temperatura del dosel (TC). El índice de selección s1 incluyó el rendimiento en grano, la temperatura del canopeo, NDVI, y el ASI; s2 incluyó la temperatura del canopeo, el NDVI y el ASI; s3 incluyó la temperatura del canopeo y el NDVI. La línea púrpura (CHANCE) muestra un área bajo la curva igual a 0,5 que caracteriza un indicador no discriminante, es decir, una selección aleatoria. Los datos corresponden a ensayos de altas temperaturas bajo dos condiciones hídricas: sin limitantes hídricas (ET) y con restricciones hídricas en floración (ET+EH).

4.5. Discusión

4.5.1. Ventajas del uso de vehículos aéreos en programas de mejoramiento por altas temperaturas

La utilización de una plataforma aérea para la obtención de imágenes representa un método novedoso para evaluar el germoplasma de maíz bajo condiciones de estrés térmico por alta temperatura. Esta técnica de alto rendimiento en fenotipado permite la evaluación de un gran número de parcelas en un corto periodo. Comparado con otras técnicas de medición terrestres, el uso de una plataforma aérea permite reducir el tiempo necesario para medir NDVI a través del sensor *Greenseeker*TM (Cairns *et al.*, 2012) u observaciones visuales (White *et al.*, 2012), pudiendo ser desde 30 segundos por parcela a la fracción de un segundo para evaluar un número considerable de parcelas con esta técnica.

El alto rendimiento en fenotipado es considerado crucial en las mediciones de temperatura de canopy, ya que la plataforma aérea permite (en pocos minutos) la obtención de todas las imágenes termales contenidas en experimentos que posean grandes superficies. Para esta técnica, las variaciones ambientales (*e.g.*, vientos, nubosidad, etc.) que podrían influir en el resultado de un conjunto de mediciones, pueden ser excluidas debido a la simultaneidad en la toma de la información.

4.5.2. Efectos del estrés térmico por altas temperaturas sobre el rendimiento en grano bajo condiciones hídricas óptimas vs. restricciones hídricas durante la floración

El rendimiento en grano fue reducido a 76,5% bajo estrés térmico y a 96,8% bajo la combinación de estrés térmico e hídrico para el mismo set de genotipos bajo condiciones normales de temperatura en los ensayos multi-ambientales de CIMMYT (datos no mostrados). Estos resultados están en concordancia con los propuestos por Lobell *et al.* (2011), los cuales mostraron que por cada grado-día acumulado por encima de 30°C el rendimiento final se reduce 1% en condiciones óptimas de cultivo y 1,7% bajo condiciones de estrés térmico e hídrico combinado. Como fue discutido en el Capítulo III, algunos estudios han reportado temperaturas óptimas para maíz entre 34 y 35°C (Cicchino *et al.*, 2010a; Rattalino Edreira *et al.*, 2011), mientras que las temperaturas medias registradas en este estudio alcanzaron los 45°C bajo estrés térmico sin limitantes hídricas y 54°C bajo la combinación de estrés térmico e hídrico en floración. Crafts-Brandner y Salvucci (2002), establecieron que plántulas de maíz creciendo sin limitantes hídricas tuvieron una reducción del 50% en su tasa fotosintética, lo que explicaría las fuertes disminuciones en el rendimiento en grano observadas en los genotipos evaluados. Las reducciones en las tasas fotosintéticas durante el periodo crítico del cultivo de maíz de tres genotipos contrastantes también fueron presentadas y discutidas en los Capítulos II y III.

Si bien los experimentos conducidos en condiciones semi-controladas descriptos en los Capítulos II y III alcanzaron temperaturas semejantes a las obtenidas en este experimento, existieron diferencias en aspectos metodológicos que deben ser consideradas. Las principales diferencias entre los experimentos del Capítulo II y III y el

experimento del presente Capítulo son: (i) ensayos calentados artificialmente vs. ensayos sin calentamiento artificial, (ii) la incorporación de polen fresco de parcelas no calentadas artificialmente vs. posibles disminuciones en viabilidad de polen, (iii) el escalonamiento de la fechas de siembra con el fin de hacer coincidir el periodo crítico en los tres genotipos utilizados vs. 71 genotipos con ciclos distintos sembrados en una única fecha de siembra y (iv) genotipos de grupos contrastantes vs. genotipos pertenecientes a un mismo grupo de germoplasma (*i.e.*, subtropical). Cabe destacar que las diferencias significativas encontradas en la temperatura de canopeo a través de las imágenes aéreas en el presente capítulo, se asociaron con el rendimiento. En contraparte, la temperatura de la hoja de la espiga no fue significativamente distinta en los tres genotipos calentados como se detalló en los capítulos anteriores.

4.5.3. El índice diferencial de vegetación normalizado (NDVI) y la temperatura de canopeo permiten identificar genotipos tolerantes

El NDVI explicó las diferencias fenotípicas y genotípicas en rendimiento en grano entre (*i.e.*, altas temperaturas bajo diferentes condiciones hídricas) y dentro de los tratamientos (*i.e.*, 71 genotipos sub-tropicales). La temperatura de canopeo explicó las diferencias en rendimiento entre ambos tratamientos y las diferencia genotípicas en el tratamiento de estrés térmico con restricciones hídricas en floración (ET+EH), así como lo indicaron las correlaciones genéticas y las ganancias genéticas esperadas.

En general, las correlaciones fenotípicas y genéticas para la mayoría de los rasgos evaluados mostraron una tendencia similar. Sin embargo, en algunos casos, la baja variancia genética condujo a correlaciones genéticas no significativas. Por ejemplo, en el tratamiento de estrés térmico sin limitantes hídricas, la amplia disponibilidad de agua en el perfil permitió una normal refrigeración del canopeo a través de la transpiración, presentando todos los genotipos temperaturas de canopeo similares como resultado de esta condición. En el tratamiento de estrés térmico con restricciones hídricas en floración, los resultados de la correlaciones genéticas negativas entre la temperatura de canopeo y el rendimiento en grano, indican que los genotipos que mantienen un canopeo con menor temperatura rindieron más que sus contrapartes. Es bien conocido que la transpiración es la responsable de regular la temperatura de las hojas dentro de límites fisiológicos (Gates, 1968), permitiendo el intercambio gaseoso y la fotosíntesis del canopeo. Con los resultados obtenidos en los Capítulos II y III, se podría especular que los genotipos con menor temperatura de canopeo pudieron sostener sus tasas fotosintéticas, permitiendo mantener las tasas de crecimiento por encima de los umbrales de esterilidad reproductiva.

La temperatura de canopeo ha sido utilizada para identificar germoplasma tolerante a la sequía en maíz (Romano *et al.*, 2011; Zia *et al.*, 2012), como así también a las altas temperaturas en trigo (Cossani y Reynolds, 2012). En este sentido, las correlaciones genéticas medidas en ambos tratamientos entre temperatura de canopeo y rendimiento en grano son de especial interés, debido a que la mayoría de las investigaciones sobre tolerancia de estrés abiótico se enfocaron en estreses térmicos o hídricos (Tester y Bacic, 2005). El método que aquí se presenta, por lo tanto, podría

permitir la identificación de germoplasma tolerante a las altas temperaturas tanto en condiciones de regadío o secano en condiciones de cultivo de maíz a campo.

Las mediciones de NDVI a menudo se relacionan con la salud y el vigor del cultivo, pudiendo ser consideradas como un indicador de la actividad de la fuente fotosintética. La correlación positiva obtenida entre NDVI y el rendimiento en grano ($r = 0,365$) estaría identificando genotipos más tolerantes que sostengan una suficiente producción de asimilados en el periodo crítico para la determinación del rendimiento. En este sentido, dicha correlación genética más baja (no significativa) en el tratamiento de estrés térmico con restricciones hídricas, es un indicativo de la disyuntiva que presenta una alta biomasa: que proporcione asimilados y al mismo tiempo aumente la pérdida de agua por transpiración en condiciones de limitaciones hídricas. De esta manera, los efectos beneficiosos de altos valores de NDVI podrían haber sido enmascarados por la acción del tratamiento de calor y la sequía combinada, lo que resulta en la menor correlación genética en relación al tratamiento de estrés por calor sin limitantes hídricas. Las correlaciones positivas medidas entre el NDVI y el rendimiento de grano están en concordancia con estudios llevados a cabo por Cairns *et al.* (2012) utilizando genotipos de maíz tropical.

Sorpresivamente, las correlaciones del intervalo entre floración masculina y femenina (ASI) y el rendimiento no fueron significativas (ET) o dichas correlaciones fueron muy bajas (ET+EH). Dado que el ASI se ha utilizado tradicionalmente en programas de mejora del CIMMYT para identificar germoplasma tolerante a la sequía (Edmeades *et al.*, 2000), pareciera lógico que la variación genética para este rasgo se haya reducido en el germoplasma de élite como ha sido postulado por Monneveux *et al.* (2008). Este hallazgo refuerza aún más la necesidad de utilizar rasgos adicionales o nuevos rasgos secundarios, que permitan identificar germoplasma tolerante a las altas temperaturas en el proceso de selección.

4.5.4. La temperatura de Canopeo y el NDVI pueden ser utilizados en programas de mejoramiento

El análisis de componentes principales (ACP) fue utilizado para identificar las combinaciones de las características fisiológicas asociadas con la variación genotípica del rendimiento en grano en condiciones de estrés térmico bajo dos regímenes hídricos. El ACP permitió la distinción entre genotipos con una floración más tardía, amplios desfases entre floraciones (ASI) y elevadas temperaturas de canopeo en ambos tratamientos. La correlación entre NDVI y la temperatura de canopeo con el rendimiento en grano y la alta heredabilidad de ambos rasgos resultaron en ganancias genéticas potencialmente aceptables.

Con el fin de evaluar la utilidad para el mejoramiento de las diferentes combinaciones entre los rasgos medidos, varios índices fueron propuestos: S1; incluyó el rendimiento en grano, el ASI, el NDVI y la temperatura de canopeo, S2; incluyó el ASI, el NDVI y la temperatura de canopeo, mientras que S3 solamente incluyó el NDVI y la temperatura de canopeo. La metodología provista por las curvas ROC fue utilizada para comparar los diferentes índices propuestos. El NDVI y la temperatura de canopeo (S2)

presentaron valores de área bajo la curva (ABC) por encima de 0,5 (valor que significa una selección al azar), indicando la utilidad de ambos rasgos combinados para la selección genotípica.

Los valores de ABC generalmente fueron mayores con el incremento del número de rasgos en cada índice. En este sentido, los máximos valores de ABC fueron para el índice S1, siendo de 0,636 en el tratamiento de estrés térmico sin limitantes hídricas y de 0,695 en el tratamiento de estrés térmico e hídrico combinado. Por lo tanto, para ambas condiciones hídricas dichos valores podrían conducir a una selección confiable usando S1 en ambientes con episodios de estrés térmico por alta temperatura. Como resultado, en condiciones de estrés térmico, las ganancias genéticas podrían ser incrementadas con la utilización de índices de selección cuando se compara con una selección únicamente por rendimiento en grano. En otras palabras, las mayores ganancias genéticas esperadas fueron remitidas al índice S1 bajo el tratamiento de estrés térmico sin limitantes hídricas, pudiendo incrementar el rendimiento en grano hasta $0,486 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$. Por otra parte, en el tratamiento de estrés térmico con restricciones hídricas, las potenciales ganancias genéticas fueron obtenidas por una selección negativa de la temperatura de canopeo ($0,115 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$, valores absolutos), mientras que utilizando el índice S1 dichas ganancias esperadas fueron despreciables ($0,015 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$).

A partir de los resultados obtenidos, se podría remarcar que la utilización de índices tales como S1, permitiría una mayor presión de selección en diferentes de condiciones ambientales. En este sentido, una mayor presión de selección en una fase temprana y sobre la base de los datos adquiridos en uno o dos centros de fenotipado, permitiría el descarte de germoplasma no deseado y la reducción del número de entradas que se evaluará en etapas posteriores en ensayos multi-ambientales. Este último aspecto abordado no es un tema menor, dado que la evaluación de una parcela cuesta ~US\$ 25 (S. Trachsel, comunicación personal). Por lo tanto, la utilización de índices de selección reduciría el número de entradas a evaluar, conduciendo a una significativa reducción en los costos de un programa de mejoramiento.

Otro aspecto a destacar radica en que, de los 14 genotipos con mejor desempeño en cada de tratamiento, sólo tres genotipos fueron captados por S1 bajo ambas condiciones de riego. Estos genotipos y sus parentales pueden ser de potencial interés para los mejoradores (CML321/CML384//CL106595, CML384/CML444//CL106583 y CML384/CML444//CL106655). Este patrón se ha observado anteriormente y ha sido explicado por las diferencias en la base genética de los mecanismos que confieren la tolerancia al estrés térmico o la combinación de estrés térmico e hídrico (Rizhsky *et al.*, 2002, 2004; Barnabás *et al.*, 2008; Cairns *et al.*, 2013).

4.6. Conclusiones

El uso de una plataforma aérea para la obtención de imágenes constituye un método novedoso para evaluar el germoplasma de maíz bajo condiciones de estrés térmico por alta temperatura en dos condiciones hídricas. Así como lo indicaron las correlaciones genéticas, el NDVI explicó las diferencias en rendimiento en grano entre y dentro de los tratamientos evaluados, mientras que la temperatura de canopeo explicó dichas diferencias entre ambos tratamientos y la diferencia genotípica dentro del tratamiento de estrés térmico con restricciones hídricas en floración.

El NDVI y la temperatura de canopeo presentaron un uso potencial pero a su vez limitado para su utilización en mejoramiento: ambos rasgos son mediciones indirectas y, en los dos tratamientos analizados, las condiciones ambientales durante la floración alcanzaron temperaturas muy por encima de la óptima para maíz. Sin embargo, el uso de estos dos rasgos en el índice de selección "S1" (el cual incluye rendimiento en grano, ASI, NDVI y temperatura de canopeo) demostró una mejora promisoría de la selección, alcanzando una ganancia genética esperada de 0,486 Mg ha⁻¹ y 0,015 Mg ha⁻¹ en condiciones de estrés térmico sin limitantes y con restricciones hídricas, respectivamente. Por lo tanto, la selección utilizando el índice S1 permitirá una mayor eficiencia de selección por tolerancia a altas temperaturas, pudiendo ser dicha eficiencia incrementada por la identificación temprana de germoplasma no deseado, conduciendo a la reducción de costos en los programas de mejoramiento.

CAPÍTULO V: CONSIDERACIONES FINALES

5.1. Introducción

En este capítulo se pretende brindar una visión integral de los principales hallazgos de este trabajo de tesis. La estructura organizativa de los capítulos anteriormente presentados pretendió ascender en diferentes escalas o niveles de organización, con el objetivo de abordar la problemática de las altas temperaturas en diferentes aspectos considerados claves luego de una profunda revisión bibliográfica. Si bien en cada capítulo se ha discutido la contribución específica que dentro de cada disciplina permitiría futuros progresos, un abordaje integral centrado en la aplicación de dichos conocimientos parece necesario.

5.2. Principales aportes

5.2.1. Fisiología del estrés térmico en condiciones de campo

La primera hipótesis planteada fue: "*Las disminuciones en fotosíntesis de hoja ante episodios de estrés térmico están asociadas con reducciones en la fluorescencia de la clorofila y el daño de las membranas celulares debido al efecto de las altas temperaturas*".

Este trabajo permitió caracterizar el estrés térmico generado en condiciones de campo mediante variables relacionadas con el intercambio gaseoso, la fluorescencia de clorofila y la estabilidad de las membranas celulares. Tanto en pre- como en posfloración, la fotosíntesis de hoja disminuyó en los tratamientos con altas temperaturas. Las mayores diferencias entre los genotipos evaluados se presentaron a la mitad del calentamiento diario (*i.e.*, medio día). Las máximas caídas en la fotosíntesis de hoja ocurrieron minutos antes de liberado el estrés. Otras variables vinculadas con el intercambio gaseoso (*e.g.*, la conductancia estomática y la transpiración) fueron modificadas por los tratamientos térmicos pero no mostraron diferencias entre los tres genotipos evaluados.

La fluorescencia de clorofila demostró estar fuertemente asociada con las variaciones en la fotosíntesis de hoja, indicando la importancia que tiene el fotosistema II frente a episodios de estrés por altas temperaturas. En este sentido, las disminuciones durante el calentamiento en la eficiencia fotosintética (expresada como F_v/F_m) presentaron una tendencia similar a aquellas disminuciones producidas por las altas temperaturas en la fotosíntesis de hoja. La eficiencia fotosintética presentó correlaciones intermedias a altas con la fotosíntesis de hoja dependiendo del genotipo analizado y mostró ser una de las causas de las disminuciones en las tasas fotosintéticas debido a las altas temperaturas.

La recuperación pos-estrés una vez finalizado el calentamiento diario fue uno de los aportes más novedosos de este trabajo. En efecto, tanto la fotosíntesis de hoja como la eficiencia fotosintética alcanzaron valores cercanos al 80% del control en los primeros 30 minutos de liberado el estrés. Además, se presentaron marcadas diferencias genotípicas durante la recuperación pos-estrés a los 14 días de tratamiento en posfloración.

Por último, el daño celular relativo en las membranas (DCR) demostró estar fuertemente asociado con la fotosíntesis de hoja y la eficiencia fotosintética (F_v/F_m). En general, las mediciones al final del tratamiento térmico (*i.e.*, 14 días) condujeron a las

mayores pérdidas en la estabilidad de la membranas. Los mayores daños en las membranas fueron identificados para el genotipo Tx, que también presentó la mayor susceptibilidad en fotosíntesis y eficiencia fotosintética. Los hallazgos obtenidos en el Capítulo II permiten aceptar la hipótesis planteada originalmente.

5.2.2. La fotosíntesis de hoja y su relación con el crecimiento y el rendimiento de maíz bajo episodios de estrés térmico por altas temperaturas.

La segunda hipótesis planteada fue: *"Los genotipos más tolerantes al estrés térmico durante el periodo crítico mantienen mayor tasa de crecimiento del cultivo y menor reducción en el número de granos como resultado de una menor declinación en la fotosíntesis de hoja y una mayor dinámica en la recuperación pos-estrés"*

Los resultados presentados en el Capítulo III proporcionaron un enfoque novedoso acerca de cómo vincular la fotosíntesis de hoja con variables situadas en otros niveles de organización, tales como las tasas de crecimiento del cultivo y el rendimiento en grano. La relación encontrada entre la fotosíntesis de hoja y las tasas de crecimiento revelan la validez de la fotosíntesis a *nivel de hoja* en la asimilación de carbono por parte del cultivo frente a episodios de estrés térmico por alta temperatura. Así, frente al estrés térmico, los genotipos más tolerantes en términos de fotosíntesis de hoja fueron también los más tolerantes a *nivel de cultivo* (expresado en tasas de crecimiento).

Por otra parte, el genotipo reconocido como más sensible a las altas temperaturas (Tx), presentado en los Capítulos II (*nivel de hoja*) y III (*nivel de hoja y cultivo*), mostró una menor recuperación pos-estrés de la fotosíntesis de hoja con respecto a sus contrapartes. La mayor tolerancia de los genotipos Te y Tr respecto de Tx debería ser usada con cautela. En efecto, si bien el uso de tres genotipos fue de gran utilidad para la caracterización del estrés a nivel fisiológico, la representación de un solo genotipo por cada grupo de germoplasma puede ser cuestionable para realizar amplias inferencias a nivel genético. Inclusive, es bien conocida la amplia variabilidad genotípica dentro de cada grupo de germoplasma, presentándose diferente desempeño en un mismo set de genotipos de un determinado grupo (*i.e.*, templado o tropical).

Otra contribución novedosa del presente trabajo fueron las correlaciones significativas obtenidas entre la fotosíntesis de hoja y el número de granos a madurez fisiológica, una variable fuertemente asociada al rendimiento en grano. Este análisis permitió establecer que, bajo episodios de estrés térmico por altas temperaturas, una parte importante de la fijación del número de granos está asociada con el sostenimiento de las tasas fotosintéticas medidas durante el periodo crítico para la determinación del rendimiento del cultivo. Es así que, en función de los resultados obtenidos en los Capítulos II y III, la hipótesis puesta en discusión es aceptada en su totalidad.

5.2.3. La temperatura de canopeo y el NDVI como herramientas en los programas de mejoramiento por altas temperaturas.

La tercer hipótesis planteada fue: *"La temperatura de canopeo y el NDVI permiten seleccionar genotipos de maíz tolerantes a estrés por altas temperaturas"*

Las variables fisiológicas tales como la fotosíntesis de hoja, la eficiencia fotosintética y la estabilidad de las membranas celulares, demostraron ser procesos relacionados con la tolerancia a las altas temperaturas en tres genotipos de genética contrastante y estar asociadas con variables que operan a *nivel de cultivo* (Capítulos II y III). Sin embargo, cuando se pretende evaluar una cantidad de genotipos propia de un programa de mejoramiento genético, las variables mencionadas se encuentran limitadas en cuanto a la posibilidad de un rápido fenotipado y su contribución práctica al programa podría ser cuestionada.

A partir de las restricciones anteriormente planteadas, el experimento presentado en el Capítulo IV abordó 71 genotipos subtropicales de un programa de mejoramiento por altas temperaturas con el objetivo de evaluar nuevas herramientas de fenotipado. De esta manera, la utilización de imágenes aéreas tuvo como objetivo escalar un peldaño más en este trabajo de tesis: evaluar la temperatura de canopy (TC) y el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI) como variables de selección en un programa de mejoramiento por alta temperatura. En este sentido, el empleo de imágenes aéreas que brinden información simultánea sobre la TC y el NDVI, demostraron ser un método viable para poder evaluar una gran cantidad de genotipos en un lapso de tiempo muy breve.

Las dos condiciones hídricas evaluadas (*i.e.*, sin limitantes y con restricciones hídricas en floración) en escenarios de estrés térmico por alta temperatura condujeron a un comportamiento diferencial de la TC y NDVI. Mientras la temperatura de canopy estableció diferencias entre genotipos bajo restricción hídrica en floración (con aceptable heredabilidad), el NDVI lo hizo en condiciones de altas temperatura sin restricciones hídricas (con alta heredabilidad).

La inclusión de los índices de selección constituyó un progreso en términos de agrupar variables para la mejora del proceso selección por tolerancia a las altas temperaturas. Así, bajo condiciones extremas de altas temperaturas y los 71 genotipos ensayados, la temperatura de canopy asemejó una selección al azar cuando fue utilizada como única entrada. Sin embargo, la combinación de la temperatura de canopy (TC) y el NDVI mostraron una efectividad del índice por encima de lo establecido por una selección al azar. Por último, cuando un mayor número de variables fueron agrupadas para el cálculo del índice (*i.e.*, TC, NDVI, ASI y rendimiento en grano), este demostró mejorar el proceso de selección en ambas condiciones experimentales, alcanzando una ganancia genética adicional de 0,486 Mg ha⁻¹ y 0,015 Mg ha⁻¹ en estrés térmico sin limitantes y con restricciones hídricas, respectivamente.

Los resultados obtenidos en esta sección permiten aceptar parcialmente la hipótesis planteada. Para las condiciones y genotipos ensayados, la temperatura de canopy y el NDVI por sí solos no fueron lo suficientemente robustos para asegurar una mejora sustantiva en el proceso de selección. Sin embargo, cuando ambos se combinaron con otros rasgos medidos, fue posible avanzar en la identificación de genotipos tolerantes en un programa de mejoramiento por alta temperatura bajo dos condiciones hídricas alrededor de floración.

5.2.4. Breve síntesis de la sección

La fotosíntesis de hoja, la eficiencia fotosintética y la estabilidad de membranas fueron afectadas por las altas temperaturas y se identificaron diferencias en la tolerancia al calor en tres genotipos de genética contrastante. Las máximas reducciones en fotosíntesis de hoja se presentaron minutos antes de liberado el estrés, obteniéndose recuperaciones pos-estrés excepcionalmente rápidas comparadas con otras investigaciones. La fotosíntesis de hoja medida durante el periodo crítico del cultivo estuvo asociada con las tasas de crecimiento en dicho periodo. Además, los genotipos que presentaron menores disminuciones en fotosíntesis de hoja fueron los que tuvieron mayor fijación de granos. De esta manera, las reducciones en la fotosíntesis de hoja como resultado de las altas temperaturas estuvieron directamente relacionadas con las variaciones en la tasa de crecimiento del cultivo, el número de granos y el rendimiento. Cuando se pretende evaluar una gran cantidad de genotipos, la temperatura de canopeo y el NDVI (obtenidas por imágenes aéreas) demostraron ser útiles en el proceso de selección por tolerancia a estrés térmico por altas temperaturas. Los genotipos con canopeos más frescos y menos afectados en su índice de verdor (*i.e.*, NDVI) tuvieron las menores mermas en rendimiento en grano. La utilización de índices de selección en ensayos con altas temperaturas bajo dos condiciones hídricas puede significar una potencial mejora en el proceso de selección.

5.3. Posibles líneas de investigación basadas en este trabajo de tesis

5.3.1. Duración del estrés por altas temperaturas y su impacto sobre el rendimiento en grano en maíz.

La mayor parte de las investigaciones a campo referidas con estrés por altas temperaturas han establecido los momentos y los umbrales térmicos en los que el estrés produce mermas en el rendimiento de maíz. Este trabajo de tesis confirmó, con un mayor grado de minuciosidad respecto de otras investigaciones a campo, al periodo de posfloración como el más crítico frente a episodios caracterizados por la ocurrencia de temperaturas supra-óptimas. Sin embargo, la cantidad de días con temperaturas supra-óptimas por encima de la cual se presentan reducciones en el rendimiento no ha sido abordado en este trabajo de tesis y es actualmente uno de los aspectos menos estudiados. Esto indica la necesidad de profundizar las investigaciones en base a la duración del estrés térmico. Adicionalmente, aspectos tales como la intensidad del estrés deberían ser considerados. Los resultados obtenidos en investigaciones futuras sobre esta cuestión, podrían ser incorporados en modelos de simulación, con el fin de brindar una mayor solidez a la hora de realizar predicciones globales de mermas en el rendimiento al producirse episodios con temperaturas supra-óptimas.

5.3.2. Altas temperaturas diurnas y nocturnas.

El presente trabajo se basó en la respuesta fisiológica de genotipos de maíz frente a episodios de estrés térmico durante el día. Si bien es cierto que la probabilidad de que se produzcan picos de altas temperaturas es mayor cerca del medio día, poco se conoce sobre el incremento en las temperaturas nocturnas y las consecuencias que éstas pueden producir sobre el rendimiento en grano de maíz en zonas subtropicales. En general, los

escenarios de cambio climático establecen aumentos en las temperaturas medias diarias. Es así que la reducción en rendimiento por altas temperaturas nocturnas estará dada principalmente por la amplitud térmica y las características climáticas de cada región. Probablemente, la respiración de mantenimiento jugará un rol fundamental en el balance de carbono y las consecuentes variaciones en el rendimiento. Las posibles investigaciones futuras que permitan comparar los daños producidos por altas temperaturas tanto diurnas como nocturnas, podrían ser de utilidad a la hora de brindar una visión más integral del impacto de las altas temperaturas en el cultivo de maíz.

5.4 Consideraciones finales

El incremento de las temperaturas a nivel mundial ha demostrado ser un fenómeno cada vez más preocupante. Numerosos trabajos enfatizan que la frecuencia con temperaturas supra-óptimas aumentará, siendo la intensidad y la duración del estrés los que determinen las mermas en el rendimiento en grano. Sin embargo, el presente trabajo junto con investigaciones previas, demostraron que el cultivo de maíz presenta diferencias genotípicas promisorias para abordar la problemática del estrés térmico por altas temperaturas.

Comparado con otro tipo de estrés, la reducción y/o supresión del estrés térmico en cultivos extensivos es particularmente limitada. En este sentido, las prácticas de manejo de cultivo, que frente a otros estreses son diversas (*i.e.*, riego, fertilización, control químico), ante episodios con temperaturas supra-óptimas quedan generalmente circunscriptas a estrategias de escape (modificaciones en la fecha de siembra y la longitud de ciclo). Estas restricciones particulares resaltan la importancia de identificar genotipos más tolerantes al estrés térmico.

Gran parte de los esfuerzos de este trabajo se han enfocado hacia la identificación de los mecanismos y procesos vinculados con la tolerancia del cultivo de maíz a estrés por altas temperaturas. En este sentido, algunos rasgos fisiológicos ayudaron a caracterizar el estrés en condiciones de campo y demostraron ser promisorios para identificar diferencias genotípicas. No obstante, incorporar rasgos fisiológicos asociados con la tolerancia a estrés en un programa de mejoramiento requiere la interacción entre fisiólogos, genetistas, biólogos moleculares y mejoradores. Seguramente, el trabajo interdisciplinario ayudará a identificar rasgos fisiológicos capaces de ser caracterizados en forma rápida y confiable (fenotipado de alto caudal), resultando en la evaluación de una gran cantidad de genotipos y brindando herramientas adicionales para el proceso de selección.

REFERENCIAS

- Andrade, F.H., Vega, C., Uhart, S., Cirilo, A., Cantarero, M., Valentinuz, O., 1999. Kernel number determination in maize. *Crop Sci.* 39, 453–459. doi:10.2135/cropsci1999.0011183X0039000200026x
- Andrade, F.H., Echarte, L., Rizzalli, R., Della Maggiora, A., Casanovas, M., 2002. Kernel number prediction in maize under nitrogen or water stress. *Crop Sci.* 42, 1173–1179. doi:10.2135/cropsci2002.1173
- Alvarado, G., J. Cerón, J. Crossa, J. Burgueño, 2015. SI-SAS, A SAS code to calculate several selection indexes. <http://hdl.handle.net/11529/10242> -International Maize and Wheat Improvement Center.
- Araus, J.L., Brown, H.R., Febrero, A., Bort, J., Serret, M.D., 1993. Ear photosynthesis, carbon isotope discrimination and the contribution of respiratory CO₂ to differences in grain mass in durum wheat. *Plant Cell Environ.* 16, 383–392. doi:10.1111/j.1365-3040.1993.tb00884.x
- Araus, J.L., Sánchez, C., Cabrera-Bosquet, L., 2010. Is heterosis in maize mediated through better water use? *New Phytol.* 187, 392–406. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03276.x
- Badaruddin, M., Reynolds, M.P., Ageeb, O.A.A., 1999. Wheat Management in Warm Environments. *Agron. J.* 91, 975–983. doi:10.2134/agronj1999.916975x
- Barnabás, B., Jäger, K., Fehér, A., 2008. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ.* 31, 11–38. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01727.x
- Bassetti, P., Westgate, M.E., 1993a. Senescence and receptivity of maize silks. *Crop Sci.* 33, 275–278. doi:10.2135/cropsci1993.0011183X003300020012x
- Bassetti, P., Westgate, M.E., 1993b. Emergence, elongation, and senescence of maize silks. *Crop Sci.* 33, 271–275. doi:10.2135/cropsci1993.0011183X003300020011x
- Berry, J., Bjorkman, O., 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31, 491–543. doi:10.1146/annurev.pp.31.060180.002423
- Boegh, E., Soegaard, H., Broge, N., Hasager, C.B., Jensen, N.O., Schelde, K., Thomsen, A., 2002. Airborne multispectral data for quantifying leaf area index, nitrogen concentration, and photosynthetic efficiency in agriculture. *Remote Sens. Environ.* 81, 179–193. doi:10.1016/S0034-4257(01)00342-X
- Bukhov, N.G., Sabat, S.C., Mohanty, P., 1990. Analysis of chlorophyll a fluorescence changes in weak light in heat treated *Amaranthus* chloroplasts. *Photosynth. Res.* 23, 81–87. doi:10.1007/BF00030066
- Bunce, J.A., 2005. What is the usual internal carbon dioxide concentration in C₄ species under midday field conditions? *Photosynthetica* 43, 603–608. doi:10.1007/s11099-005-0094-y
- Cairns, J.E., Crossa, J., Zaidi, P.H., Grudloyma, P., Sanchez, C., Araus, J.L., Thaitad, S., Makumbi, D., Magorokosho, C., Bänziger, M., Menkir, A., Hearne, S., Atlin, G.N., 2013. Identification of drought, heat, and combined drought and heat tolerant donors in maize. *Crop Sci.* 53, 1335–1346. doi:10.2135/cropsci2012.09.0545

- Cairns, J.E., Sanchez, C., Vargas, M., Ordoñez, R., Araus, J.L., 2012. Dissecting maize productivity: Ideotypes associated with grain yield under drought stress and well-watered conditions. *J. Integr. Plant Biol.* 54, 1007–1020. doi:10.1111/j.1744-7909.2012.01156.x
- Camejo, D., Rodríguez, P., Angeles Morales, M., Miguel Dell'Amico, J., Torrecillas, A., Alarcón, J.J., 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *J. Plant Physiol.* 162, 281–289. doi:10.1016/j.jplph.2004.07.014
- Chen, J., Xu, W., Burke, J.J., Xin, Z., 2010. Role of phosphatidic acid in high temperature tolerance in maize. *Crop Sci.* 50, 2506–2515. doi:10.2135/cropsci2009.12.0716
- Chen, J., Xu, W., Velten, J., Xin, Z., Stout, J., 2012. Characterization of maize inbred lines for drought and heat tolerance. *J. Soil Water Conserv.* 67, 354–364. doi:10.2489/jswc.67.5.354
- Chiara, C., Panigada, C., Rossini, M., Meroni, M., Busetto, L., Amaducci, S., Boschetti, M., Picchi, V., Colombo, R., 2014. Nitrogen status assessment for variable rate fertilization in maize through hyperspectral imagery. *Remote Sens.* 6, 6549–6565. doi:10.3390/rs6076549
- Cicchino, M., Edreira, J.I.R., Otegui, M.E., 2010a. Heat stress during late vegetative growth of maize: Effects on phenology and assessment of optimum temperature. *Crop Sci.* 50, 1431–1437. doi:10.2135/cropsci2009.07.0400
- Cicchino, M., Edreira, J.I.R., Uribelarrea, M., Otegui, M.E., 2010b. Heat stress in field-grown maize: Response of physiological determinants of grain yield. *Crop Sci.* 50, 1438–1448. doi:10.2135/cropsci2009.10.0574
- Cooper, M., Hammer, G.L., International, C.A.B., Institute, I.R.R., Tropics, I.C.R.I. for the S., 1996. *Plant Adaptation and Crop Improvement*. IRRI.
- Coskun, Y., Coskun, A., Demirel, U., Özden, M., 2011. Physiological response of maize (*Zea mays* L.) to high temperature stress. *Aust. J. Crop Sci.* 5, 966–972.
- Cossani, C.M., Reynolds, M.P., 2012. Physiological traits for improving heat tolerance in wheat. *Plant Physiol.* 160, 1710–1718. doi:10.1104/pp.112.207753
- Crafts-Brandner, S.J., Salvucci, M.E., 2002. Sensitivity of photosynthesis in a C₄ plant, maize, to heat stress. *Plant Physiol.* 129, 1773–1780. doi:10.1104/pp.002170
- Crafts-Brandner, S.J., Salvucci, M.E., 2004. Analyzing the impact of high temperature and CO₂ on net photosynthesis: biochemical mechanisms, models and genomics. *Field Crops Res., Linking Functional Genomics with Physiology for Global Change Research* 90, 75–85. doi:10.1016/j.fcr.2004.07.006
- Crosbie, T.M., 1982. Changes in physiological traits associated with long-term breeding efforts to improve grain yield of maize. In: Loden, H.D., Wilkinson, D. (Eds.), *Proceedings of the 37th Corn and Sorghum Research Conference*. Am. Seed Trade Assoc., Washington DC, pp. 206–233.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. *InfoStat* versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

- Djanaguiraman, M., Prasad, P.V.V., Seppanen, M., 2010. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 999–1007. doi:10.1016/j.plaphy.2010.09.009
- Djanaguiraman, M., Prasad, P.V.V., Al-Khatib, K., 2011. Ethylene perception inhibitor 1-MCP decreases oxidative damage of leaves through enhanced antioxidant defense mechanisms in soybean plants grown under high temperature stress. *Environ. Exp. Bot.* 71, 215–223. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.12.006
- Djanaguiraman, M., Vara Prasad, P.V., Murugan, M., Perumal, R., Reddy, U.K., 2014. Physiological differences among sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) genotypes under high temperature stress. *Environ. Exp. Bot.* 100, 43–54. doi:10.1016/j.envexpbot.2013.11.013
- Dunwell, J.M., 2000. Transgenic approaches to crop improvement. *J. Exp. Bot.* 51, 487–496. doi:10.1093/jexbot/51.suppl_1.487
- Dwyer, L.M., Tollenaar, M., 1989. Genetic improvement in photosynthetic response of hybrid maize cultivars, 1959 to 1988. *Can. J. Plant Sci.* 69, 81–91. doi:10.4141/cjps89-010
- Easterling, W.E., P.K. Aggarwal, P. Batima, K.M. Brander, L. Erda, S.M. Howden, A. Kirilenko, J. Morton, J. F. Soussana, J. Schmidhuber and F.N. Tubiello. 2007: Food, fibre and forest products. *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 273-313.
- Edmeades, G.O., Daynard, T.B., 1979. The relationship between final yield and photosynthesis at flowering in individual maize plants. *Can. J. Plant Sci.* 59, 585–601. doi:10.4141/cjps79-097
- Edmeades, G.O., Bolaños, J., Elings, A., Ribaut, J.-M., Bänziger, M., Westgate, M.E., 2000. The Role and Regulation of the Anthesis-Silking Interval in Maize, in: *Physiology and Modeling Kernel Set in Maize*, CSSA Special Publication. Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Escobar, E.H., Ligier, D., Melgar, M., Matteio, H. y Vallejos, O. 1994. Mapa de suelos de los Departamentos de Capital, San Cosme e Itatí de la Provincia de Corrientes, Argentina. p. 129. Publicación del Convenio del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-ICAA) y la Provincia de Corrientes-CFI, Argentina.
- Eyshi Rezaei, E., Webber, H., Gaiser, T., Naab, J., Ewert, F., 2015. Heat stress in cereals: Mechanisms and modelling. *Eur. J. Agron.* 64, 98–113. doi:10.1016/j.eja.2014.10.003
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D., 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 317–345. doi:10.1146/annurev.pp.33.060182.001533
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243–282. doi:10.1146/annurev.physiol.61.1.243

- Ferris, R., Ellis, R.H., Wheeler, T.R., Hadley, P., 1998. Effect of high temperature stress at anthesis on grain yield and biomass of field-grown crops of wheat. *Ann. Bot.* 82, 631–639. doi:10.1006/anbo.1998.0740
- Fitter, A.H., Hay, R.K.M., 1987. *Environmental physiology of plants*. Academic Press.
- Fry, J., Huang, B., 2004. *Applied turfgrass science and physiology*. J. Wiley.
- Gates, D.M., 1968. Transpiration and leaf temperature. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 19, 211–238.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M.M., Roychowdhury, R., Fujita, M., 2013. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 9643–9684. doi:10.3390/ijms14059643
- Hawkins, E., Fricker, T.E., Challinor, A.J., Ferro, C.A.T., Ho, C.K., Osborne, T.M., 2013. Increasing influence of heat stress on French maize yields from the 1960s to the 2030s. *Glob. Change Biol.* 19, 937–947. doi:10.1111/gcb.12069
- Heckathorn, S.A., Coleman, J.S., Hallberg, R.L., 1998. Recovery of net CO₂ assimilation after heat stress is correlated with recovery of oxygen-evolving-complex proteins in *Zea mays* L. *Photosynthetica* 34, 13–20. doi:10.1023/A:1006899314677
- Henik, J.J., Knapp, A.D., Moore, K.J., Lee Burras, C., 2012. Normalized difference vegetative index used to identify spatial variability in vegetative growth and grain yield of corn. *Crop Management* 1, 11. doi:10.1094/CM-2012-0824-01-RS
- Hirasawa, T., Hsiao, T.C., 1999. Some characteristics of reduced leaf photosynthesis at midday in maize growing in the field. *Field Crops Res.* 62, 53–62. doi:10.1016/S0378-4290(99)00005-2
- Inman D., Khosla R., Mayfield T., 2005. On-the-go active remote sensing for efficient crop nitrogen management. *Sens. Rev.* 25, 209–214. doi:10.1108/02602280510606499
- IPCC, 2014. *Climate Change 2014: Impacts, adaptation, and vulnerability. Part A: Global and Sectorial Aspects*.
- Karim, M.A., Fracheboud, Y., Stamp, P., 1999. Photosynthetic activity of developing leaves of *Zea mays* is less affected by heat stress than that of developed leaves. *Physiol. Plant.* 105, 685–693. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.105413.x
- Kobata, T., Uemuki, N., 2004. High temperatures during the grain-filling period do not reduce the potential grain dry matter increase of rice. *Agron. J.* 96, 406–414.
- Liu, X., Huang, B., 2000. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Sci.* 40, 503–510. doi:10.2135/cropsci2000.402503x
- Lobell, D.B., Bänziger, M., Magorokosho, C., Vivek, B., 2011. Nonlinear heat effects on African maize as evidenced by historical yield trials. *Nat. Clim. Change* 1, 42–45. doi:10.1038/nclimate1043
- Lobell, D.B., Gourdji, S.M., 2012. The influence of climate change on global crop productivity. *Plant Physiol.* 160, 1686–1697. doi:10.1104/pp.112.208298
- Lu, Y., Hao, Z., Xie, C., Crossa, J., Araus, J. L., Gao, S., Vivek, B.S., Magorokosho, C., Mugo, S., Makumbi, D., Taba, S., Pan, G., Li, X., Rong, T., Zhang, S., Xu, Y., 2011. Large-scale screening for maize drought resistance using multiple selection criteria

- evaluated under water-stressed and well-watered environments. *Field Crops Res.* 124, 37–45. doi:10.1016/j.fcr.2011.06.003
- Maheswari, M., Joshi, D.K., Saha, R., Nagarajan, S., Gambhir, P.N., 1999. Transverse relaxation time of leaf water protons and membrane injury in wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to high temperature. *Ann. Bot.* 84, 741–745. doi:10.1006/anbo.1999.0974
- Massad, R. S., Tuzet, A., Bethenod, O., 2007. The effect of temperature on C4-type leaf photosynthesis parameters. *Plant Cell Environ.* 30, 1191–1204. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01691.x
- Masuka, B., Araus, J.L., Das, B., Sonder, K., Cairns, J.E., 2012. Phenotyping for abiotic stress tolerance in maize. *Integr. Plant Biol.* 54, 238–249. doi:10.1111/j.1744-7909.2012.01118.x
- Mkhabela, M.S., Mkhabela, M.S., Mashinini, N.N., 2005. Early maize yield forecasting in the four agro-ecological regions of Swaziland using NDVI data derived from NOAA's AVHRR. *Agric. For. Meteorol.* 129, 1–9. doi:10.1016/j.agrformet.2004.12.006
- Mohammed, A.R., Tarpley, L., 2010. Effects of high night temperature and spikelet position on yield-related parameters of rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Eur. J. Agron.* 33, 117–123. doi:10.1016/j.eja.2009.11.006
- Mohammed, A.R., Tarpley, L., 2009. High nighttime temperatures affect rice productivity through altered pollen germination and spikelet fertility. *Agric. For. Meteorol.* 149, 999–1008. doi:10.1016/j.agrformet.2008.12.003
- Monneveux, P., Sanchez, C., Tiessen, A., 2008. Future progress in drought tolerance in maize needs new secondary traits and cross combinations. *J. Agric. Sci.* 146, 287–300. doi:10.1017/S0021859608007818
- Muchow, R.C., Davis, R., 1988. Effect of nitrogen supply on the comparative productivity of maize and sorghum in a semi-arid tropical environment II. Radiation interception and biomass accumulation. *Field Crops Res.* 18, 17–30. doi:10.1016/0378-4290(88)90056-1
- Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H., Iba, K., 2000. Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science* 287, 476–479. doi:10.1126/science.287.5452.476
- Nebiker, S., Annen, A., Scherrer, M., Oesch, D., 2008. A light-weight multispectral sensor for micro UAV—Opportunities for very high resolution airborne remote sensing. *Int. Arch. Photogramm. Remote Sens. Spat. Inf. Sci.* 37, 1193–1199.
- Nelson, P.T., Goodman, M.M., 2008. Evaluation of Elite Exotic Maize Inbreds for Use in Temperate Breeding. *Crop Sci.* 48, 85–92. doi:10.2135/cropsci2007.05.0287
- Nissanka, S.P., Dixon, M.A., Tollenaar, M., 1997. Canopy gas exchange response to moisture stress in old and new maize hybrid. *Crop Sci.* 37, 172–181. doi:10.2135/cropsci1997.0011183X003700010030x
- Otegui, M.E., Bonhomme, R., 1998. Grain yield components in maize: I. Ear growth and kernel set. *Field Crops Res.* 56, 247–256. doi:10.1016/S0378-4290(97)00093-2

- Pastenes, C., Horton, P., 1996. Effect of high temperature on photosynthesis in beans (I. Oxygen evolution and chlorophyll fluorescence). *Plant Physiol.* 112, 1245–1251. doi:10.1104/pp.112.3.1245
- Pinto, R.S., Reynolds, M.P., 2015. Common genetic basis for canopy temperature depression under heat and drought stress associated with optimized root distribution in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 128, 575–585. doi:10.1007/s00122-015-2453-9
- Porter, J.R., Semenov, M.A., 2005. Crop responses to climatic variation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 360, 2021–2035. doi:10.1098/rstb.2005.1752
- Powell, N., Ji, X., Ravash, R., Edlington, J., Dolferus, R., 2012. Yield stability for cereals in a changing climate. *Funct. Plant Biol.* 39, 539–552.
- Prasad PVV, Staggenborg SA (2008) Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants. In: Ajuha LR, Reddy VR, Saseendran SA, Yu Q (eds) Response of crops to limited water: understanding and modeling water stress effects on plant growth processes. American Society of Agronomy/ Crop Science Society of America / Soil Science Society of America, Madison, WI, p 301–356
- Prasad, P.V.V., Staggenborg, S.A., Ristic, Z., Ahuja, L.R., Reddy, V.R., Saseendran, S.A., Yu, Q., 2008. Impacts of Drought and/or Heat Stress on Physiological, Developmental, Growth, and Yield Processes of Crop Plants, in: *Advances in Agricultural Systems Modeling*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America.
- Quemada, M., Gabriel, J.L., Zarco-Tejada, P., 2014. Airborne hyperspectral images and ground-level optical sensors as assessment tools for maize nitrogen fertilization. *Remote Sens.* 6, 2940–2962. doi:10.3390/rs6042940
- Rahman, H., Malik, S.A., Saleem, M., 2004. Heat tolerance of upland cotton during the fruiting stage evaluated using cellular membrane thermostability. *Field Crops Res.* 85, 149–158. doi:10.1016/S0378-4290(03)00159-X
- Raschke, K., 1970. Stomatal responses to pressure changes and interruptions in the water supply of detached leaves of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 45, 415–423. doi:10.1104/pp.45.4.415
- Rattalino Edreira, J.I., Budakli Carpici, E., Sammarro, D., Otegui, M.E., 2011. Heat stress effects around flowering on kernel set of temperate and tropical maize hybrids. *Field Crops Res.* 123, 62–73. doi:10.1016/j.fcr.2011.04.015
- Rattalino Edreira, J.I., Otegui, M.E., 2012. Heat stress in temperate and tropical maize hybrids: Differences in crop growth, biomass partitioning and reserves use. *Field Crops Res.* 130, 87–98. doi:10.1016/j.fcr.2012.02.009
- 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 Res.* 142, 58–67. doi:10.1016/j.fcr.2012.11.009
- Reynolds, M., Balota, M., Delgado, M., Amani, I., Fischer, R., 1994. Physiological and morphological traits associated with spring wheat yield under hot, irrigated conditions. *Funct. Plant Biol.* 21, 717–730.

- Richards, R.A., 2000. Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *J. Exp. Bot.* 51, 447–458. doi:10.1093/jexbot/51.suppl_1.447
- Ritchie, J. T. y Ne Smith, D. S., 1991. Temperature and crop development. En: Hanks, J., Ritchie, J. T. (Eds), *Modeling plant and soil Systems*. America Soc. Agron., Crop Sci. Soc. Am., Soil Sci. Soc. Am. Agronomy Series 31, Madison, WI, pp 5-29.
- Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R., 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 130, 1143–1151. doi:10.1104/pp.006858
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R., 2004. When defense pathways collide. The response of arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* 134, 1683–1696. doi:10.1104/pp.103.033431
- Romano, G., Zia, S., Spreer, W., Sanchez, C., Cairns, J., Araus, J.L., Müller, J., 2011. Use of thermography for high throughput phenotyping of tropical maize adaptation in water stress. *Comput. Electron. Agric.* 79, 67–74. doi:10.1016/j.compag.2011.08.011
- Rossini, M.A., Maddonni, G.A., Otegui, M.E., 2011. Inter-plant competition for resources in maize crops grown under contrasting nitrogen supply and density: Variability in plant and ear growth. *Field Crops Res.* 121, 373–380. doi:10.1016/j.fcr.2011.01.003
- Sadras, V.O., Echarte, L., Andrade, F.H., 2000. Profiles of leaf senescence during reproductive growth of sunflower and maize. *Ann. Bot.* 85, 187–195. doi:10.1006/anbo.1999.1013
- Sampathkumar, T., Pandian, B.J., others, 2010. Effect of fertigation frequencies and levels on growth and yield of maize. *Madras Agric. J.* 97, 245–48.
- Schlenker, W., Roberts, M.J., 2009. Nonlinear temperature effects indicate severe damages to U.S. crop yields under climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 15594–15598. doi:10.1073/pnas.0906865106
- Schrader, J., Nilsson, J., Mellerowicz, E., Berglund, A., Nilsson, P., Hertzberg, M., Sandberg, G., 2004. A High-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity. *Plant Cell* 16, 2278–2292. doi:10.1105/tpc.104.024190
- Sepulcre-Cantó, G., Zarco-Tejada, P.J., Sobrino, J.A., Berni, J.A.J., Jiménez-Muñoz, J.C., Gastellu-Etchegorry, J.P., 2009. Discriminating irrigated and rainfed olive orchards with thermal ASTER imagery and DART 3D simulation. *Agric. For. Meteorol.* 149, 962–975. doi:10.1016/j.agrformet.2008.12.001
- Shaw, R.H., 1977. Water use and requirements of maize—a review. *Agrometeorol. Maize Corn Crop* 480, 119–134.
- Sinclair, T.R., Purcell, L.C., Sneller, C.H., 2004. Crop transformation and the challenge to increase yield potential. *Trends Plant Sci.* 9, 70–75. doi:10.1016/j.tplants.2003.12.008
- Sinsawat, V., Leipner, J., Stamp, P., Fracheboud, Y., 2004. Effect of heat stress on the photosynthetic apparatus in maize (*Zea mays* L.) grown at control or high temperature. *Environ. Exp. Bot.* 52, 123–129.
- Spiertz, J.H.J., Hamer, R.J., Xu, H., Primo-Martin, C., Don, C., van der Putten, P.E.L., 2006. Heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.): Effects on grain growth and quality

- traits. *Eur. J. Agron.*, Modelling Quality Traits and Their Genetic Variability for Wheat Workshop on “Modelling Quality Traits and Their Genetic Variability for Wheat” 25, 89–95. doi:10.1016/j.eja.2006.04.012
- Stone, P., Nicolas, M., 1994. Wheat cultivars vary widely in their responses of grain yield and quality to short periods of post-anthesis heat stress. *Funct. Plant Biol.* 21, 887–900.
- Suárez, L., Zarco-Tejada, P.J., Sepulcre-Cantó, G., Pérez-Priego, O., Miller, J.R., Jiménez-Muñoz, J.C., Sobrino, J., 2008. Assessing canopy PRI for water stress detection with diurnal airborne imagery. *Remote Sens. Environ., Soil Moisture Experiments 2004 (SMEX04) Special Issue 112*, 560–575. doi:10.1016/j.rse.2007.05.009
- Sullivan, C. Y. (1972): Mechanisms of heat and drought resistance in grain Sorghum and methods of measurement. In: RAO, N. G. P. (ed.): *Sorghum in Seventies*, 247-264. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi.
- Takele, A., Farrant, J., 2013. Water relations, gas exchange characteristics and water use efficiency in maize and sorghum after exposure to and recovery from pre and post-flowering dehydration. *Afr. J. Agric.* 8, 6468–6478.
- Tallury, S.P., Goodman, M.M., 1999. Experimental evaluation of the potential of tropical germplasm for temperate maize improvement. *Theor. Appl. Genet.* 98, 54–61. doi:10.1007/s001220051039
- Teixeira, E.I., Fischer, G., van Velthuizen, H., Walter, C., Ewert, F., 2013. Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change. *Agric. For. Meteorol., Agricultural prediction using climate model ensembles 170*, 206–215. doi:10.1016/j.agrformet.2011.09.002
- Tester, M., Bacic, A., 2005. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiol.* 137, 791–793. doi:10.1104/pp.104.900138
- Tollenaar, M., 1991. Physiological basis of genetic improvement of maize hybrids in Ontario from 1959 to 1988. *Crop Sci.* 31, 119-124. doi:10.2135/cropsci1991.0011183X003100010029x
- Tollenaar, M., Dwyer, L.M., Stewart, D.W., 1992. Ear and kernel formation in maize hybrids representing three decades of grain yield improvement in Ontario. *Crop Sci.* v. 32(2), 432-438. doi:10.2135/cropsci1992.0011183X003200020030x
- Trachsel, S., Vicente, F.M.S., Suarez, E.A., Rodriguez, C.S., Atlin, G.N., 2016. Effects of planting density and nitrogen fertilization level on grain yield and harvest index in seven modern tropical maize hybrids (*Zea mays* L.). *J. Agric. Sci.* 154, 689–704. doi:10.1017/S0021859615000696
- Uhart, S.A., Andrade, F.H., 1995. Nitrogen deficiency in maize: I. Effects on crop growth, development, dry matter partitioning, and kernel set. *Crop Sci.* 35, 1376–1383. doi:10.2135/cropsci1995.0011183X003500050020x
- Vega, C., Andrade, F.H., Sadras, V.O., Uhart, S.A., Valentinuz, O.R., 2001. Seed number as a function of growth. A comparative study in soybean, sunflower, and maize. *Crop Sci.* 41, 748-754. doi:10.2135/cropsci2001.413748x

- Verhulst, N., Govaerts, B., Nelissen, V., Sayre, K.D., Crossa, J., Raes, D., Deckers, J., 2011. The effect of tillage, crop rotation and residue management on maize and wheat growth and development evaluated with an optical sensor. *Field Crops Res.* 120, 58–67. doi:10.1016/j.fcr.2010.08.012
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 61, 199–223. doi:10.1016/j.envexpbot.2007.05.011
- Wang, J.Z., Cui, L.J., Wang, Y., Li, J.L., 2009. Growth, lipid peroxidation and photosynthesis in two tall fescue cultivars differing in heat tolerance. *Biol. Plant.* 53, 237–242. doi:10.1007/s10535-009-0045-8
- Weber, V.S., Melchinger, A.E., Magorokosho, C., Makumbi, D., Bänziger, M., Atlin, G.N., 2012. Efficiency of managed-stress screening of elite maize hybrids under drought and low nitrogen for yield under rainfed conditions in southern africa. *Crop Sci.* 52, 1011-1020. doi:10.2135/cropsci2011.09.0486
- Wen, W., Guo, T., Tovar, V.H.C., Li, H., Yan, J., Taba, S., 2012. The strategy and potential utilization of temperate germplasm for tropical germplasm improvement: a case study of maize (*Zea mays* L.). *Mol. Breed.* 29, 951–962. doi:10.1007/s11032-011-9696-1
- White, J.W., Andrade-Sanchez, P., Gore, M.A., Bronson, K.F., Coffelt, T.A., Conley, M.M., Feldmann, K.A., French, A.N., Heun, J.T., Hunsaker, D.J., Jenks, M.A., Kimball, B.A., Roth, R.L., Strand, R.J., Thorp, K.R., Wall, G.W., Wang, G., 2012. Field-based phenomics for plant genetics research. *Field Crops Res.* 133, 101–112. doi:10.1016/j.fcr.2012.04.003
- Yamada, M., Hidaka, T., Fukamachi, H., 1996. Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence. *Sci. Hortic.* 67, 39–48. doi:10.1016/S0304-4238(96)00931-4
- Yamori, W., Hikosaka, K., Way, D.A., 2013. Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynth. Res.* 119, 101–117. doi:10.1007/s11120-013-9874-6
- Zia, S., Romano, G., Spreer, W., Sanchez, C., Cairns, J., Araus, J.L., Müller, J., 2013. Infrared thermal imaging as a rapid tool for identifying water-stress tolerant maize genotypes of different phenology. *J. Agron. Crop Sci.* 199, 75–84. doi:10.1111/j.1439-037X.2012.00537.x
- Zlatev, Z., Berova, M., Stoeva, N., & Vassilev, A., 2003. Use of physiological parameters as stress indicators. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 4(4), 841-849