Calidad de grano en cebada cervecera: manejo de la disponibilidad de nitrógeno y regulación de su removilización

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

José Julián Boero

Ingeniero Agrónomo - Universidad Nacional de Luján - 2013

Lugar de trabajo: Cátedra de Fertilidad y Fertilizantes-INBA-FAUBA

FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis
Flavio H. Gutierrez Boem
Ingeniero Agrónomo (FAUBA)
Doctor of Philosophy (University of Kentucky)

Co-directora de tesis
Carla Caputo
Licenciada en Ciencias Biológicas (UBA)
Doctora en Ciencias Biológicas (FCEN-UBA)

JURADOS

Daniel J. Miralles
Ingeniero Agrónomo (FAUBA)
Doctor en Ciencias Agronomicas (FAUBA)

Dana Ethel Martinez
Licenciada en Biología (UNLP)
Doctora en Ciencias Naturales (UNLP)

Susana Mabel Gallego
Bioquímica
Doctora en Bioquímica Vegetal (UBA)

Agradecimientos

A mis padres por su apoyo y acompañamiento tanto en mi carrera de grado como en el Doctorado.

A María Fernanda por su acompañamiento, apoyo, comprensión y motivación en esta etapa.

A mis compañeros y amigos de la catedra de Fertilidad, con los que compartí esta etapa y además muchos lindos momentos dentro y fuera de la catedra: Flor de Marotte, Flor Sucunza, Claudio Acosta, Nati Osinaga, Ana Graziano, Matías Redel, Sonia Cabrera, Lucía Casali.

A mis directores Flavio y Carla por confiar en mí, ayudarme, guiarme y por sus consejos para mi formación.

A Pablo Prystupa por su ayuda con los ensayos, su apoyo en la Tesis y por sus consejos.

A Cintia Veliz por su colaboración en los muestreos y las determinaciones moleculares.

A Marcos y Federico por su colaboración con los ensayos y los muestreos.

A mis compañeros y amigos de la catedra de Microbiología: Flor Galotta, Mariela, Federico, Jessica que colaboraron con mis muestreos y determinaciones.

A todos los compañeros con quienes compartí los cursos de posgrado con quienes mantengo la amistad.

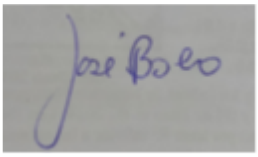
A los docentes de la EPG con quienes compartí los cursos para mi formación

A los evaluadores del proyecto de Tesis y de la Tesis por sus sugerencias para mejorar mi trabajo.

A Gustavo Ferraris por su colaboración y por facilitarme sus ensayos y también a los asesores y productores que me facilitaron sus campos para poder realizar los ensayos.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifiquen explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.



Ing. Agr. José Boero

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....iii
ÍNDICE GENERAL.....v
ÍNDICE DE CUADROS..... vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....ix
ABREVIATURAS.....xiv
RESUMEN.....xv
ABSTRACT.....xvi

CAPÍTULO 1: Introducción General……...1
1.1 Situación actual del cultivo de cebada……..…..2
1.2 Determinación del rendimiento y su relación con la nutrición nitrogenada…..…..3
1.3 Manejo de la disponibilidad de nitrógeno y calidad de grano…….....4
1.4 Objetivo general…….....7
1.5 Objetivos específicos e hipótesis…….……7

CAPÍTULO 2: El estado del cultivo en antesis y la fertilización foliar como determinantes del rendimiento y la proteína…….....9
2.1 Introducción……...…...… ……...…10
2.1.1 Objetivos específicos…….……11
2.1.2 Hipótesis……12
2.2 Materiales y Métodos……...……..12
2.3 Resultados……..15
2.3.1 Crecimiento del cultivo, rendimiento y sus componentes……17
2.3.2 Absorción y partición del N en el cultivo……...21
2.3.3 Absorción y removilización de N post-antesis……...24
2.3.4 Proteína en grano……...28
2.4 Discusión…….…...……33
2.4.1 Crecimiento y rendimiento……33
2.4.2 Efecto de la disponibilidad de N sobre la absorción y removilización post-antesis……...……..34
2.4.3 Proteína…….……36
2.5 Conclusiones…….……...…….....39

CAPÍTULO 3: Evaluación del estado del cultivo en antesis y estimación del rendimiento y proteína mediante índices espectrales…….…….……..……..40
3.1 Introducción……..….……41
3.1.1 Objetivos específicos……..…….…42
3.2 Materiales y métodos……...……..43
3.2.1 Mediciones a campo…….……..43
3.2.2 Análisis de los datos de reflectancia……...43
3.3 Resultados……..45
3.3.1 Relación entre índices espectrales y el estado del cultivo en antesis…..45

3.3.2 Relaciones entre mediciones en antesis con el cultivo a cosecha final……..….……...52
3.4 Discusión……..…….……57
3.4.1 Relación entre índices espectrales y el estado del cultivo en antesis…...57
3.5 Conclusiones……..62

CAPÍTULO 4: Regulación de la removilización de N post-antesis……....64
4.1 Introducción……...65
4.1.1 Objetivo específico e hipótesis……...……66
4.2 Materiales y métodos…….…..….67
4.2.1 Material vegetal y diseño experimental…….....……67
4.2.2 Toma de muestras y extracción de los exudados floemáticos……67
4.2.3 Determinaciones bioquímicas y moleculares……..…….....68
4.2.4 Análisis estadísticos…….....69
4.3 Resultados……...…...69
4.3.1 Caracterización de los sitios y de los cultivos en función de la disponibilidad de nutrientes……..……69
4.3.2 Efecto de la fertilización en antesis: Crecimiento del cultivo y de los granos durante el llenado, rendimiento y proteína en grano ..……..71
4.3.3 Partición del N en la hoja durante el llenado…….……....73
4.3.4 Movilización de aminoácidos vía floema durante el llenado……..77
4.3.5 Actividad de las enzimas Nitrato Reductasa (NR), Glutamina Sintetasa (GS) y expresión génica de las isoformas de GS, trasportadores de aminoácidos y SAG12……...79
4.4 Discusión…….…….....81
4.4.1 Caracterización de los cultivos en función de su estado nutricional y efecto de la fertilización en antesis sobre variables agronómicas……81
4.4.2 Partición del N en planta y efecto sobre la senescencia foliar…….....82
4.4.3 Efecto de la fertilización foliar sobre la Exportación de aminoácidos y la expresión de GS y trasportadores de aminoácidos…..…… 84
4.5 Conclusiones……..85

CAPÍTULO 5: Discusión general…….87
5.1 Análisis de objetivos, hipótesis, principales resultados y relación entre los capítulos de la tesis ……88
5.2 Aportes originales……...……91
5.3 Propuestas para investigaciones futuras……..…....92

CAPÍTULO 6: Referencias Bibliográficas……...94

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1: Caracterización de los cultivos y sitios al inicio de los ensayos y en antesis…16

Cuadro 2.2: Medias de los tratamientos y cuartiles 25 y 75 para las variables relacionadas al crecimiento del cultivo, rendimiento, componentes del rendimiento y ANOVA (valores de *p* de los factores Sitio, Tratamiento y su interacción). Letras diferentes junto a las medias indican diferencias significativas entre tratamientos (*p*<0,05, LSD)…….18

Cuadro 2.3: Medidas resumen para las variables relacionadas a la absorción y partición de N. Letras diferentes junto a las medias indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD Fischer; *p*<0,05)…….....21

Cuadro 3.1: Fórmulas de los índices de estudios previos calculados en este trabajo. En los casos donde no se midieron las bandas correspondientes se usaron las bandas medidas más aproximadas a las descriptas en la fórmula……....44

Cuadro 3.2: Relación entre el crecimiento pre-antesis, contenido de N en planta, N absorbido pre-antesis e los índices espectrales descriptos en bibliografía. Se muestran los valores de R^2 en aquellas relaciones que resultaron significativas (*p*<0,05), ns: regresión no significativa: (*p*>0,05). Los valores de R^2 en negrita corresponden a las regresiones que mejor explicaron las variaciones en cada una de las variables analizadas……..……...46

Cuadro 3.3: Relación entre la biomasa, contenido de N en planta, N absorbido en antesis y la reflectancia en bandas individuales, cocientes y diferencias normalizadas entre bandas. Se muestran los valores de R2 en aquellas relaciones que resultaron significativas (*p*<0,05). Los valores de R2 en negrita corresponden a las regresiones que mejor explicaron las variaciones en cada una de las variables analizadas. (ns: regresión no significativa: valor *p*>0,05)…….47

Cuadro 3.4: Relación del INN, INN Zhao e INN50% con índices, reflectancia en bandas individuales, cocientes simples y diferencias normalizadas entre bandas. Se muestran los valores de R^2 en aquellas relaciones que resultaron significativas (*p*<0,05). Los valores de R^2 en negrita corresponden a las regresiones que mejor explicaron cada una de las variables. (ns: regresión no significativa: valor *p*>0,05)…….……..50

Cuadro 3.5: Relación entre el rendimiento, proteína y N absorbido final con índices espectrales descriptos en trabajos previos. Se muestran los valores de R^2 en aquellas relaciones que resultaron significativas (*p*<0,05), (ns: regresión no significativa: valor *p* >0,05). Los valores de R^2 en negrita corresponden a las regresiones que mejor explicaron cada una de las variables……52

Cuadro 3.6: Relación entre rendimiento, proteína y N absorbido en grano con bandas, cocientes y diferencias normalizadas entre bandas. Para los cocientes de bandas y las diferencias normalizadas se muestran sólo los que presentaron mejor ajuste con cada variable. Se muestran los valores de R^2 en aquellas relaciones que resultaron significativas (*p*<0,05),

(ns: regresión no significativa: valor *p*>0,05). Los valores de R^2 en negrita corresponden a las regresiones que mejor explicaron cada una de las variables……..52

Cuadro 4.1: Caracterización de los sitios y cultivos analizados en el presente capítulo (Extraído de Capítulo 2; Cuadro 2.1)…….....69

Cuadro 4.2: ANOVA para las variables rendimiento, proteína, ERN y N absorbido en rastrojo y valores de los contrastes entre tratamientos. Los contraste se realizaron cuando el efecto del tratamiento fue significativo (*p*<0,05), C= Control……...71

Cuadro 4.3: Análisis de varianza para crecimiento, peso fresco de granos, variables en medidas en hoja: contenido de clorofila, proteína soluble, aminoácidos, nitrato y tasa de exudación de aminoácidos en floema en el período post-antesis. Los contrastes se realizaron cuando la interacción Sitio x Tratamiento resultó significativa (*p*<0,05)…….....74

Cuadro 4.4: Valores *p* del test F para la comparación de pendientes entre tratamientos para variables medidas en hoja (Proteína, Clorofila, Aminoácidos y Nitrato) y la tasa de exudación de aminoácidos en floema entre 7-21 días post-antesis. La comparación se realizó cuando el efecto de los tratamientos fue significativo (Cuadro 4.3). Aa: aminoácidos……..75

Cuadro 4.5: ANOVA y contrastes para la expresión génica de las isoformas de GS y trasportadores de aminoácidos a los 7 días post-antesis…….80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Superficie cosechada de cebada cervecera en la Argentina, y la provincia de Buenos Aires (MAGyP, 2019)……...…….2

Figura 1.2: Rendimiento promedio nacional de cebada cervecera (MAGyP, 2019)….……4

Figura 2.1: Ubicación geográfica de los sitios experimentales. Los símbolos amarillos corresponden al año 2014, símbolos rojos corresponden al año 2015 y símbolos azules al año 2016…….....12

Figura 2.2: Probabilidad y probabilidad acumulada para las variables crecimiento pre-antesis, biomasa final y rendimiento del tratamiento Control, relativo al tratamiento N150.……..……...17

Figura 2.3: Relación entre el rendimiento y el crecimiento pre-antesis (a). Relación entre el número de granos y el crecimiento pre-antesis (b). Relación entre el rendimiento y el número de granos (c). Relación entre el rendimiento y el peso del grano (d)……19

Figura 2.4: Calibre en función del peso de grano ……...….20

Figura 2.5: Efecto de la suma térmica durante los primeros 30 días del llenado de los granos sobre el peso (a) y el calibre (b) de los granos. ST: suma de las temperaturas máximas diarias usando 27ºC como temperatura mínima para el cálculo del índice de estrés térmico……...20

Figura 2.6: Relación entre el N absorbido pre-antesis y el N disponible en el suelo en emergencia (a). Proporción de N absorbido pre-antesis respecto al N disponible en función del N disponible (b). N disponible: Control: N suelo 0-60 cm; N150: N suelo 0-60 cm + 150kg ha^{-1}……..22

Figura 2.7: Relación entre el rendimiento y el N absorbido pre-antesis. La línea llena representa la eficiencia fisiológica media para todos los tratamientos, la línea discontinua indica la eficiencia fisiológica máxima (5% mayor), donde el plateau de rendimiento fue calculado con los 5% de los rendimientos más altos, la línea punteada indica la eficiencia fisiológica mínima (5 % inferiores)……...22

Figura 2.8: Relación entre el N absorbido total y el N absorbido pre-antesis (a). Relación entre el N absorbido en grano y el N absorbido pre-antesis (b)…….…….23

Figura 2.9: Curvas de dilución ajustada al tratamiento N150, la línea punteada (N150 50%) corresponde al 50 % de los datos que estuvieron por debajo de la línea justada al tratamiento N150 y curvas de referencia de Justes et al., 1994 y Zhao, 2014. Los símbolos llenos corresponden a los sitios donde el crecimiento pre-antesis del control fue mayor al 90% del tratamiento N150 (a). Relación entre el rendimiento relativo y el INN calculado con la curva del tratamiento N150 (b), y la curva 50% inferior (c)…….....24

Figura 2.10: N removilizado post-antesis en función del N acumulado en biomasa aérea en pre-antesis(a), del rendimiento (b)……...……..25

Figura 2.11: Eficiencia de Removilización de N en función del N disponible como nitrato en antesis (a), del N absorbido post-antesis (b), del contenido de N en antesis (c) Relación de la ERN con el N absorbido final por Mg de biomasa final (d). Se ajustaron funciones a los tratamientos dónde la regresión resultó significativa (p<0,05).…….…..26

Figura 2.12: Relación entre el % de N en el grano proveniente de removilización (N grano rem %) y la cantidad de N removilizado post-antesis (a). Relación entre el % de N en el grano proveniente de removilización y la Eficiencia de Removilización (b). Porcentaje N en grano proveniente de removilización en función del N-NO_3 en antesis (c) y de la sumatoria del N-NO_3 en antesis y el N mineralizado en el llenado (d)……..27

Figura 2.13: Cantidad de N absorbido del suelo en la etapa post-antesis en función de la disponibilidad de N como nitrato (0-60 cm) en antesis + el N mineralizado en post-antesis (a) y del crecimiento post-antesis (b)…….28

Figura 2.14: Relación del Índice de Cosecha de N con el N disponible (N-NO_3 en antesis) (a), con el N absorbido final por Mg de biomasa final (b)…….28

Figura 2.15: Relación de la proteína en grano con: el contenido de N en antesis (a), el N absorbido pre-antesis (b), el N absorbido final por Mg de rendimiento (c), el N disponible al inicio del cultivo por Mg de rendimiento (d). La línea punteada es la función ajustada a todos los sitios, la línea llena corresponde a la función ajustada excluyendo los sitios donde la precipitación entre emergencia y antesis fue mayor a 400 mm, los símbolos llenos corresponden a los sitios excluidos de la regresión……29

Figura 2.16: Relación entre la proteína y el contenido de N en antesis agrupados en función de la proporción del N en grano aportada por removilización. (a) corresponde al 50% de los sitios que tuvieron la menor proporción de N aportado por la removilización (51,6% en promedio). La figura b corresponde al 50% de los cultivos que tuvieron la mayor proporción de N en grano aportado por la removilización, (80,1% en promedio)……30

Figura 2.17: Relación entre la proteína y los índices de Nutrición Nitrogenada. Calculados con las curvas de dilución (a) de N150 y (b) de Zhao, 2014. Los INN de las curvas Justes et al., 1994 y N150* no se muestran por tener R^2 inferior a las mostradas…….....30

Figura 2.18: Relación entre la proteína y la suma de temperatura máximas diarias mayores a 29°C en los primeros 30 días post-antesis……31

Figura 2.19: Relación entre la proteína observada y la proteína calculada con el modelo de regresión múltiple previamente descripto……..32

Figura 2.20: Relación entre la proteína en grano en el tratamiento N20f y la proteína en grano en el tratamiento Control (a). Relación entre la respuesta a la fertilización foliar, en

incremento de contenido proteico, y la biomasa aérea en antesis (b), el N disponible en antesis como N-NO_3 (c) y el INN obtenido con la curva ajustada al tratamiento N150 (d)……33

Figura 3.1: Reflectancia del cultivo en función de la longitud de onda…….45

Figura 3.2: Relación entre el crecimiento pre-antesis y la reflectancia de la banda R_{780} (a), el índice OSAVI (b), el cociente R_{780}/R_{450} (c) y la diferencia normalizada entre R_{760} y R_{710} (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x…….……46

Figura 3.3: Relación entre el contenido de N en antesis y la reflectancia de la banda R_{1080} (a), índice REIP (b), cociente R_{1080}/R_{730} (c) y diferencia normalizada R_{1080}-R_{730} (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x……..…48

Figura 3.4: Relación entre el N absorbido pre-antesis y la banda R_{780} (a), índice REIP (b) cociente R_{760}/R_{710}(c) y diferencia normalizada R_{870}-R_{730} (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x…….……..……...49

Figura 3.5: Relación entre el INN calculado a partir de la curva ajustada al tratamiento N150 y la diferencia normalizada R_{870} - R_{730} (a). Relación entre el INN calculado a partir de la curva ajustada al tratamiento N150 y el índice REIP (b). Relación entre el INN calculado a del 50% inferior del tratamiento N150 y la diferencia normalizada R_{870} - R_{730} (c). Relación entre el INN calculado a partir de la curva de Zhao, 2014 y la diferencia normalizada R_{870} - R_{730} (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x……..…….51

Figura 3.6: Relación entre el rendimiento y la banda R_{780} (a), índice OSAVI (b), cociente R_{1080}/R_{730} (c) y diferencia normalizada ($R8_{70}$-R_{730}) (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x…….....53

Figura 3.7: Relación entre el N absorbido total y la reflectancia en la banda R_{780}(a), índice OSAVI (b), cociente R_{760}/R_{550}(c) y diferencia normalizada R_{870}-R_{730} (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x…….……..54

Figura 3.8: Relación entre la proteína y la banda R_{1080} (a), índice REIP (b) cociente R_{1220}/R_{730} (c) y diferencia normalizada R_{1080}-R_{730} (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x…….……..55

Figura 3.9: Relación entre la proteína en grano y la diferencia normalizada (R_{1080} - R_{730}), agrupados en función de la proporción del N total en grano aportada por la removilización de N. (a) corresponde al 50% de los sitios que tuvieron la menor proporción de N en grano aportado por la removilización. (b) corresponde al 50% de los sitios que tuvieron la mayor proporción de N en grano aportado por la removilización…….56

Figura 3.10: Relación entre la proteína con el estimador Nitrógeno disponible (Nd) por Mg de rendimiento estimado (a), los puntos llenos corresponden a los sitios que fueron excluidos de la regresión, al igual que en el Capítulo 2. Relación entre la proteína con la cantidad de N absorbido final estimado por Mg de rendimiento estimado (b)……..……...57

Figura 4.1: Crecimiento y contenido de N en antesis, relativo al tratamiento Control. * indica diferencias significativas (*p* contraste <0,05). Se testeó la interacción SxT cuando el valor *p* del ANOVA fue <0,1. Los números junto a las barras indican la biomasa aérea (g m^{-2}) y el contenido de N en tejidos de la parte aérea (mg g^{-1}) del tratamiento Control al momento de antesis……...…….…70

Figura 4.2: Rendimiento y proteína en grano para los tratamientos Control y N150. * indica diferencias significativas entre tratamientos (valor *p* del contraste <0,05)……71

Figura 4.3: Variación en el rendimiento y proteína final para los tratamientos de fertilización foliar en antesis (N20f y N40f), relativo al tratamiento control. * Indican diferencias significativas respecto al tratamiento Control (*p*< 0,05).....…….....72

Figura 4.4: Biomasa aérea y peso de los granos, evaluados a través del peso fresco de las espigas, durante en el período post-antesis, para los tratamientos Control N20f y N40f. DDA días después de antesis…….……..73

Figura 4.5: Contenido de clorofila y proteínas solubles en hoja durante el llenado. Las líneas punteadas corresponden a la función ajustada para evaluar la tasa de disminución, cuando los efectos de tratamiento resultaron significativos. Las funciones en todos los casos se ajustaron en el período 7-21 DDA. DDA: días después de antesis……..……..75

Figura 4.6: Contenido de aminoácidos y nitrato en hoja durante el llenado, para los tratamientos N antesis (N20f y N40f) y el Control. DDA días después de antesis. Las líneas punteadas corresponden a la función ajustada para evaluar la tasa de disminución. En 25 de mayo y Junín las funciones se ajustaron en el intervalo 7-14 DDA y 14-21 DDA……76

Figura 4.7: Tasa de exudación de aminoácidos en floema durante el llenado. Las líneas punteadas corresponden a la función ajustada a la tasa de exportación. En 25 de mayo y Arribeños las funciones se ajustaron en el intervalo 7-21 DDA y 14-21DDA. En Junín las funciones se ajustaron en el intervalo 7-14 DDA y 14-21 DDA……..77

Figura 4.8: Relación de la proteína final en grano con variables bioquímicas mediadas en hoja a los 7 días post-antesis (a), el contenido de proteína (b), el contenido de aminoácidos (c), el contenido de nitrato y el contenido de clorofila (d).……78

Figura 4.9: Relación entre la exudación de aminoácidos vía floema integrada entre los 7 y 21 días post-antesis y el contenido proteico final. Cada punto corresponde a un sitio-tratamiento…….…….……...79

Figura 4.10: Actividad de la NR y GS para el sitio de Arribeños a los 7 días post-antesis. *indica diferencias significativas, contraste respecto al Control (*p*<0,05)……...……79

Figura 4.11: Expresión de los genes para isoformas de GS (GS1_1, GS1_2 Y GS2) y trasportadores de aminoácidos (AAP6 y AAP7) del sitio Arribeños a los 7 días post-antesis……80

Figura 4.12: Expresión de los genes de la proteasa SAG 12 en Arribeños a los 7 y 21 días post-antesis……81

Abreviaturas utilizadas en esta Tesis

Biofinal (g m^{-2}): Biomasa aérea a cosecha

Biorast. (kg ha^{-1}): Biomasa de rastrojo

Crec. postant. (%): biomasa aérea acumulada en llenado (como %) de la biomasa total

Crec. postant. (g m^{-2}): crecimiento del cultivo en pos-antesis

Crec. preant. (g m^{-2}): Crecimiento del cultivo previo a antesis

DDA: Días después de antesis

ERN (%): porcentaje del N absorbido pre-antesis removilizado post-antesis

Nabsant. (kg ha^{-1} de N): cantidad de N absorbido en pre-antesis (en la biomasa aérea)

Nabsfinal (kg ha^{-1} de N): cantidad de N absorbido a cosecha final (N grano + N rastrojo)

Nabsfoliar (kg ha^{-1} de N): cantidad de N absorbido a partir de la aplicación foliar

Nabsgrano (kg ha^{-1} de N): cantidad de N en grano a cosecha

Nabsllenado (kg ha^{-1} de N): cantidad de N absorbido del suelo en la etapa de llenado

Nabsrast. (kg ha^{-1} de N): cantidad de N en rastrojo

Nantesis (mg g^{-1} de N): Contenido de N en la biomasa aérea en antesis

Ndisp.: N disponible en suelo, calculado como la suma del N de nitrato 0-60 cm para el control y N N de nitrato 0-60 cm +150kg para el tratamiento N150

Ngrano (mg g^{-1} de N): contenido de N en grano

Nmin. (kg ha^{-1} de N): N mineralizado aparente post-antesis

NO_3 antesis (kg ha^{-1} de N- NO_3): Contenido de N-NO_3 en suelo hasta 60 cm en antesis

NO_3 final (kg ha^{-1} de N): N-NO_3 hasta 60 cm a cosecha final

Nrast. (mg g^{-1} de N): contenido de N en rastrojo

Nrem. (kg ha^{-1} de N): cantidad de N absorbido pre-antesis removilizado post-antesis

Nremgrano (%): porcentaje del N en el grano proveniente de removilización

R_{xxx}: Reflectancia del cultivo en la longitud de onda XXX

RESUMEN

En Argentina la cebada cervecera frecuentemente tiene bajo contenido proteico. Una alternativa para incrementarlo es aplicar N vía foliar en antesis, sin embargo, no es claro el mecanismo de asimilación y movilización. Los objetivos fueron determinar el efecto de aplicar N en antesis sobre la calidad de grano, predecir la necesidad de fertilización complementaria mediante evaluaciones directas e indirectas (sensores remotos) del cultivo en antesis y evaluar la distribución del N aplicado en las diferentes fracciones nitrogenadas de la hoja y su repercusión sobre la removilización del N absorbido pre-antesis. Se realizaron ensayos a campo durante tres años consecutivos en la provincia de Buenos Aires, con cuatro tratamientos: Control, N150 (150 kg ha^{-1} de N, para determinar la deficiencia de N), N20f (20 kg ha^{-1} de N foliar en antesis) y N40f (40 kg ha^{-1} de N foliar en antesis). La proteína de los granos se asoció al contenido de N en planta en antesis y al INN establecido mediante curvas de dilución. La relación dependió de la proporción de N en grano aportado por removilización, que estuvo inversamente relacionada al aporte de N del suelo ($N\text{-}NO_3$ en antesis + N mineralizado post-antesis). La fertilización foliar incrementó la proteína 0,67 puntos porcentuales en promedio, sin afectar el rendimiento ni la removilización de N. El cociente R_{780}/R_{450} y las diferencias normalizadas de reflectancias (R_{870}-R_{730}) y (R_{1080}-R_{730}) fueron los mejores estimadores del crecimiento, el N absorbido y el contenido de N respectivamente. El rendimiento y el N absorbido final se relacionaron significativamente a varios índices calculados en antesis, los cocientes (R_{730}/R_{710}) y (R_{760}/R_{550}) respectivamente fueron los que mejor explicaron las variaciones de ambos parámetros. La estimación directa de la proteína en antesis mediante índices fue poco precisa, sin embargo, se logró estimar mediante el cociente entre el N disponible inicial y el rendimiento estimado. La aplicación foliar aumentó el contenido de aminoácidos y nitrato en hoja, mientras que el contenido de proteínas solubles y clorofila aumentó solo cuando no hubo limitación de S. Asimismo, la fertilización foliar no afectó el inicio de la senescencia foliar y aumentó la tasa de disminución de proteínas foliares por lo que se infiere que aumentó la degradación de las mismas, lo que redundó en un mantenimiento de la ERN y en un incremento de la movilización de N vía floema. La mayor movilización estuvo estrechamente relacionad a la proteína en grano y su incremento podría atribuirse a la mayor actividad y expresión génica de la enzima GS y la mayor expresión de los trasportadores de aminoácidos AAP6 y AAP7.

Palabras Clave: cebada cervecera, calidad maltera, proteína, fertilización foliar, removilización de N, sensores remotos, senescencia foliar

ABSTRACT

In Argentina malting barley often present low protein content. An alternative to increase this parameter is a foliar N fertilization at anthesis. However, the mechanism by which this application is assimilated and mobilized is not clear. The aims of this work were to determine the effect of applying N at anthesis on grain quality, to estimate the need of complementary fertilization through direct and indirect (remote sensors) crop evaluations at anthesis and to evaluate the distribution of applied N in the different nitrogenous fractions of the leaf and its impact on the remobilization of N absorbed at pre-anthesis. Three years of field trials were done in Buenos Aires province with four treatments: Control, N150 (150 kg ha^{-1} of N, to determine N deficiency), N20f (20 kg ha^{-1} of foliar N at anthesis) and N40f (40 kg ha^{-1} of foliar N at anthesis. Grain protein was associated to plant N content at anthesis and NNI established through dilution curves. The relationship depended on the proportion of grain N provided by remobilization, and inversely related to soil N contribution ($N\text{-}NO_3$ at anthesis + post-anthesis N mineralized). Foliar fertilization increased protein in 0.67 percentage points on average, without affecting yield or N remobilization. R_{780}/R_{450} reflectance ratio and normalized differences (R_{870}-R_{730}) and (R_{1080}-R_{730}) were the best estimators of pre-anthesis growth, absorbed N and N content respectively. Yield and final N absorbed had a strong relationship with the ratios (R_{730}/R_{710} and R_{760}/R_{550}) respectively, measured at anthesis. Protein had a weak direct relationship with the spectral indices tested, but it can be estimated by the ratio between the initial available N and the estimated yield. Foliar application increased foliar amino acids and nitrate content, while chlorophyll and soluble protein only increased when S was not limitant. Foliar application did not affect foliar senescence onset and protein decrease rate was increased which explains that crops maintain NRE and increase phloem N mobilization. This last parameter was strongly related to grain protein, and may be explained by the increase in activity and gene expression of GS enzyme and the expression of the amino acids transporters AAP6 and AAP7.

Key words: malting barley, malting quality, protein, foliar fertilization, N remobilization, remote sensors, leaf senescence

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Situación actual del cultivo de cebada

La cebada es el cuarto cereal más cultivado en el mundo: de alrededor de 680 millones de hectáreas cultivadas con cereales, el 7% (cerca de 47 millones de hectáreas) son cultivadas con cebada (FAOSTAT, 2019). El principal uso de la cebada es la alimentación animal: aproximadamente el 85% de la producción mundial es destinada a este fin (Fischbeck, 2001). Una fracción menor, alrededor del 15%, se emplea para obtener malta. El valor comercial de la cebada destinada a las malterías suele ser muy superior al de la cebada forrajera, por lo que existe un marcado interés entre los productores por obtener cereal que cumpla con los requisitos de la industria. Por lo tanto, el manejo del cultivo debe ser realizado con el doble objetivo de obtener altos rendimientos y una calidad aceptable para las malterías. La producción de cebada en la Argentina y, en general, en el Mercosur tiene como principal destino la producción de malta (Gutierrez Cabello et al., 2017). La Argentina cuenta con condiciones agro-ecológicas favorables para obtener granos de calidad adecuada para malterías. La cebada cervecera se ha presentado en los últimos años como una alternativa de creciente interés entre los cultivos de invierno. De hecho, a partir de la campaña 2011/2012 la superficie aumentó, debido a modificaciones en el mercado del trigo y actualmente se mantiene alrededor de 1 millón de hectáreas (Figura 1.1), representando el último año en la provincia de Buenos Aires un área equivalente al 16 % del área destinada a trigo. Entre los factores que determinaron el aumento de la superficie sembrada con este cultivo se destacan las condiciones comerciales favorables, el mayor consumo local de cerveza, una mayor demanda internacional de cebada y malta y un aumento en la capacidad de la industria maltera instalada en el país. Además, la menor duración de su ciclo de cultivo en comparación con el trigo (Alvarez Prado et al., 2013) favorece su inclusión en la rotación. Esta característica permite la implantación más temprana de soja de segunda, mejorando su productividad y rentabilidad frente a la alternativa trigo/soja (Tosi, 2013). Del total de la producción a nivel nacional, el 90,5% de la misma se encuentra dentro de la provincia de Buenos Aires, comprendiendo 3 áreas principales: Centro-Norte, Sudeste y Sudoeste-Oeste de la provincia.

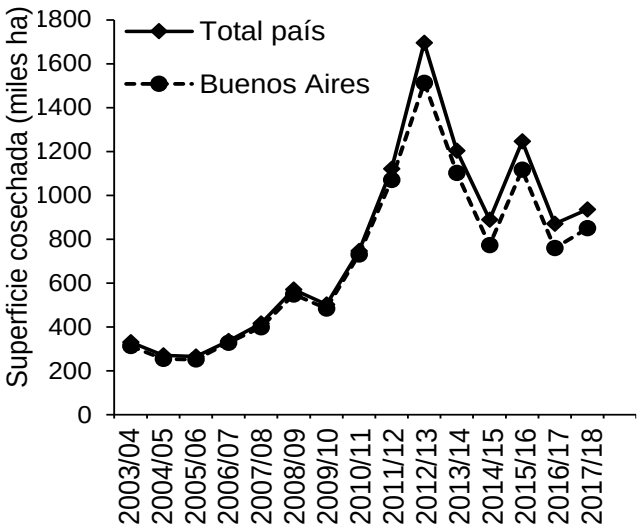


Figura 1.1: Superficie cosechada de cebada cervecera en Argentina, y provincia de Buenos Aires (MAGyP, 2019).

Para alcanzar el objetivo de alta productividad del cultivo y calidad adecuada para su comercialización en malterías (contenido proteico entre 10 y 12% y un mínimo de 85% de granos mayores a 2,5 mm), es necesaria una regulación precisa del contenido de proteínas del grano sin detrimento del rendimiento. En la región Pampeana, la histórica falta de reposición de los nutrientes exportados con las cosechas y la erosión condujeron a una

disminución en la disponibilidad de nutrientes en los suelos. En los últimos años, la intensificación de la producción, a través del doble cultivo y los mayores rendimientos de los mismos aumentaron la exportación de nutrientes del sistema. En la actualidad, los nutrientes que más frecuentemente limitan la producción de cultivos son el nitrógeno (N), el fósforo (P) y el azufre (S). En el caso del N, las deficiencias se conocen desde hace décadas. Sin embargo, en el cultivo de cebada en la última década se hizo más frecuente la respuesta a la fertilización nitrogenada. Esto se debe, principalmente, a que los cultivos tienen mayores requerimientos de N debido al incremento en su potencial de rendimiento (Abeledo et al., 2003).

El uso de fertilizantes ha sido un factor decisivo para el aumento de la producción de cereales. Sin embargo, una proporción importante de los fertilizantes aplicados, especialmente los nitrogenados, no son aprovechados por los cultivos y se pierden del sistema. Estas pérdidas significan un perjuicio económico para los productores (Hirel et al., 2007) y además causan problemas en el medio ambiente. Entre ellos se destaca la contaminación de aguas subterráneas con nitrato (Rimski-Korsakov et al., 2004) y otros efectos sobre el aire y el agua superficial (Vitousek et al., 1997; Duarte et al., 2006). Por lo tanto, una de las metas más importantes del manejo de la nutrición mineral de los cultivos es compatibilizar la alta productividad y calidad de los granos con la preservación de los ecosistemas y la reducción de los costos de producción (Hirel et al., 2007).

1.2 Determinación del rendimiento y su relación con la nutrición nitrogenada

En cebada, como en otros cultivos de granos, el rendimiento se encuentra determinado principalmente por el número de granos por unidad de superficie (Baethgen et al., 1995; Prystupa et al., 2004). El número de granos está asociado a las condiciones ambientales durante un intervalo de tiempo denominado período crítico, el crecimiento en este período resulta crítico para la determinación del número de granos y por lo tanto del rendimiento, tanto en cebada (Baethgen et al., 1995; Prystupa et al., 2004), como en trigo (Savin & Slafer, 1991; Ehdaie & Wines, 2001). En el caso de cultivos de invierno dicho período se encuentra alrededor de antesis. En variedades de cebada cervecera de dos líneas (similares a las cultivadas en nuestro país), Arisnabarreta & Miralles (2008) observaron que el período crítico tiene lugar entre 40 y 10 días antes de espigazón. Considerando que en cebada la antesis ocurre simultáneamente con espigazón, el período crítico en este cultivo ocurriría un poco antes que en trigo. Previo a este estado, el crecimiento simultáneo de la espiga y los órganos vegetativos generan una fuerte competencia por fotoasimilados que disminuiría la supervivencia de las flores y, por lo tanto, el número de granos (Miralles et al., 1998). En trigo el rendimiento del cultivo está asociado positivamente a la biomasa total producida durante el ciclo (Dreccer et al., 2003), específicamente, la materia seca en espigas durante antesis está estrechamente relacionada con el número de granos por unidad de superficie, y por lo tanto el rendimiento, (Fischer, 1993; Demotes- Mainard et al., 1999). En cebada, además de la biomasa, el contenido de N en espigas durante el período espigazón-floración, se asocian significativamente al número de granos y, por lo tanto, al rendimiento (Bulman & Smith, 1993b; Baethgen et al., 1995; Prystupa et al., 2004). La biomasa acumulada del cultivo y en espigas es proporcional a la radiación interceptada acumulada durante el período de crecimiento (Demotes-Mainard et al., 1999; Abbate et al., 1997). Por lo tanto, los factores

que limiten el crecimiento dentro de este período afectarán significativamente el número de granos. La biomasa aérea a fin de macollaje está relacionada al número de macollos y, por lo tanto, al número de espigas por unidad de superficie, aunque en bajas densidades de macollos estos tienen un efecto compensatorio por alcanzar un mayor peso individual.

La disponibilidad de N afecta el crecimiento del cultivo previo y durante el período crítico de determinación del rendimiento. La aplicación de N incrementa el área foliar y aumenta la capacidad fotosintética de las hojas, llevando a un aumento de la radiación interceptada por el cultivo. Por lo tanto, un incremento en la disponibilidad de N en etapas tempranas del ciclo del cultivo genera un incremento de biomasa aérea que se traduce en mayor peso de espigas en antesis, fijando un mayor número de granos (Prystupa et al., 2004). La aplicación de N en etapas tempranas del cultivo, antes del inicio de la elongación del tallo, estimulan el macollaje y la expansión foliar, por lo que aumenta la fijación del número de granos debido a una mayor tasa de crecimiento en el período crítico (Hansen et al., 2002). La respuesta depende de las condiciones climáticas: en trigo, se observó que la respuesta del rendimiento a la fertilización nitrogenada está relacionada a las precipitaciones durante el ciclo de cultivo (Reussi Calvo et al., 2013). Además, la respuesta depende del requerimiento del cultivo relacionado al potencial de rendimiento para un determinado ambiente (Bell et al., 2013). Si la aplicación de N se realiza después de siembra se debe asegurar que a la siembra el cultivo cuente con una disponibilidad inicial de N adecuada.

1.3 Manejo de la disponibilidad de nitrógeno y calidad de grano

Durante los últimos 15 años, hubo un cambio en los cultivares de cebada cervecera utilizados en el país que llevaron a grandes aumentos del rendimiento, debido a su mejoramiento genético (Abeledo et al., 2003). El rendimiento promedio de los últimos 15 años fue un 40% superior a los diez años anteriores (Figura 1.2, MAGyP, 2019). Este aumento en el rendimiento fue acompañado por una disminución en el contenido de proteína en grano (Abeledo et al., 2008). Esto llevó a que la mayoría de las variedades actualmente empleadas en nuestro país presenten contenidos de proteínas excesivamente bajos, desde el punto de vista de las malterías (Matthiess et al., 2002; Michiels & Degenhart, 2004). Por otro lado, los cultivares actuales presentan mayor eficiencia de uso del N disponible para producir rendimiento en grano. Esta eficiencia está condicionada por la disponibilidad de N, tendiendo a disminuir cuando ésta se incrementa (Abeledo et al., 2008). Es por esto que el mejoramiento en cebada tiene que seguir dos objetivos principales: aumentar el rendimiento en grano, pero también mejorar la calidad comercial e industrial (Savin & Aguinaga, 2011).

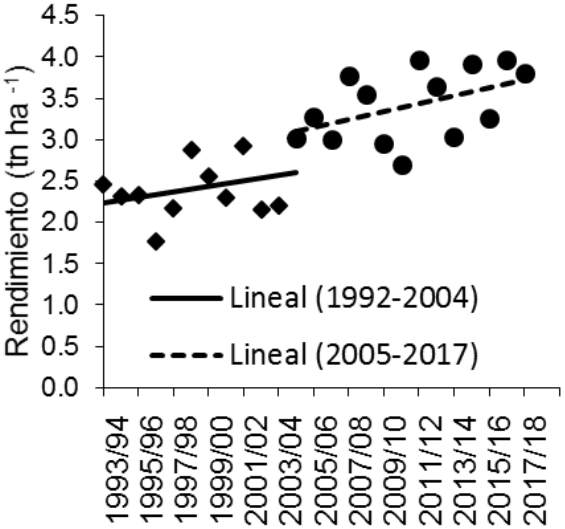


Figura 1.2: Rendimiento promedio nacional de cebada cervecera (MAGyP, 2019).

La industria maltera y cervecera impone diversos estándares de calidad que deben cumplir los granos para ser aceptados o al menos no penalizados. Entre estos, el calibre es un parámetro que determina la calidad industrial del grano siendo óptimo cuando predominan granos grandes (tamaño mayor a 2,5 mm), con una muy pequeña proporción de granos chicos (tamaño menor a 2.2 mm) (Briggs et al., 2004). Este parámetro es importante desde el punto de vista de la industria porque los granos de distinto tamaño se comportan de diferente manera en el proceso de malteado, siendo ideal para la industria lograr la mayor uniformidad posible. El poder germinativo es otro parámetro importante ya que las semillas deben germinar en el proceso y, por lo tanto, la industria maltera requiere que sea mayor al 95%. Dentro de los requisitos de calidad, el contenido proteico del grano es clave para la industria maltera, los valores deben estar comprendidos entre el 10 y 12%. Contenidos menores a 10% limitan el crecimiento de las levaduras encargadas de la fermentación durante el proceso de producción de cerveza y se relaciona con una menor cantidad de enzimas claves en el proceso de malteado. Contenidos proteicos mayores al 12% disminuyen el rendimiento de la malta en la cervecería (producen disminuciones en el "extracto de malta"), aumentan la "dureza de malta", dificultando el proceso industrial y además, generan problemas de turbidez en la cerveza (Briggs et al., 2004). La reducción del rendimiento de la malta se debe, en parte, a que las principales proteínas de almacenamiento del grano de cebada (hordeínas), que representan el 30-50% de la proteína total del grano (Jonassen et al., 1981; Kirkman et al., 1982), se asocian fuertemente con los gránulos de almidón inhibiendo su hidrólisis durante la maceración, primer paso en la fabricación de la cerveza (Slack et al., 1979).

Dado que el contenido proteico es un parámetro clave en la producción de cebada cervecera y puede ser modificado durante el ciclo del cultivo, mediante la aplicación complementaria de N, es necesario conocer los factores del cultivo y del ambiente que definen el contenido de proteína de los granos y condicionan la respuesta a la fertilización. El contenido proteico de los granos está relacionado a la cantidad de N que recibe el grano durante el período de llenado. El aporte de N al grano depende tanto de la cantidad de N absorbido después de antesis como de la cantidad de N removilizado que fue absorbido pre-antesis (Dupont & Altenbach, 2003). La removilización de N durante el llenado desde las hojas hacia los granos constituye un importante aporte de N al grano en crecimiento (Austin et al., 1977; Hirel, 2007; Bieker & Zentgraph, 2013). Trabajos previos mostraron que el aporte por removilización en cebada contribuye en alrededor de un 60% al N total en grano (Bulman & Smith, 1993), mientras que en trigo puede alcanzar alrededor de un 80% (Heitholt et al., 1990; Dalling et al., 1985; Habash et al., 2007). Se ha observado que la ERN está inversamente relacionada a la disponibilidad de N en el suelo y a la absorción en la etapa post-antesis, bajo situaciones de baja disponibilidad de N, la removilización desde las hojas es el principal determinante del contenido de N en grano (Gaju et al., 2014).

Una alternativa para aumentar la proteína en grano es aumentando la disponibilidad de N (vía fertilización) al comienzo del ciclo del cultivo (siembra-macollaje), que además incrementa el rendimiento. En experimentos en la región pampeana se observó que la disponibilidad de N necesaria para alcanzar los contenidos proteicos óptimos fue superior a la necesaria para maximizar el rendimiento (Prystupa et al., 2008), lo que lleva a que muchos planteos productivos produzcan granos de baja proteína. La principal limitación para calcular dosis de N requerida es que se debe estimar el rendimiento al comienzo del ciclo de cultivo,

ya que este depende de las condiciones ambientales, principalmente la disponibilidad hídrica en el período crítico (Prystupa et al., 2012). Debido a las dificultades en la estimación de la dosis optima de N, es muy alto el riesgo de obtener grano con bajo contenido de proteína, por una insuficiente provisión de N a la siembra. La mayor parte del N absorbido por el cultivo corresponde a la etapa pre-antesis (75 a 90%), que luego es removilizado hacia el grano durante el llenado. Sin embargo, bajo condiciones de alta disponibilidad en el suelo y adecuada humedad, la absorción post-antesis puede ser significativa. La absorción y asimilación de N en esta etapa puede ser incrementada con la fertilización nitrogenada, llegando a ser la principal fuente de N para los granos (Bulman & Smith, 1993a). Otra alternativa para aumentar el contenido de proteína es complementar la fertilización basal con aplicaciones foliares durante antesis-espigazón. Como esta aplicación se realiza cuando ya ha transcurrido una buena parte del ciclo del cultivo, se podría estimar el rendimiento y por lo tanto diagnosticar la necesidad de fertilizar con mayor precisión que al inicio. Si bien existe información acerca de la respuesta del cultivo a la aplicación foliar (Bulman & Smith 1993a; Ferraris et al., 2008) no existe información clara acerca de los factores de cultivo, suelo y ambiente que determinan la respuesta del cultivo a la aplicación foliar.

El diagnóstico del status nutricional del cultivo puede realizarse con mediciones directas como el crecimiento y el contenido de N en la planta. Uno de los parámetros que permite evaluar el estado nutricional del cultivo es el índice de nutrición nitrogenada, que relaciona ambas variables. Este índice, calculado como el cociente el contenido de N del cultivo el contenido N crítico, obtenido de una curva de referencia, para una biomasa dada, refleja el estado de nutrición de un cultivo (Lemaire et al., 1997). Para la determinación de este índice es necesaria una curva de referencia, que puede no ser representativa del cultivo, por lo que el cálculo del mismo puede ser erróneo.

Si bien el estado nutricional de los cultivos se puede determinar mediante cosecha y posterior medición del contenido de N, esta metodología a nivel productivo es lenta y costosa, por lo que las mediciones indirectas, mediante índices espectrales pueden brindar una solución práctica para determinar el estado nutricional del cultivo (Mistele & Schmidhalter, 2008). Además de ser más rápidas y económicas respecto a las mediciones directas sobre el cultivo, se ha observado que estas técnicas pueden estimar el estado nutricional con una alta precisión ya que se relacionan a variables de interés, como el rendimiento y la proteína del cultivo (Mistele & Schmidhalter, 2008). Muchos estudios sobre la respuesta del cultivo a la aplicación de N en antesis, o sobre el uso de índices de vegetación para la estimación del contenido de proteína de los granos a cosecha han tenido una aproximación empírica. Esto es, se mide la reflectancia del cultivo, se calculan diversos índices, y se explora la relación entre estos índices y la característica del cultivo que se desea predecir (e.g. proteína en grano). Sin embargo, a pesar de que se observaron relaciones significativas entre índices y variables agronómicas, en general, corresponden a pocos sitios, donde la principal fuente de variación son los niveles de N agregado. Cuando se intenta generalizar estas relaciones a nivel zonal, éstas son más débiles (menor correlación) y variables (i.e. el índice y la relación observada cambia en cada zona). Lo que se manifiesta como una necesidad de calibración local, puede deberse al desconocimiento de los factores de cultivo o del ambiente que afectan la relación estudiada. Varios trabajos sugieren que, en cereales, índices espectrales medidos en períodos cercanos a antesis tienen buena correlación con variables agronómicas de interés como el

rendimiento y la proteína (Hansen et al., 2002; Petterson et al., 2006, Söderström et al., 2010) y además permiten corregir las deficiencias nutricionales mediante aplicaciones complementarias de N.

A partir del conocimiento de los factores que definen el contenido proteico en el grano, una estrategia prometedora a largo plazo para mejorar este parámetro sin aumentar la fertilización sería, entonces, aumentar la eficiencia de la removilización (ERN), ya que este proceso constituye un aporte importante de N para el grano. Para lograr este objetivo es fundamental conocer la regulación de este proceso y los factores que lo influyen. Pese a la importancia del tema, es poco lo que se conoce sobre la regulación fisiológica, bioquímica y genética del proceso de removilización. Trabajos previos indican que la glutamina sintetasa (GS), principal enzima involucrada en la asimilación del N, jugaría un rol importante en la provisión de aminoácidos para el transporte del N (Tabuchi et al., 2005; Bernard & Habash, 2009, Caputo et al., 2009). Asimismo, para que el proceso de removilización tenga lugar durante el llenado de los granos, es necesario que se inicie al proceso de senescencia foliar, para proveer los aminoácidos que serán aportados al grano, a partir de la degradación de proteínas. Por lo tanto, el inicio de la senescencia y la velocidad con la que las proteínas se degradan es un paso fundamental en la removilización. La proteólisis asociada a la senescencia se retrasa cuando la disponibilidad de N es alta (Gan & Amasino, 1997; Masclaux-Daubresse et al., 2010), lo que contribuye a disminuir la eficiencia de la removilización. Finalmente, se ha observado que el mecanismo de cargado apoplástico del floema requiere de la participación de proteínas transportadoras de aminoácidos, (Kohl et al., 2012; Veliz 2017). Sin embargo, aún hoy poco se sabe acerca del efecto del agregado de N en etapas avanzadas del cultivo sobre la senescencia, removilización de N y cargado de aminoácidos al floema, así como su relación con el contenido proteico final en el grano. Este trabajo, entonces, aborda mediante estudios bioquímicos y moleculares, el impacto de la fertilización de N en antesis sobre estos procesos con el objetivo de avanzar en la comprensión de la regulación de la acumulación de N al grano.

1.4 Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es determinar el efecto de la disponibilidad de N (aplicación de N en antesis) sobre: i- la calidad de grano en cebada y ii- la regulación de la removilización de N de las hojas a los granos.

1.5 Objetivos específicos e hipótesis

-Determinar el efecto de la aplicación de N en antesis sobre la proteína y el calibre de los granos grano en cebada y la removilización de N al grano.

-Predecir la necesidad de fertilización complementaria mediante evaluaciones del estado nutricional del cultivo en antesis usando mediciones directas e indirectas (sensores remotos). Identificar variables de suelo o cultivo que puedan complementar los índices espectrales y permitan diagnosticar la necesidad de aplicación de N.

La **hipótesis** a poner a prueba relacionada con este objetivo específico es: La relación entre el estado nutricional del cultivo en antesis y el contenido de proteína en el grano a cosecha depende de la proporción de N del grano que proviene de la removilización, y de las condiciones ambientales durante el llenado de grano.

- Determinar el mecanismo por el cual el N aplicado en antesis es movilizado hacia el grano durante el llenado, su efecto sobre la regulación de la removilización de N de las hojas hacia los granos, y su relación con el contenido de proteínas establecido en los granos.

Las **hipótesis** a poner a prueba relacionada con este objetivo específico son:

a- La aplicación de N en antesis producirá un aumento en estadios tempranos del llenado de la movilización vía floema de N, en forma de aminoácidos, al grano, provenientes de la asimilación del N aplicado.

b- La asimilación del N incorporado en antesis producirá un retraso del inicio de la senescencia que redundará en un retraso del inicio de la removilización del N almacenado pre-antesis.

CAPÍTULO 2: EL ESTADO DEL CULTIVO EN ANTESIS Y LA FERTILIZACIÓN FOLIAR COMO DETERMINANTES DEL RENDIMIENTO Y LA PROTEÍNA

2.1 INTRODUCCIÓN

Para lograr un adecuado contenido de proteína en grano se debe lograr una adecuada disponibilidad de N para el cultivo en pre-antesis, ya que, en cereales, el N absorbido pre-antesis es el principal aporte de N para el grano (Austin et al., 1977; Malhi et al., 2006). Trabajos previos determinaron que la proteína en grano se asocia positivamente al N disponible para el cultivo, tanto en forma de nitrato (0-60 cm) como el agregado por fertilización, esta mayor disponibilidad de N también incrementa el rendimiento, relacionado negativamente con la proteína (Magliano et al., 2014). Por lo tanto, un cociente entre el N disponible (Nd) y el rendimiento (R) conocido como índice Nd/R, resultó ser un mejor estimador de la proteína en grano que el valor de N disponible (Prystupa et al., 2018). A partir de esta relación observada, se determinó que para alcanzar un contenido proteico entre el 10 y el 12% (óptimo para malterías) se debe disponer de entre 22 y 40 kg ha^{-1} de N disponible por Mg de rendimiento. Este modelo permite calcular los requerimientos de N del cultivo estimando el rendimiento antes de fertilizar (Prystupa et al., 2008).

El N acumulado en pre-antesis es removilizado hacia los granos durante el llenado, la magnitud del aporte por removilización es mayor que la absorción del suelo en este período (Heitholt et al., 1989). Por lo tanto, el contenido proteico de los granos estaría mayormente relacionado con la cantidad de N absorbido pre-antesis que es removilizado (Austin et al., 1977; Heitholt et al., 1990; Hirel, 2007). La eficiencia de removilización (ERN), que determina la proporción de N absorbido en biomasa en antesis que es destinado al grano, en trigo, es de alrededor de 70% (Kichey et al., 2007). Cuando la disponibilidad de N en el período post-antesis es baja, la ERN se vuelve esencial para el aporte de N a los granos (Dalling, 1985; Masclaux-Daubresse et al., 2010). Cuando la disponibilidad de N es alta, la eficiencia de removilización y la proporción de N en grano proveniente de la removilización disminuyen, tanto en cebada (Bulman & Smith, 1994) como en trigo (Papakosta & Gagianas, 1991; Cassman et al., 1992), y entonces, una cantidad significativa de N queda en el rastrojo (Dalling, 1985; Ercoli et al., 2008). A consecuencia de la disminución de la ERN, el índice de cosecha de N, que indica la partición del N absorbido total al grano, también disminuye con alta disponibilidad de N en el suelo en trigo (Ehdaie & Waines, 2001; Ercoli et al., 2008). El ICN es afectado, además, por aplicaciones tardías de N, ya que parte del N absorbido no se destina al grano (Heitholt et al., 1989). Otro aporte de N a los granos es el N absorbido en el llenado, su magnitud depende de la disponibilidad en el suelo (Cassman et al., 1992) y se observó que se relacionó a la demanda del cultivo determinada por el crecimiento post-antesis (Przulj & Momčilović, 2003). Además de la cantidad de N absorbido, se observó que el contenido de N en la biomasa en antesis, en trigo, está asociada a la proteína final (Sexton et al., 2006; Feng et al., 2008). Se puede esperar entonces que cuanto mayor sea la proporción del N en el grano que provenga de la removilización, más estrecha será la relación entre el status nitrogenado del cultivo en antesis, evaluado a través del contenido de N, y la proteína en grano.

Además de la nutrición nitrogenada del cultivo, en trabajos previos se observó que el contenido proteico en grano aumenta cuando el cultivo está expuesto a altas temperaturas durante el llenado del grano. Las altas temperaturas reducen el período de acumulación de carbohidratos en grano, mientras que no afecta el período de acumulación de N, que se da

previo a la acumulación de carbohidratos en cereales (Bhullar & Jenner, 1985; Savin & Nicolas, 1996), generando un incremento en el porcentaje de proteína.

Además de incrementar el rendimiento y la proteína, el aumento de la disponibilidad de N reduce el calibre del grano (Eagles et al., 1995). Este efecto se debe a que se forma una mayor cantidad de granos en los extremos de las espigas y en macollos los que en general son de menor tamaño que los granos de las posiciones centrales de la espiga. Además, se observó que aumento de la disponibilidad de N aumenta la sensibilidad al estrés por altas temperaturas, sobre el peso de grano en trigo (Elia et al., 2018). La disminución del peso del grano se debe a que altas temperaturas durante el llenado reducen la duración del período, principalmente por acelerar la senescencia del canopeo (Wardlaw et al., 1989; Slafer & Miralles, 1992) y a su vez afectan la síntesis del almidón (Jenner, 1994).

Una práctica para incrementar la proteína en el grano y, por lo tanto, la calidad maltera, es la aplicación foliar de N en antesis. Se observaron incrementos en la proteína en grano con aplicación foliar de N en períodos cercanos a antesis tanto en trigo (Woolfolk et al., 2002; Readman et al., 2002; Ma et al., 2006), como en cebada (Bulman & Smith, 1993b). En la Región Pampeana, en ensayos a campo sobre cultivos de cebada se ha observado que cada kilogramo de N por ha aplicado en este estado, aumenta el contenido proteico entre 0,028% (Prystupa et al., 2012) y un 0,0375% (Ferraris et al., 2008). Acerca de la efectividad de la aplicación foliar respecto a la aplicación en el suelo en etapas avanzadas del cultivo, la información es variable. Powlson et al., (1989), observaron que la aplicación de N tanto foliar como al suelo incrementan la proteína de manera similar. Por otro lado, Heitholt et al., (1990) observaron que el agregado de N al suelo en post-antesis aumenta la absorción total de N, pero no aumenta la proteína, por lo que la aplicación de N vía foliar resulta más conveniente. La información disponible acerca de la eficiencia de absorción para cebada a campo es escasa, los valores de absorción observados en otros estudios son muy variables. Powlson et al., (1989), en trigo a campo usando ^{15}N observaron altas eficiencias de absorción llegando hasta un 70% de absorción. Contrariamente, en trigo en cámara de cultivo, Rawluk et al., (2000) reportaron que la recuperación de N aplicado vía foliar resultó muy baja (como máximo 27% del N aplicado). Trabajos previos mostraron que el N absorbido vía foliar se destina en una alta proporción al grano (Powlson et al., 1989; Woolfolk et al., 2002). La información acerca del efecto de la aplicación foliar de N en etapas avanzadas del cultivo, sobre el rendimiento es variable. Trabajos realizados tanto en trigo (Heitholt et al., 1990; Ma et al., 2006) como en cebada (Bulman & Smith, 1993), observaron que no se incrementó el rendimiento. Sin embargo, en Argentina, se observó que aplicaciones foliares de N al momento de espigazón incrementan el rendimiento del trigo cuando el N disponible es bajo y cuando la provisión de N es suficiente, solo incrementan la proteína (Ferraris et al., 2011).

2.1.1 Objetivos específicos:

-Determinar el efecto de la aplicación de N en antesis sobre la proteína y el calibre de los granos grano en cebada y la removilización de N al grano.

-Predecir la necesidad de fertilización complementaria mediante evaluaciones del estado nutricional del cultivo en antesis usando mediciones directas. Identificar variables de

suelo o cultivo que puedan complementar los índices espectrales y permitan diagnosticar la necesidad de aplicación de N.

2.1.2 Hipótesis

La relación entre el estado nutricional del cultivo en antesis y el contenido de proteína en el grano a cosecha depende de la proporción de N del grano que proviene de la removilización y de las condiciones ambientales durante el llenado de grano.

La predicción de esta hipótesis es:

La relación entre el estado nutricional del cultivo en antesis y el contenido de proteína en el grano a cosecha será positiva y estrecha cuando el N removilizado sea la principal fuente de N para el grano.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron 39 experimentos a campo durante tres campañas (15 en 2014, 16 en 2015 y 8 en 2016), sobre cultivos comerciales de cebada cervecera ubicados en el centro-norte de la provincia de Buenos Aires (Figura 2.1). Se emplearon los cultivares comerciales usados por los productores. El diseño experimental fue en bloques completos aleatorizados, con 2 a 4 repeticiones. Las parcelas tuvieron una dimensión de 16 x 4 m.

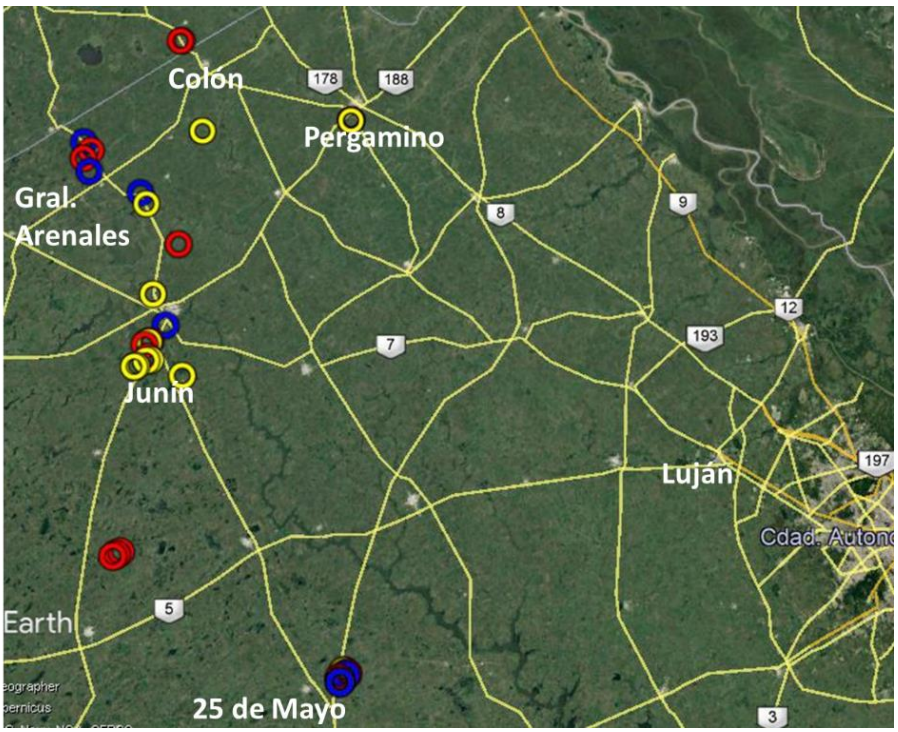


Figura 2.1: Ubicación geográfica de los sitios experimentales. Símbolos amarillos corresponden al año 2014, símbolos rojos al año 2015 y símbolos azules al año 2016.

Todos los experimentos tuvieron tres tratamientos:
- **Control**: Sin fertilización adicional a la empleada por el productor (Tecnología de Uso Actual).
- **N150**: Se aplicaron 150 kg ha^{-1} de N, en forma de urea granulada, en la etapa de emergencia. El fertilizante se aplicó en forma manual, distribuido uniformemente sobre la superficie.
- **N20f**: Se aplicaron 20 kg ha^{-1} de N en antesis en forma foliar, mediante una pulverizadora manual. Se usó como fuente el fertilizante comercial Foliarsol U (grado 20-0-0), se aplicó puro en una dosis de 100 l ha^{-1}. La dosis empleada corresponde a recomendaciones para trigo (Loewy, 2004), y empleada en trabajos anteriores en cebada (Prystupa et al., 2006).

Todos los tratamientos contaron con la fertilización realizada por el productor y recibieron el mismo manejo fitosanitario que el resto del lote. El momento de aplicación del N foliar coincide con lo descripto en una revisión bibliográfica de Gooding & Davies, (1992), quienes observaron que la máxima respuesta, en términos de incremento proteico, se logra cuando la aplicación foliar se realiza alrededor de antesis.

Al momento de instalar los ensayos, en la etapa de emergencia-inicio de macollaje, se tomaron muestras de suelo para su caracterización. Se muestreó en intervalos de 20 cm hasta los 60 cm de profundidad para determinaciones químicas y físicas, mientras que, para la determinación de humedad se muestreó hasta los 100 cm. El muestreo de suelos se realizó posteriormente a la fertilización por parte del productor (en algunos casos aplicó el fertilizante nitrogenado junto a la siembra, mientras que otros casos la aplicación fue realizada pocos días después).

En antesis se tomaron muestras de biomasa aérea, cosechando de 4 a 6 m lineales por parcela, dependiendo de la biomasa del cultivo. Se muestreó el suelo hasta los 60 cm para la determinación de nitrato y hasta los 100 cm para cuantificar la humedad. En madurez se tomaron muestras de biomasa aérea del cultivo, mediante cosecha manual de 4 m lineales por parcela, y de suelo hasta los 60 cm para la determinación de nitrato. En 4 de los sitios de la red no se realizó la cosecha de biomasa en antesis y en 7 de los sitios no se cosechó la biomasa final, ya que la cosecha de grano se realizó mediante cosechadora de parcelas.

Las temperaturas y precipitaciones durante el período de crecimiento del cultivo se obtuvieron de estaciones meteorológicas cercanas a los sitios experimentales. Se estableció la relación entre la temperatura y variables del cultivo. Para generar un índice que refleje la exposición del cultivo a altas temperaturas después de antesis, se calculó la suma térmica de temperaturas máximas en los primeros 30 días post-antesis, en forma similar a la metodología descripta en Pettersson et al., 2006. La sumatoria de temperatura se calculó de la siguiente manera:

$ST > T_0 = \Sigma\ Tmax - T_0$

Tmax: temperatura máxima diaria

T_0= temperatura mínima para la suma de tiempo térmico con altas temperaturas (en este trabajo se evaluaron temperaturas entre 18 y 30 °C).

A diferencia de Pettersson et al., 2006, donde el comienzo de la suma térmica se realizó en etapa de vaina engrosada y duró 3 semanas, en el presente trabajo, el inicio de la suma térmica comenzó en antesis y se consideró un período de 30 días.

Las muestras de suelo se secaron al aire y se tamizaron por 2 mm para las determinaciones de nitrato (0-20; 20-40; 40-60 cm) P extractable, pH y textura (0-20 cm) y por 0,5 mm para materia orgánica (0-20 cm). Se midió nitrato con el método Sneed, para lo cual se realizó la extracción con una solución de $CuSO_4$ 0,25% (Marbán & Ratto, 2005) y la determinación colorimétrica del nitrato extraído luego de reducirlo a nitrito usando hidrazina como agente reductor (Sawicki & Scaringelli, 1971). El P extractable se determinó con el método Bray I (Bray & Kurtz, 1945), el pH por método potenciométrico en agua (relación 1:2,5) (SAGPyA, SAMLA, 2004), la materia orgánica con el método de Walkley & Black, (1934) y la textura con el método de Bouyoucos (1962).

Las muestras de biomasa aérea tomadas en antesis se secaron en estufa a 70°C hasta peso constante y luego se pesaron para determinar el crecimiento pre-antesis (Crec. preant.) Posteriormente se molieron (<1 mm) y se midió el contenido de N por colorimetría en digestos Kjeldahl (Baethgen & Alley, 1989). Estas mediciones permitieron determinar el contenido de N en la biomasa aérea en antesis (Nantesis), y la cantidad de N absorbido en el período pre-antesis (Nabsant.).

Las muestras obtenidas en madurez fisiológica se secaron en estufa a 70ºC hasta peso constante para la determinación de biomasa aérea y se trillaron con una trilladora estacionaria. Se pesaron los granos para determinar el rendimiento y el rastrojo se calculó por diferencia entre la biomasa aérea y el peso de los granos. El rendimiento se expresó en base húmeda con 13% de humedad. Se determinaron los componentes numéricos del rendimiento; el peso individual de los granos se calculó como el peso promedio de 3 muestras de 100 granos por conteo manual y el número de granos se estimó con el rendimiento y el peso individual de los granos. En los granos se midió el calibre con una calibradora Sortimat K-3 (Pfeuffer), y se estableció como calibre el porcentaje (en peso) de granos de tamaño mayor a 2,5 mm. Se determinó el contenido de N en grano y en rastrojo por colorimetría en digestos Kjeldahl (Baethgen & Alley, 1989), para determinar el contenido de N en el grano (Ngrano) y en el rastrojo (Nrast). Se calculó la cantidad de N cosechado con el grano (Nabsgrano) y la cantidad de N remanente en el rastrojo (Nabsrast) a la madurez del cultivo, la cantidad de N absorbido en la biomasa aérea (Nabsfinal) se calculó como la suma de Nabsgrano + Nabsrast. El contenido de proteína en el grano se calculó multiplicando el contenido de N en el grano por 6,25.

Se calcularon la cantidad del N foliar que fue absorbido por el cultivo, la cantidad de N absorbido durante el llenado de los granos (Nabsllenado), y el índice de cosecha de N:
Nabsfoliar (kg ha^{-1}) = Nabsfinal (N20f) - Nabsfinal (Control)
Nabsllenado (kg ha^{-1}) = Nabsfinal – Nabsant.
Índice de cosecha de N (ICN) = Nabsgrano / Nabsfinal
En el tratamiento N20f, se calculó la cantidad de N absorbido durante el llenado proveniente del suelo como la diferencia entre el N absorbido durante el llenado y el N foliar absorbido.
Se calcularon la cantidad (Nrem.) y la eficiencia (ERN) con que el N absorbido pre-antesis fue removilizado al grano durante el llenado de los granos, y la contribución del N removilizado al N en los granos a cosecha (Nremgrano) de la siguiente manera:
Nrem. (kg ha^{-1}) = Nabsant. (kg ha^{-1}) – Nabsrast. (kg ha^{-1})
ERN (%) = [Nrem. / Nabsant.] x 100

ERN (%) N20f= [(N rem- Nabsfoliar)/Nabsant. Control] x 100
Nremgrano (% del Nabsgrano) = [Nrem. / Nabsgrano] x 100
Donde Nabsant. y Nabsrast. son la cantidad de N absorbido en la biomasa aérea en pre-antesis y en el rastrojo a madurez, respectivamente, y ERN es la eficiencia de removilización de N.

Para evaluar el grado de limitación por N en el tratamiento Control se ajustó una curva de dilución para el tratamiento N150 y se calcularon los índices de nutrición nitrogenada partir de las curvas de dilución (Lemaire et al., 1997). Además, se calculó la oferta total de N en post-antesis como la suma del N–NO_3 hasta 60 en antesis (NO_3 antesis) + la mineralización aparente post-antesis (Nmin.). La mineralización aparente post-antesis se calculó de la siguiente manera
Nmin.= N total final - N total antesis
N total antesis = Nabsant. + NO_3 antesis
N total final = Nabsrast. + Nabsgrano + NO_3 final

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza con el software Infostat. Se probaron los efectos de tratamiento, sitio y la interacción sitio x tratamiento, y se compararon los tratamientos usando el test de comparación de medias LSD Fisher al 5%. Las relaciones entre variables se analizaron mediante regresión, y se compararon tratamientos comparando las funciones ajustadas mediante un test de F, con el software Graph Pad Prism 6. Para los análisis donde se usaron funciones tipo lineal plateau, éstas se ajustaron con el software Table Curve Versión 5 y se graficaron en Graph Pad Prism 6. Se estableció un modelo de regresión múltiple para estimar la proteína, incluyendo variables de suelo y cultivo al inicio y en antesis. El análisis de regresión múltiple se realizó con el software Infostat y las variables incluidas en el modelo se seleccionaron mediante stepwise.

2.3 RESULTADOS

Los resultados de la caracterización de sitios y cultivos se muestran en el Cuadro 2.1. En el análisis inicial de los suelos se determinó que el contenido de materia orgánica (0-20 cm) tuvo un valor promedio de 2,26%, mientras que el 50% de los casos centrales se encontraron entre 1,77% y 2,61%, con mínimos 0,93% de y máximos de 4,19%. Para el caso del P extractable el valor promedio fue de 10,9 ppm, con una amplia variabilidad ya que los valores mínimos y máximos fueron de 2,2 y 32.9 respectivamente, mientras que la mitad de los casos se encontraron entre 6,7 y 12,2 ppm. Todos los cultivos recibieron fertilización fosforada por parte del productor, la dosis promedio aplicada fue de 21,2 kg ha^{-1}, en el 50% de los casos centrales la dosis estuvo entre 19,2 y 22, 2 kg ha^{-1}. El contenido de agua en el suelo al inicio de los ensayos fue variable, debido a diferencias en textura de los suelos y lluvias previas, en promedio los suelos tuvieron 255 mm, con valores mínimos y máximos de 131 y 357 mm, mientras que el 50% de los datos estuvo entre 196 y 286 mm. La disponibilidad inicial de N para el cultivo, considerando la fertilización realizada por el productor estuvo en promedio en 52,8 kg ha^{-1}, mientras se observó una amplia variabilidad ya que los valores variaron entre 21,1 y 110 y la mitad de los casos estuvieron comprendidos entre 41,8 y 59,9. Las texturas predominantes fueron Franco y Franco Arenosa y no se observaron valores extremos de acidez o alcalinidad. En antesis la disponibilidad de N-NO_3

fue de 20,6 y 32,5 kg ha^{-1} en los tratamientos Control y N150 respectivamente, mientras que el contenido de agua en el suelo hasta 100 cm en antesis, en promedio, fue de 221 mm.

Cuadro 2.1: Caracterización de los cultivos y sitios al inicio de los ensayos y en antesis.

					Inicio							Antesis		
S/Año	**Loc.**	**Ant.**	**Cv**	**F. S.**	**Text.**	**MO**	**pH**	**P ext.**	**P fert**	**N-N0$_3$**	**Hum.**	**N-N0$_3$**		**Hum.**
												Cont.	**N150.**	
						%		**ppm**	**kg ha^{-1}**		**mm**	**kg ha^{-1}**		**mm**
1/2014	25 M.	S	S	16-5	AF	1,70	5,5	18,8	19,8	29,2	196	14,7	22,0	158
2/2014	25 M.	T/S	S	17-5	AF	1,70	5,4	11,3	19,8	58,9	197	34,1	25,0	154
3/2014	25 M.	C/S	S	18-5	AF	1,84	5,6	7,0	15,8	46,5	177	44,3	46,0	144
4/2014	25 M.	G	S	19-5	AF	2,21	6,0	6,2	29,0	40,2	196	44,6	37,0	153
5/2014	F.T.	C/S	A	20-5	FA	2,37	5,7	6,7	19,3	59,1	267	36,5	65,3	182
6/2014	Baig.	T/S	A	21-5	F	2,61	5,7	10,4	18,8	43,6	269	24,4	13,9	192
7/2014	Baig.	S	S	22-5	FA	2,83	5,7	12,1	18,8	45,5	247	7,7	21,8	142
8/2014	Baig.	S	A	23-5	F	2,60	5,9	16,5	20,2	30,5	357	8,0	22,1	289
9/2014	Baig.	C/S	S	24-5	F	2,75	5,9	3,7	20,2	44,0	357	10,0	13,2	351
10/2014	Baig.	C/S	S	25-5	FA	2,54	5,9	7,3	31,4	53,3	286	14,8	67,2	278
11/2014	G. U.	S	J	26-5	FA	2,16	5,4	18,3	26,6	21,1	207	15,5	42,1	191
12/2014	Morse	S	S	27-5	F	2,77	5,9	4,1	5,00	24,8	241	27,8	75,4	120
13/2014	Junín	S	S	28-5	FA	1,63	5,7	9,8	29,0	33,8	187	28,0	83,7	169
14/2014	Ferre	S	Sc	29-5	F	2,81	7,2	11,8	20,2	63,4	sd	33,9	93,2	sd
15/2014	Perg.	S	A	30-5	FL	2,41	5,7	7,8	20,2	58,8	sd	61,0	75,1	sd
16/2015	25 M.	S	A	31-5	FA	1,69	5,8	16,5	19,2	31,6	184	10,2	33,4	135
17/2015	25 M.	S	A	1-6	FA	0,93	5,8	32,9	19,2	22,1	131	12,1	14,4	111
18/2015	25 M.	G	A	2-6	FA	2,57	6,1	5,1	16,2	47,7	281	12,2	20,7	337
19/2015	25 M.	S	A	3-6	FA	1,76	5,8	4,7	16,2	38,5	268	19,6	10,3	334
20/2015	9 J.	S	E	4-6	F	2,43	6,1	4,1	20,7	47,9	328	13,5	25,3	267
21/2015	9 J.	S	E	5-6	F	4,19	6,3	6,2	20,7	46,8	351	15,1	23,3	250
22/2015	9 J.	S	E	6-6	F	2,47	6,1	2,2	20,7	42,9	326	13,8	29,7	290
23/2015	Agus.	S	T	7-6	FL	2,28	6,0	10,5	12,3	57,5	207	15,7	14,8	296
24/2015	Arrib.	S	A	8-6	F	2,01	5,7	7,4	22,2	66,7	285	15,9	22,8	296
25/2015	Arrib.	S	A	9-6	F	2,86	5,6	11,9	22,2	75,1	339	10,2	12,5	315
26/2015	Baig.	S	A	10-6	FA	2,59	6,0	7,0	sd	58,4	321	24,1	13,2	285
27/2015	Baig.	S	A	11-6	FA	2,70	5,8	6,8	sd	59,9	279	16,8	22,5	244
28/2015	Baig.	T	A	12-6	F	2,97	5,9	11,0	sd	57,9	283	14,2	15,5	297
29/2015	Perg.	S	E	13-6	FL	2,26	5,7	7,8	20,2	72,9	sd	sd	sd	sd
30/2015	Wh.	S	A	14-6	F	2,83	5,9	12,2	22,2	90,4	sd	22,4	14,6	sd
31/2015	Wh.	S	A	15-6	F	2,45	6,1	8,7	22,2	78,5	sd	19,2	30,4	sd
32/2016	25 M.	G	A	16-6	AF	1,59	5,7	14,9	19,2	41,8	187	17,3	14,8	103
33/2016	25 M.	S	A	17-6	AF	1,03	5,8	12,7	32,0	45,1	179	13,3	20,1	101
34/2016	Arrib.	S	A	18-6	FL	2,10	5,9	15,0	32,0	77,7	276	18,4	14,6	205
35/2016	Arrib.	S	A	19-6	FL	1,77	5,6	9,5	24,6	75,3	240	14,1	25,3	158
36/2016	Junín	S	A	20-6	FA	0,97	5,9	11,9	24,6	56,9	191	32,9	76,3	211
37/2016	Asc.	S	A	21-6	F	2.12	6,0	31,8	20,2	110	332	17,0	25,5	332
38/2016	Perg.	S	T	22-6	FL	2,41	5,7	7,8	24,3	sd	sd	11,7	22,2	sd
39/2016	Wh.	S	A	23-6	F	2,45	5,9	12,2	20,2	sd	sd	17,7	31,5	sd

S: Sitio; **Loc**: Localidad (25 M.: 25 de Mayo, F.T.: Fortín Tiburcio, Baig.: Baigorrita, G.U.: Gdor. Ugarte, Perg.: Pergamino, 9 J.: 9 de Julio, Wh.: Wheelwright, Asc.: Ascensión) (**Ant**.: Antecesor: (S: soja, T: trigo, G: girasol C: cebada); **F.S.**: Fecha de Siembra. **Cv**: cultivar: (A: Andreia, S: Shakira T: Traveller E: Explorer Sc: Scarlett J: Jenifer), **Text**.: Textura: (F franco, AF areno franco, FL: franco limoso, FA: franco arenoso.), **MO**.: Materia Orgánica 0-20 cm.; **P ext**.: P extractable 0-20 cm.; **P fert.**: P agregado por el productor, **N-NO$_3$**: Nitrato 0-60 cm (incluye el N agregado por productor). **Hum**.: Humedad 0-100 cm.; sd: sin determinar.

2.3.1 Crecimiento del cultivo, rendimiento y sus componentes

El tratamiento Control tuvo un rendimiento medio de 5303 kg ha^{-1}, con un amplio rango de valores observados (entre 2105 y 7640 kg ha^{-1}). El 50% de los rendimientos del Control se encontraron en el rango entre 3365 y 5596 kg ha^{-1} (Cuadro 2.2). La variabilidad observada refleja el amplio rango de condiciones de crecimiento atribuidas a las distintas condiciones climáticas y edáficas de los sitios y a los distintos manejos de los cultivos. Entre las variables de sitio analizadas, el rendimiento del tratamiento Control se relacionó a la humedad del suelo (0-100cm) al inicio (R^2 = 0,31) y, en segundo lugar, a la disponibilidad inicial de N-NO_3 (R^2 = 0,26). Un modelo con ambas variables mejoró la estimación del rendimiento del tratamiento Control (Rend. = 35,46 +47,79* N-NO_3 inicial + 11,72*Humedad inicial; R^2 = 0,49, n = 37). Las demás variables analizadas (precipitaciones durante el ciclo, humedad inicial, humedad en antesis, suma térmica, P disponible, pH y materia orgánica) no fueron retenidas en el modelo.

La disponibilidad de N en el tratamiento Control limitó el rendimiento de los cultivos, en 23 de los 39 sitios tuvo un rendimiento inferior al 90% del rendimiento del tratamiento N150 (Figura 2.2), por lo que en el 59% de los casos, la fertilización aplicada por el productor resultó insuficiente. El rango de limitación al crecimiento por efecto de la disponibilidad de N en el tratamiento Control, representativo de las condiciones de crecimiento del cultivo con el manejo realizado por el productor, fue amplio y dependió del sitio. En el momento de antesis, en el 72% de los sitios (25 sitios) se observó un crecimiento relativo del Control menor al 90%, respecto al tratamiento N150 (Figura 2.2). En promedio, el crecimiento post-antesis se redujo un 13,5% en el tratamiento Control respecto al tratamiento N150. La biomasa final se redujo en el 68 % de los casos, en 22 de 32 sitios fue inferior al 90% respecto al N150 (Figura 2.2). El rendimiento relativo del tratamiento Control, respecto a N150 se asoció, en primer lugar, la disponibilidad de N-NO_3 al inicio y en segundo lugar la disponibilidad de N-NO_3 en antesis (RR = 0,01*Ninic + 0,0048*Nant; R^2 = 0,32; n = 35). Las demás variables analizadas (precipitaciones durante el ciclo, humedad inicial, humedad en antesis, suma térmica, P disponible, pH y materia orgánica) no fueron retenidas en el modelo.

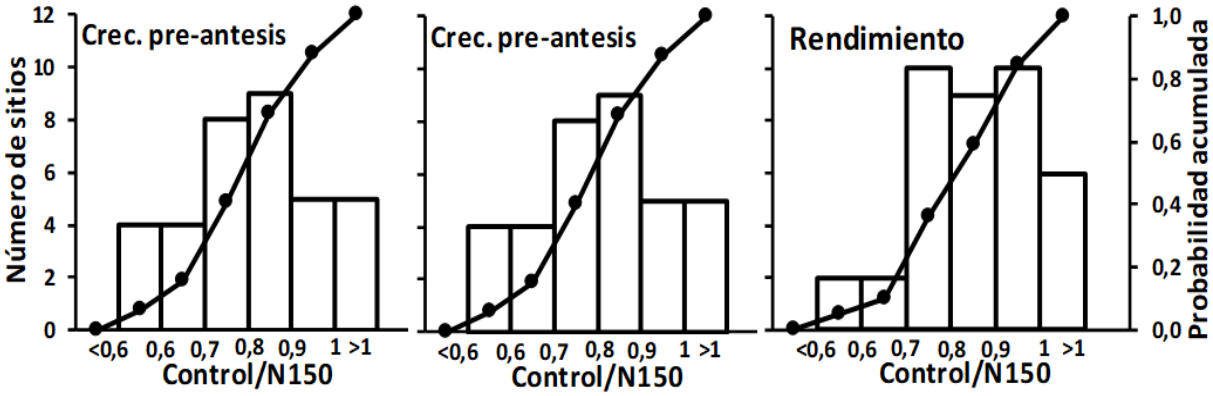


Figura 2.2: Probabilidad y probabilidad acumulada para las variables crecimiento pre-antesis, biomasa final y rendimiento del tratamiento Control, relativo al tratamiento N150.

La variación en rendimiento se relacionó con la variación del crecimiento pre-antesis (Figura 2.3a), la pendiente de la función fue común entre los tratamientos Control y N150 por lo esta relación no fue afectada por la fertilización nitrogenada. Los residuales de la regresión entre el rendimiento o y el crecimiento pre-antesis se asociaron al crecimiento post-antesis, por lo que se generó un modelo de regresión múltiple para integrar ambas variables (Rendimiento (kg ha^{-1}) = 0,00664*Crec pre-ant + 0,00657*Crec post-ant; R^2 = 0,93 n= 102). Variables de sitio (P disponible, materia orgánica, pH, precipitaciones y suma térmica no fueron retenidas en el modelo.

Cuadro 2.2: Medias de los tratamientos y cuartiles 25 y 75 para las variables relacionadas al crecimiento del cultivo, rendimiento, componentes del rendimiento y ANOVA (valores de *p* de los factores Sitio, Tratamiento y su interacción). Letras diferentes junto a las medias indican diferencias significativas entre tratamientos (*p*<0,05, LSD).

	Medias de tratamientos					**ANOVA**		
	Control	**N20f**	**N150**	**Q 25**	**Q 75**	**Sitio**	**Trat.**	**SxT**
Crec. preant. (g m^{-2}):	500 a		620 b	422,1	661,3	<0,01	<0,01	<0,01
Crec. postant. (g m^{-2}):	464 a	499 ab	536 b	345	677	<0,01	<0,01	0,19
Crec. postant./total (%):	47,0	48,3	46,1	39,8	55.3	<0,01	0,55	0,06
Biomasa final (g m^{-2}):	957,8 a	997,5 a	1135 b	819,7	1275	<0,01	<0,01	<0,01
Rendimiento* (kg ha^{-1})	5303 a	5618 b	6205 c	3796	6173	<0,01	<0,01	<0,01
Numero granos (m^{-2})	11337 a	11785 a	13797 b	10356	14829	<0,01	<0,01	<0,01
Peso de grano (mg)	40,6 b	41,2 b	39,2 a	37,4	43,3	<0,01	<0,01	<0,01
Calibre (% >2,5mm)	86,2 b	84,2 b	79,5 a	80,0	94,1	<0,01	<0,01	<0,01
Índice de cosecha	0,50 b	0,49 b	0,47 a	0,46	0,52	<0,01	<0,01	0,17

*Expresado en base húmeda

El rendimiento se asoció débilmente al peso de granos (Figura 2.3d). El Control presentó un peso de grano ligeramente mayor que el tratamiento N150 (3,5% mayor en promedio), ambos componentes del rendimiento no estuvieron relacionados entre sí. La relación entre el peso de grano y el rendimiento varió con el tratamiento. Si bien las pendientes de esta relación para los tres tratamientos no fueron distintas, el tratamiento N150 presentó una ordenada al origen mayor a los tratamientos Control y N20f (Figura 2.3d). El índice de cosecha de biomasa varió con el tratamiento, en promedio, en el Control fue 6% mayor que para N150, mientras que la fertilización foliar no afectó esta variable, el efecto del tratamiento fue independiente del sitio (Cuadro 2.2).

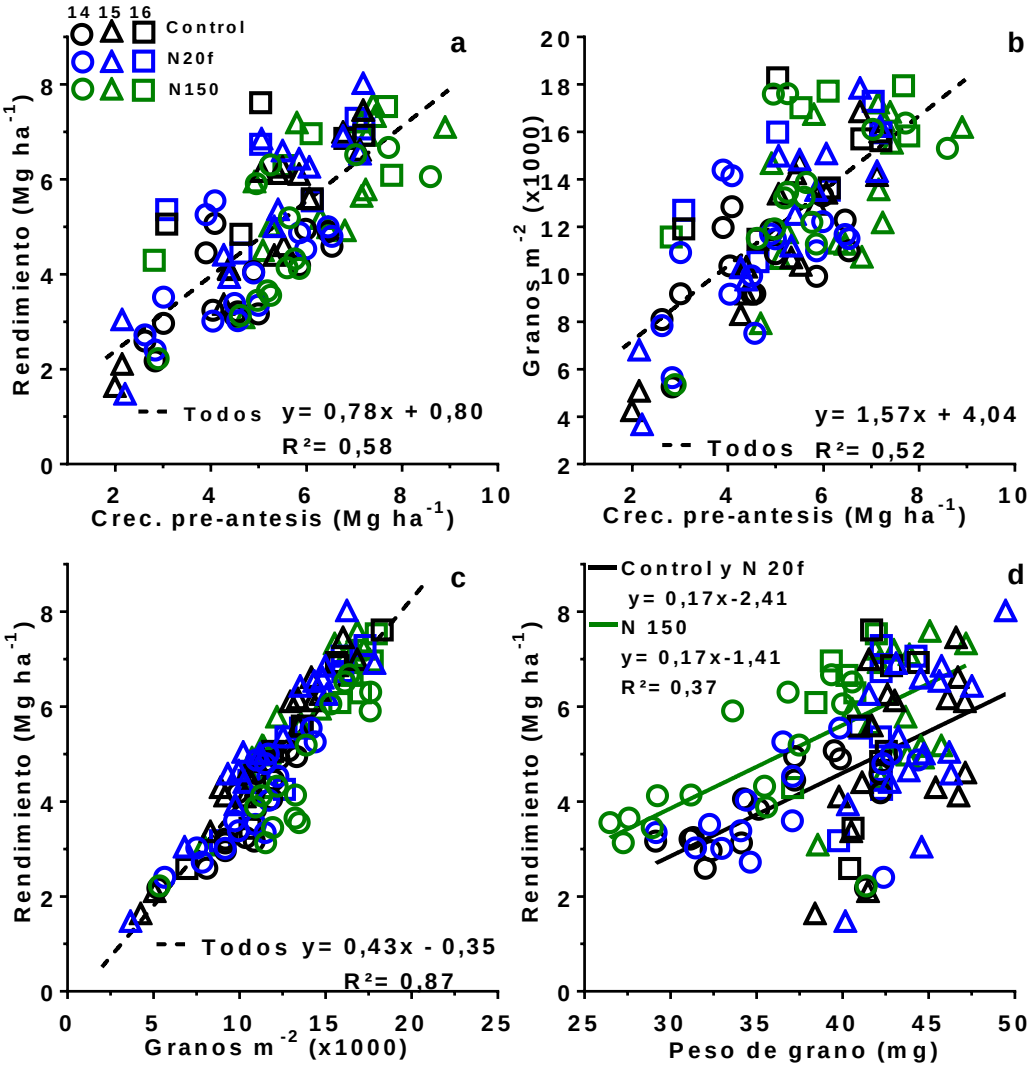


Figura 2.3: Relación entre el rendimiento y el crecimiento pre-antesis (a). Relación entre el número de granos y el crecimiento pre-antesis (b). Relación entre el rendimiento y el número de granos (c) Relación entre el rendimiento y el peso del grano (d).

El efecto de la aplicación foliar de 20 kg de N ha^{-1} en antesis sobre el rendimiento dependió del sitio. El rendimiento aumentó significativamente respecto al Control sólo en el 12% de los casos (5 sitios). Este aumento del rendimiento, en promedio de los sitios donde la respuesta resultó significativa, fue de 775 kg ha^{-1}. La aplicación foliar aumentó la biomasa en uno de los sitios y no fue diferente del Control a nivel general (Cuadro 2.2).

El calibre, una de las variables clave de calidad del grano, fue afectado por el agregado de N en emergencia. En los tratamientos Control y N20f, el 28% de los sitios (11 de los 39 sitios) no alcanzaron el mínimo requerido por la industria (85%), mientras que en el tratamiento N150, el 43% de los sitios (17 sitios) no llegó a dicho porcentaje. A nivel general, en el tratamiento N150, el calibre se redujo 7,8% respecto al Control mientras que la fertilización en antesis no lo afectó (Cuadro 2.2). El calibre se relacionó al peso de grano

ajustándose a una relación lineal-plateau sin diferencia entre tratamientos (Figura 2.4). El plateau se alcanzó con un peso de 42,9 mg correspondientes a un calibre de 92,6%.

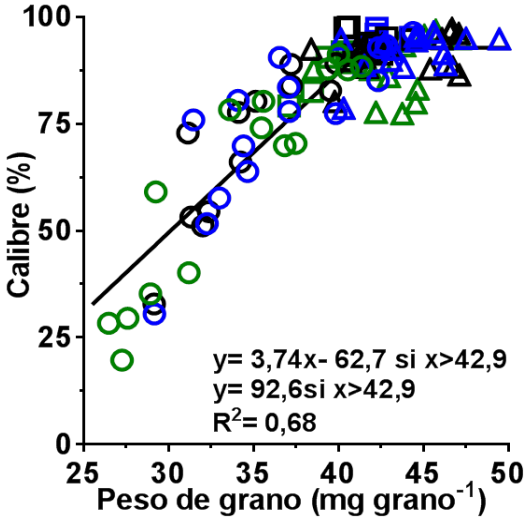


Figura 2.4: Calibre en función del peso de grano

El calibre y el peso de los granos se relacionaron negativamente a la temperatura en los primeros 30 días de llenado (Figuras 2.5a y 2.5b). La suma térmica con una temperatura mínima para el cálculo del índice de estrés térmico de 27°C fue la que se relacionó con un mayor ajuste a ambas variables. La relación con la suma térmica, evaluada a través de las pendientes de las funciones, fue similar entre los tratamientos. La función que mejor se ajustó a los datos fue la lineal-plateau. Para el caso del peso de grano, cuando la suma térmica superior a 27°C es inferior a 25°C día no es afectado, el plateau se alcanzó con un peso de 43, 25 mg. El calibre fue afectado por sumas térmicas superiores a 41,7 °C día, el calibre correspondiente al plateau fue de 91,4%.

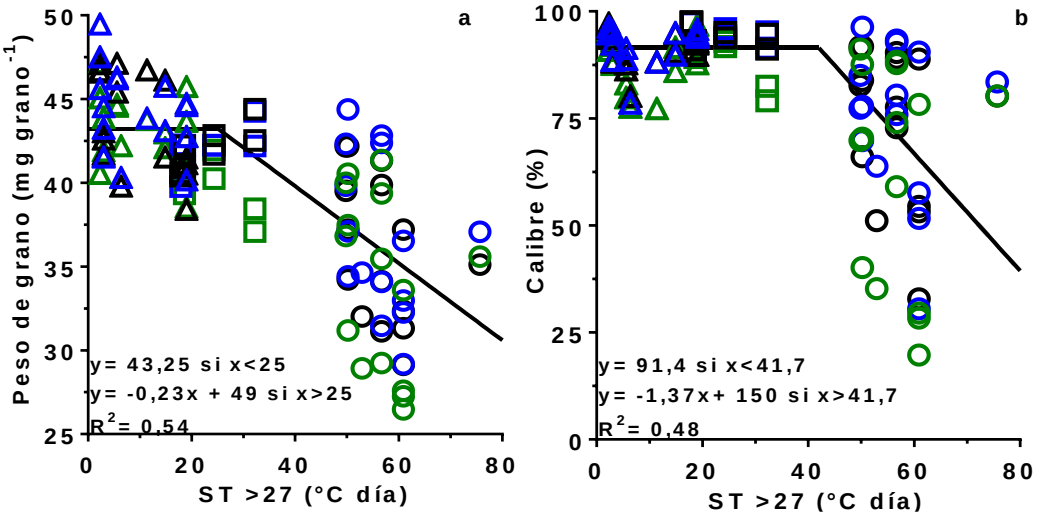


Figura 2.5: Efecto de la suma térmica durante los primeros 30 días del llenado de los granos sobre el peso (a) y el calibre (b) de los granos. ST: suma de las temperaturas máximas diarias usando 27ºC como temperatura mínima para el cálculo del índice de estrés térmico.

2.3.2 Absorción y partición del N en el cultivo

El N absorbido pre-antesis se relacionó a la disponibilidad de N en el suelo (0-60 cm) en la etapa de emergencia (Figura 2.6a). Por lo tanto, el tratamiento Control absorbió menos N en pre-antesis que el tratamiento N150 en prácticamente todos los sitios, con una diferencia entre tratamientos que dependió del sitio (Cuadro 2.3). En el 92% de los sitios (33 de 35 sitios), la absorción de N del Control al momento de antesis resultó inferior al 90% respecto al tratamiento N150. En promedio, el N absorbido pre-antesis fue 40,8% menor en el Control respecto al tratamiento N150 (Cuadro 2.3). La relación entre el N absorbido pre-antesis respecto al N disponible al inicio fue afectada negativamente por la disponibilidad de N (Figura 2.6b). Además, de la menor absorción pre-antesis, el tratamiento Control absorbió durante el período post-antesis un 19,7% menos N que el tratamiento N150.

Cuadro 2.3: Resumen de las variables relacionadas a la absorción y partición de N. Letras diferentes junto a las medias indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD Fischer; *p*<0,05).

	Medias de tratamientos					**ANOVA**		
	Control	**N20f**	**N150**	**Q 25**	**Q 75**	**Sitio**	**Trat.**	**SxT**
Nabsant. (kg ha^{-1})	56,9 a		93,3 b	47,9	90,2	<0,01	<0,01	<0,01
Nabsllenado (kg ha^{-1})	23,6 a	32,3 b	30,5b	18.49	47.12	<0,01	0,01	0,56
Nabsfinal (kg ha^{-1})	80,5 a	89,2 b	123.8 c	73,4	120,8	<0,01	<0,01	0,10
Nabsgrano (kg ha^{-1})	64,1 a	71,5 b	91,5 c	54,6	92,1	<0,01	<0,01	<0,01
Nabsrast. (kg ha^{-1})	16,4 a	17,7 a	32,3 b	13,6	28,0	<0,01	<0,01	<0,01
Nrem. (kg ha^{-1})	40,9 a	49,3 b	61,9 c	32,4	62,4	<0,01	<0,01	<0,01
ICN	0,79 b	0,80 b	0,73 a	0,72	0,83	<0,01	<0,01	0,17
Ef. Fisiologia (kg ha^{-1})	68,6 c	62,2 b	51,2 a	52,0	69,9	<0,01	<0,01	<0,01
Nantesis (mg g^{-1} de N)	11,4 a		16,1 b	10,7	14,5	<0,01	<0,01	<0,01
Proteína (%)	8,4 a	9,07 b	10,5 c	8,12	10,3	<0,01	<0,01	<0,01
Nrast. (mg g^{-1} de N):	3,38 a	3,66 a	5.94 b	2,95	5,27	<0,01	<0,01	<0,01
Nabs Foliar (kg ha^{-1})	-	9,3	-	4,56	14,09	-	-	-
ERN (%):	71,8 b	72,0 b	66,5 a	58,4	76,8	<0,01	<0,01	<0,01
Nremgrano (%):	64,5	68,2	69,5	47,1	83,2	<0,01	0,35	0,11

Nabsant. (kg ha^{-1}): Cantidad de N absorbido pre-antesis (en la biomasa aérea)
Nabsllenado (kg ha^{-1}): Cantidad de N absorbido en la etapa de llenado
Nabsfinal (kg ha^{-1}): Cantidad de N absorbido en biomasa a cosecha final
Nabsgrano (kg ha^{-1}): Cantidad de N en grano a cosecha
Nabsrast. (kg ha^{-1}): Cantidad de N en rastrojo
Nrem. (kg ha^{-1}): Cantidad de N absorbido pre-antesis que fue removilizado a los granos post-antesis
Nantesis (mg g^{-1} de N): Contenido de N en la biomasa aérea en antesis
Nrast. (mg g^{-1} de N): Contenido de N en el rastrojo
ERN (%): Porcentaje del N absorbido pre-antesis que fue removilizado a los granos post-antesis
Nremgrano (%): Porcentaje del N en el grano proveniente de removilización
Nabs Foliar (kg ha^{-1}): N absorbido en biomasa proveniente de la aplicación foliar

A cosecha final, en promedio, la disminución fue de 43,3 kg ha^{-1} de N absorbido total, representando una disminución del 35%. La cantidad de N cosechado en grano en el tratamiento Control fue, en promedio, un 30% menor respecto al tratamiento N150 (una disminución de 27,4 kg ha^{-1}) y la cantidad de un N remanente en el rastrojo 50% menor (una

disminución de 15.9 kg de N ha^{-1}). La proteína en grano en el tratamiento Control fue 20% (2,1 puntos porcentuales) inferior respecto al tratamiento N150, mientras que el contenido de N en rastrojo fue un 43% inferior respecto al tratamiento N150.

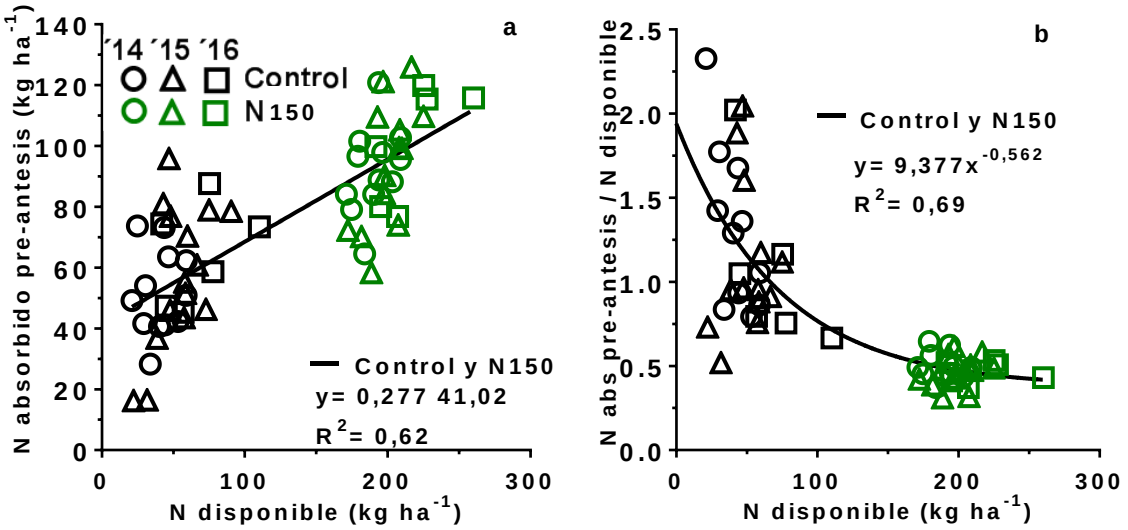


Figura 2.6: Relación entre el N absorbido pre-antesis y el N disponible en el suelo en emergencia (a). Proporción de N absorbido pre-antesis respecto al N disponible en función del N disponible (b). N disponible: Control: N suelo 0-60 cm; N150: N suelo 0-60 cm + 150kg ha^{-1}

El rendimiento se relacionó al N absorbido pre-antesis, la eficiencia fisiológica media fue de 57,9 kg grano kgN^{-1}, mientras que las eficiencias máximas y mínimas fueron de 78,9 y 37,2 kg grano kgN^{-1} respectivamente (Figura 2.7). La eficiencia fisiológica fue afectada por los tratamientos, siendo mayor en el tratamiento Control, seguido por N20f y fue menor en el tratamiento N150 (Cuadro 2.3).

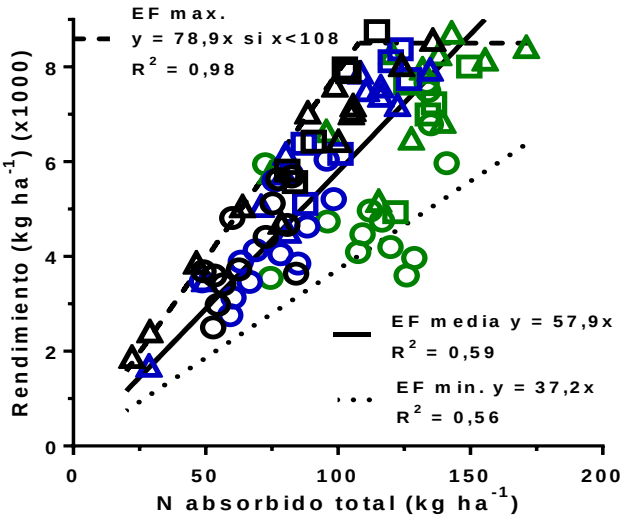


Figura 2.7: Relación entre el rendimiento y el N absorbido pre-antesis. La línea llena representa la eficiencia fisiológica media para todos los tratamientos, la línea discontinua indica la eficiencia fisiológica máxima (5% mayor), donde el plateau de rendimiento fue calculado con los 5% de los rendimientos más altos, la línea punteada indica la eficiencia fisiológica mínima (5 % inferiores).

El N absorbido pre-antesis fue el principal determinante del N absorbido total tanto en grano como en biomasa a madurez (Figuras 2.8a y 2.8b). En ambos casos las relaciones resultaron lineales y no fueron afectadas por los tratamientos.

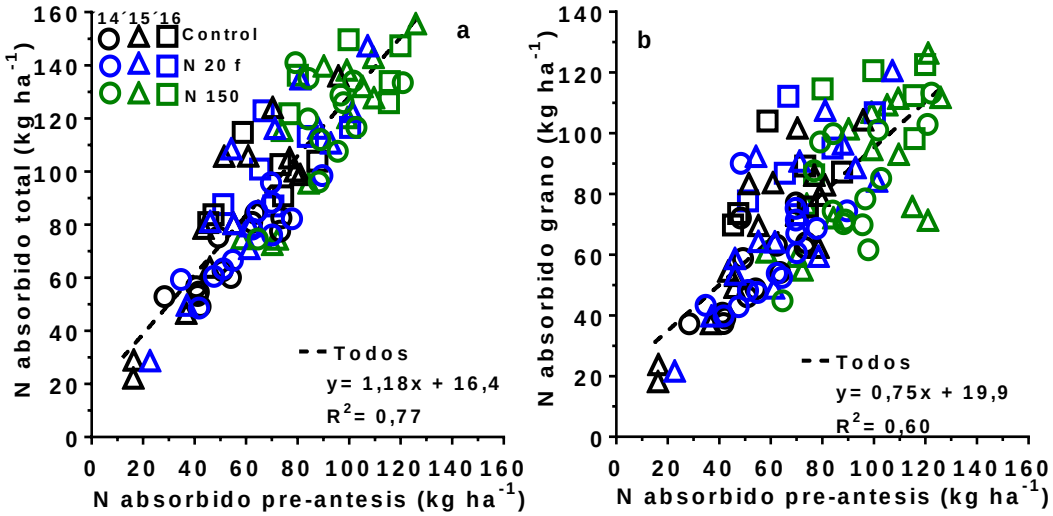


Figura 2.8: Relación entre el N absorbido total y el N absorbido pre-antesis (a). Relación entre el N absorbido en grano y el N absorbido pre-antesis (b).

La aplicación foliar de N en antesis incrementó el N absorbido total en 9,3 kg ha^{-1}, en el promedio de todos los sitios, sin diferencias entre sitios (Cuadro 2.3), por lo que la eficiencia de absorción fue del 46.5 % del N aplicado. Del N absorbido, se particionaron 7,5 kg al grano, lo que representó el 37% del N aplicado y el 82% del N absorbido. La aplicación foliar de N no afectó el contenido ni la cantidad de N en el rastrojo (Cuadro 2.3).

El contenido de N en planta en antesis se relacionó al crecimiento pre-antesis mediante una curva de dilución (Figura 2.9a). La función obtenida en base al tratamiento N150 resultó inferior, en todo el rango de biomasa considerado, a curvas de dilución crítica para cultivos de cebada previamente reportadas (Justes et al., 1994 y Zhao, 2014). Se identificaron los sitios donde el crecimiento pre-antesis no fue limitado por la disponibilidad de N (i.e. Control/N150 > 0,9, puntos llenos en la Figura 2,9). Se ajustó, además, otra curva de dilución con el 50% de los sitios de menor contenido de N en el tratamiento N150. Los índices de nutrición nitrogenada (INN) calculados a partir de las curvas, se asociaron al rendimiento relativo del tratamiento Control, la relación fue similar entre el índice calculado con la curva ajustada a todos los cultivos y el calculado con la curva ajustada a la mitad de los cultivos de menor contenido de N (N150 50%; Figuras 2.9b y 2.9c). Los INN calculados con las curvas de Justes et al., 1994 y Zhao, 2014, presentaron un ajuste levemente inferior respecto al rendimiento relativo (R^2= 0,52; Datos no mostrados).

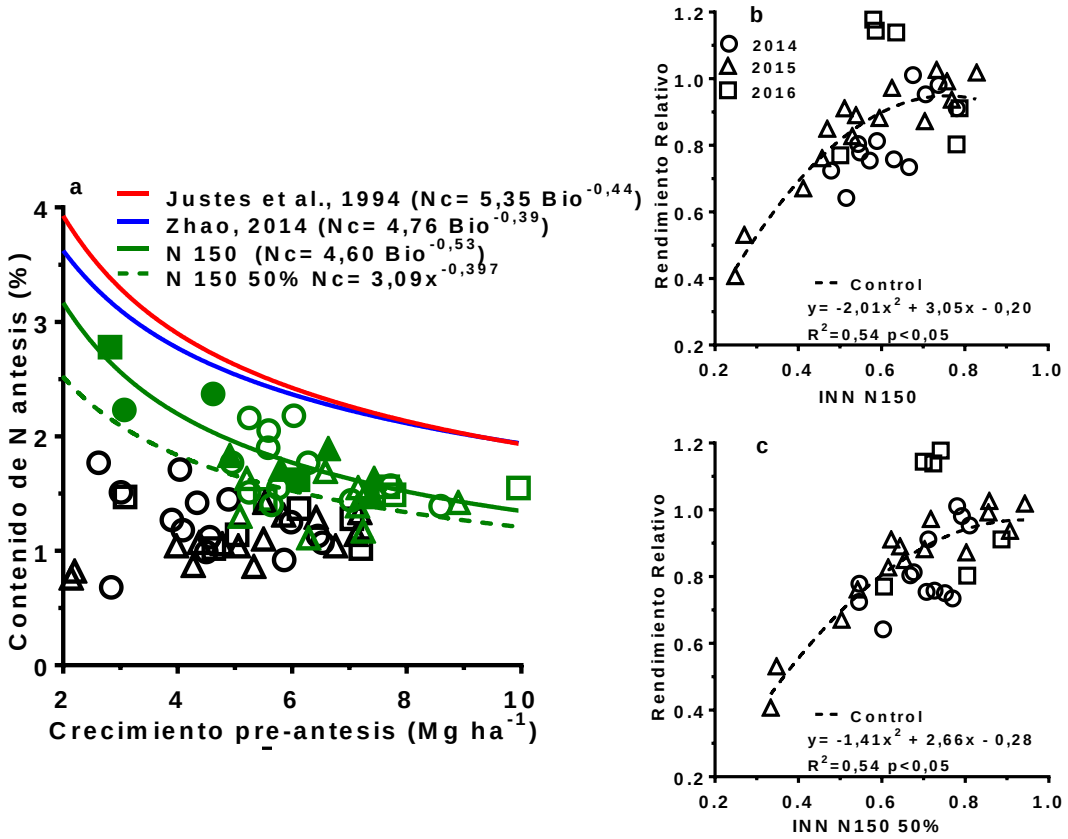


Figura 2.9: Curvas de dilución ajustada al tratamiento N150, la línea punteada (N150 50%) corresponde al 50 % de los datos que estuvieron por debajo de la línea ajustada al tratamiento N150. y curvas de referencia de Justes et al., 1994 y Zhao, 2014. Los símbolos llenos corresponden a los sitios donde el crecimiento pre-antesis del control fue mayor al 90% del tratamiento N150 (a). Relación entre el rendimiento relativo y el INN calculado con las curvas del tratamiento N150 (b), y la curva 50% inferior (c).

2.3.3 Absorción y removilización de N post-antesis

La cantidad de N removilizado en el período post-antesis dependió de la cantidad de N acumulado pre-antesis (Figura 2.10a). Las pendientes de las funciones ajustadas no fueron distintas entre tratamientos, aunque disminuyó el valor de ordenada al origen en el tratamiento N150 (Figura 2.10a). Por otro lado, el tratamiento N20f removilizó 49,3 kg ha^{-1}, un 20% más respecto al tratamiento Control (Cuadro 2.3). La cantidad de N removilizado post-antesis se asoció al rendimiento del cultivo, sin diferencias entre tratamientos (Figura 2.10b).

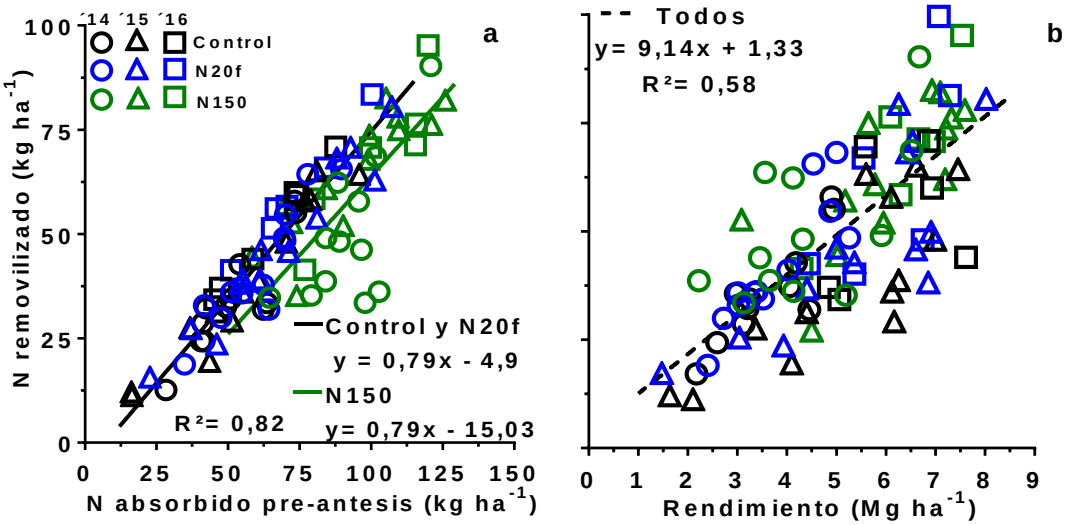


Figura 2.10: N removilizado post-antesis en función del N acumulado en biomasa aérea en pre-antesis(a), del rendimiento (b).

Los tratamientos Control y N20f removilizaron un mayor porcentaje del N acumulado en pre-antesis respecto a N150 (71,8 y 72% respectivamente vs 63,5% del tratamiento N150; Cuadro 2.3). La ERN fue afectada negativamente por el contenido de N en la biomasa aérea (Figura 2.11c). La cantidad de N absorbido por Mg de biomasa final, indicador de la abundancia de N, se relacionó significativamente la ERN con pendiente negativa (Figura 2.11d). Por otro lado, estuvo muy débilmente relacionada a la disponibilidad de N en el suelo (Figura 2.11a). La absorción de N post-antesis (Figura 2.11b) ni la cantidad de N absorbido pre-antesis (datos no mostrados) afectaron la ERN.

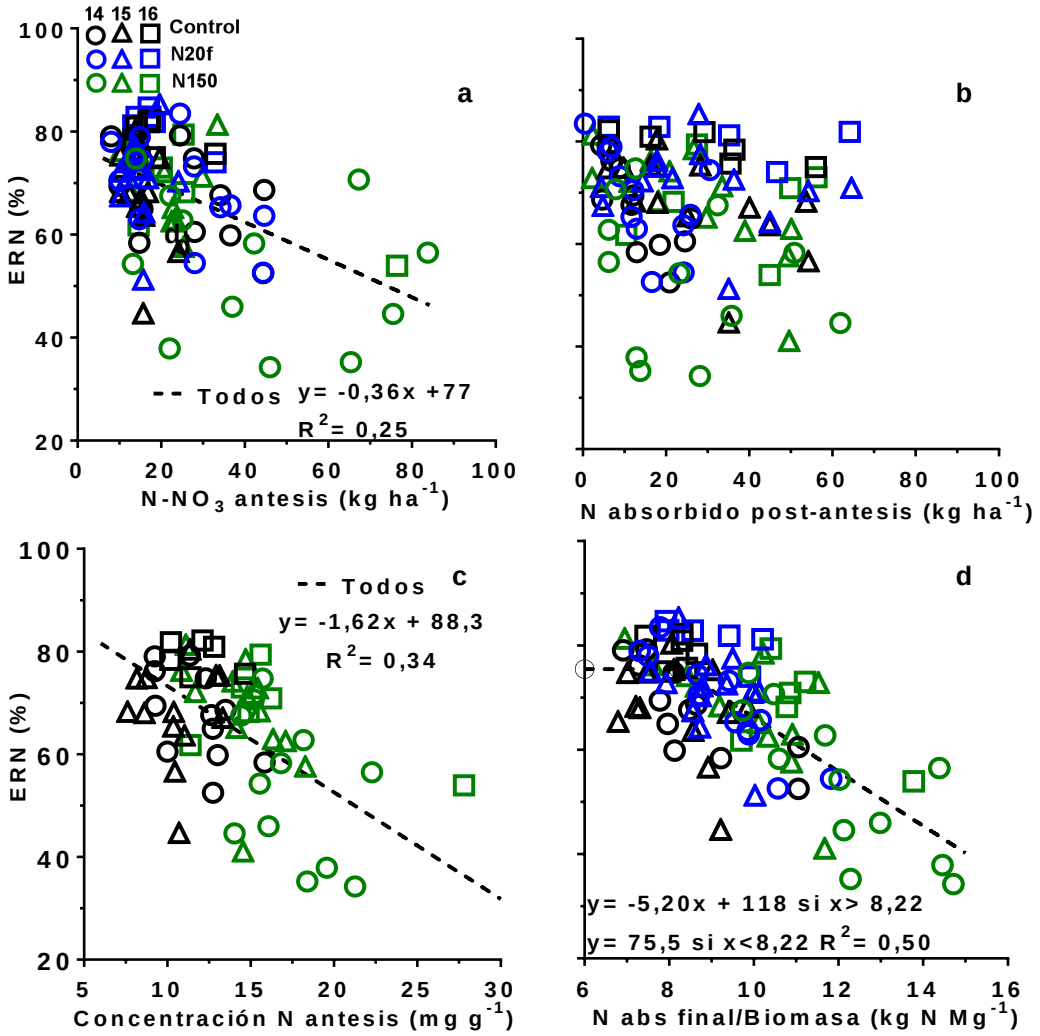


Figura 2.11: Eficiencia de Removilización de N en función del N disponible como nitrato en antesis (a), del N absorbido post-antesis (b), del contenido de N en antesis (c) Relación de la ERN con el N absorbido final por Mg de biomasa final (d). Se ajustaron funciones a los tratamientos dónde la regresión resultó significativa (p<0,05).

La removilización del N acumulado en pre-antesis fue la principal fuente de N para el grano, en promedio aportó alrededor del 67% del N de los granos a madurez, sin ser afectada por los tratamientos (Cuadro 2.3). La contribución del N removilizado al contenido final de N en grano (Nremgrano) no varió significativamente entre tratamientos (Cuadro 2.3). Se determinó que esta variable se relacionó negativamente a la oferta de N para el cultivo en el período post-antesis, estimada como la cantidad de N-NO_3 disponible en el suelo en antesis y la mineralización aparente de N en el período post-antesis (Figura 2.12d). La cantidad de N removilizado y la ERN tuvieron una débil relación con la contribución de N aportado por removilización al grano (Figuras 2.12a y 2.12b). mientras que la disponibilidad de N-NO_3 en antesis no afectó la contribución del N removilizado (Figura 2.12c).

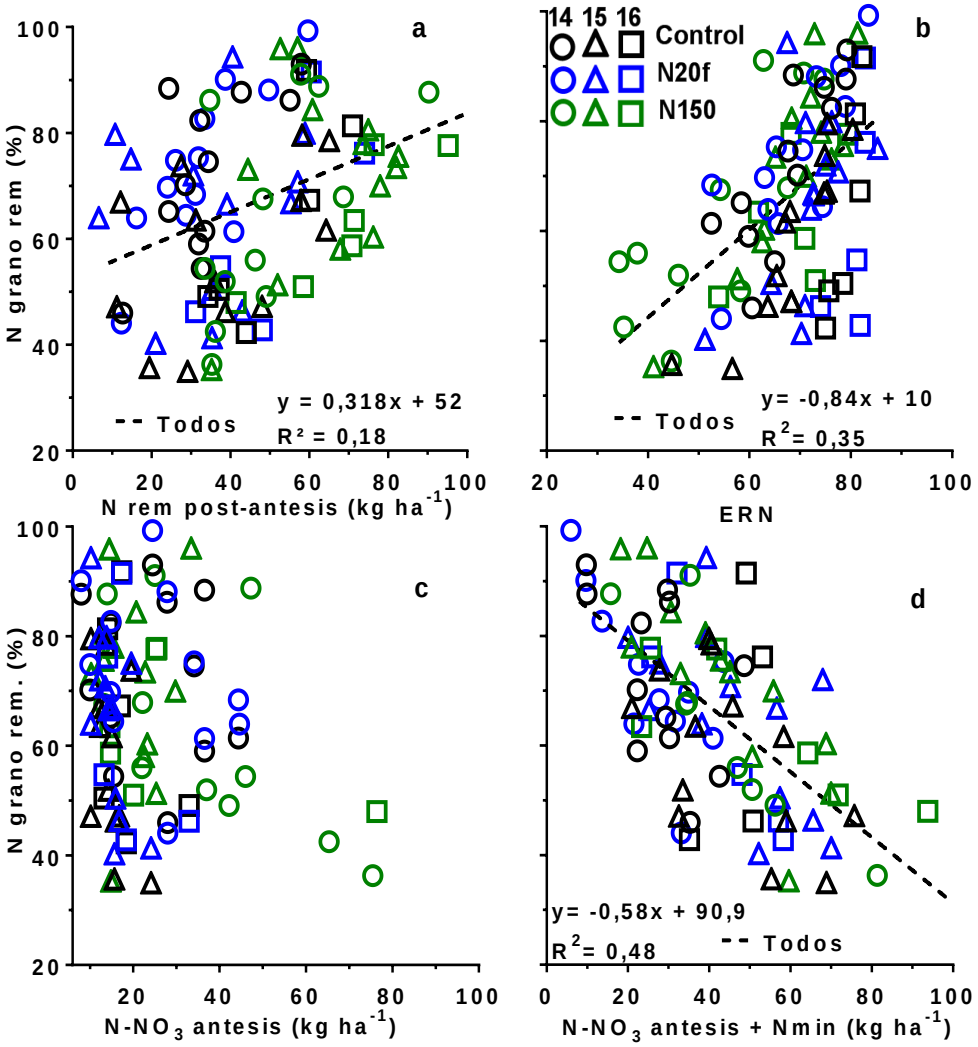


Figura 2.12: Relación entre el % de N en el grano proveniente de removilización (N grano rem %) y la cantidad de N removilizado post-antesis (a). Relación entre el % de N en el grano proveniente de removilización y la Eficiencia de Removilización (b). Porcentaje N en grano proveniente de removilización en función del N-NO_3 en antesis (c) y de la sumatoria del N-NO_3 en antesis y el N mineralizado en el llenado (d).

La otra fuente de N para el grano, la absorción del suelo durante el llenado, dependió de la oferta de N en el período post-antesis, calculada como el N disponible en el suelo como NO_3 en antesis y el N mineralizado durante el período post-antesis (Figura 2.13a), mientras que la disponibilidad de N-NO_3 en antesis no se relacionó a la absorción (Datos no mostrados). La absorción de N en el período post-antesis se asoció al crecimiento post-antesis (Figura 2.13b), por lo que la menor absorción del Control se atribuye a su menor crecimiento en esta etapa. La aplicación foliar no afectó la absorción desde el suelo (Cuadro 2.3).

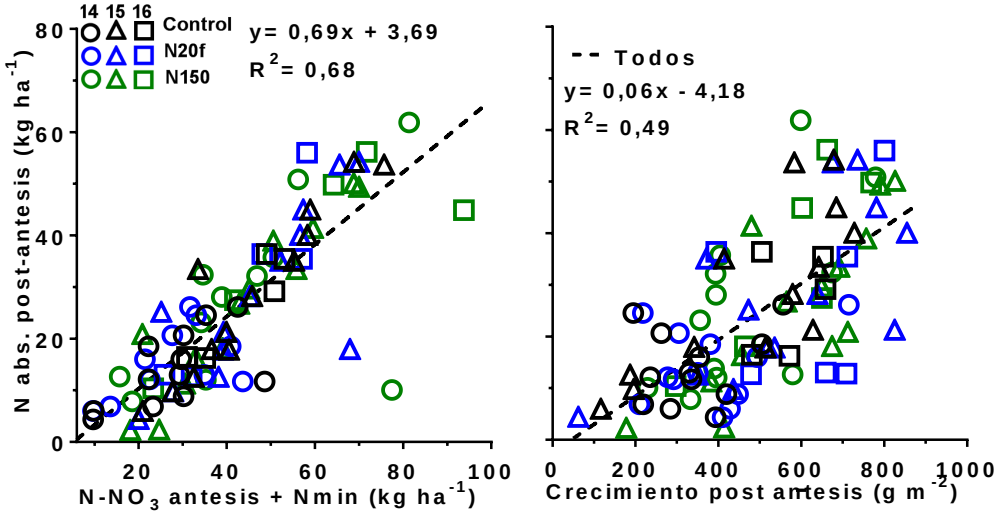


Figura 2.13: Cantidad de N absorbido del suelo en la etapa post-antesis en función de la disponibilidad de N como nitrato (0-60 cm) en antesis + el N mineralizado en post-antesis (a) y del crecimiento post-antesis (b).

El Índice de cosecha de N (ICN) fue afectado por el tratamiento, en promedio el Control destinó mayor proporción de N al grano (79% del N pre-antesis en el control vs 73% en el tratamiento N150; Cuadro 2.3). El ICN se relacionó débilmente a la disponibilidad de N en el suelo en antesis (Figura 2.14a) y se relacionó en mayor medida al N absorbido final por Mg de biomasa (Figura 2.14b). No se relacionó al N absorbido pre-antesis (Datos no mostrados). La aplicación de N en antesis no afectó el ICN ni el contenido de N remanente en el rastrojo (Cuadro 2.3).

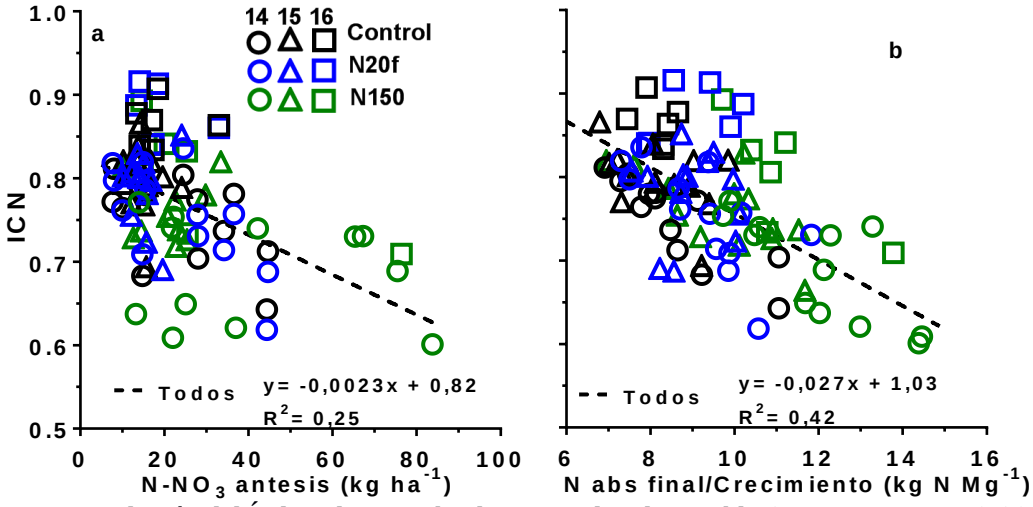


Figura 2.14: Relación del Índice de Cosecha de N con el N disponible ($N\text{-}NO_3$ en antesis) (a), con el N absorbido final por Mg de biomasa final (b).

2.3.4 Proteína en grano

El tratamiento Control tuvo un contenido proteico inferior al requerido por la industria en 28 de los 39 sitios. La reducción de proteína en grano, atribuida a la disponibilidad de N

(diferencia significativa entre el Control y N150), fue dependiente del sitio (Cuadro 2.3), y se observó en el 70% de los casos (27 sitios). La proteína en grano se relacionó con el N absorbido pre-antesis (R^2 0,28, Fig. 2.15b) y, en especial, con el contenido de N en antesis (R^2 0,58, Figuras 2.15a). En ambos casos las relaciones fueron iguales entre los tratamientos. Además del N en planta, la proteína en grano se relacionó al N disponible (N suelo + N agregado) por unidad de rendimiento logrado (cociente Nd/R), sin diferencias entre los tratamientos (Figura 2.15d). En la relación se excluyeron los sitios que recibieron lluvias mayores a 400 mm en el período emergencia-antesis ya que se apartaron de la regresión, hacia debajo de la línea, probablemente debido a las altas perdidas de N. El N absorbido final por unidad de rendimiento tuvo una significativa relación con la proteína para todos los tratamientos (Figura 2.15c). La proteína no se asoció a la cantidad de N removilizado, ni a la cantidad de N absorbido post-antesis para ninguno de los tratamientos (datos no mostrados).

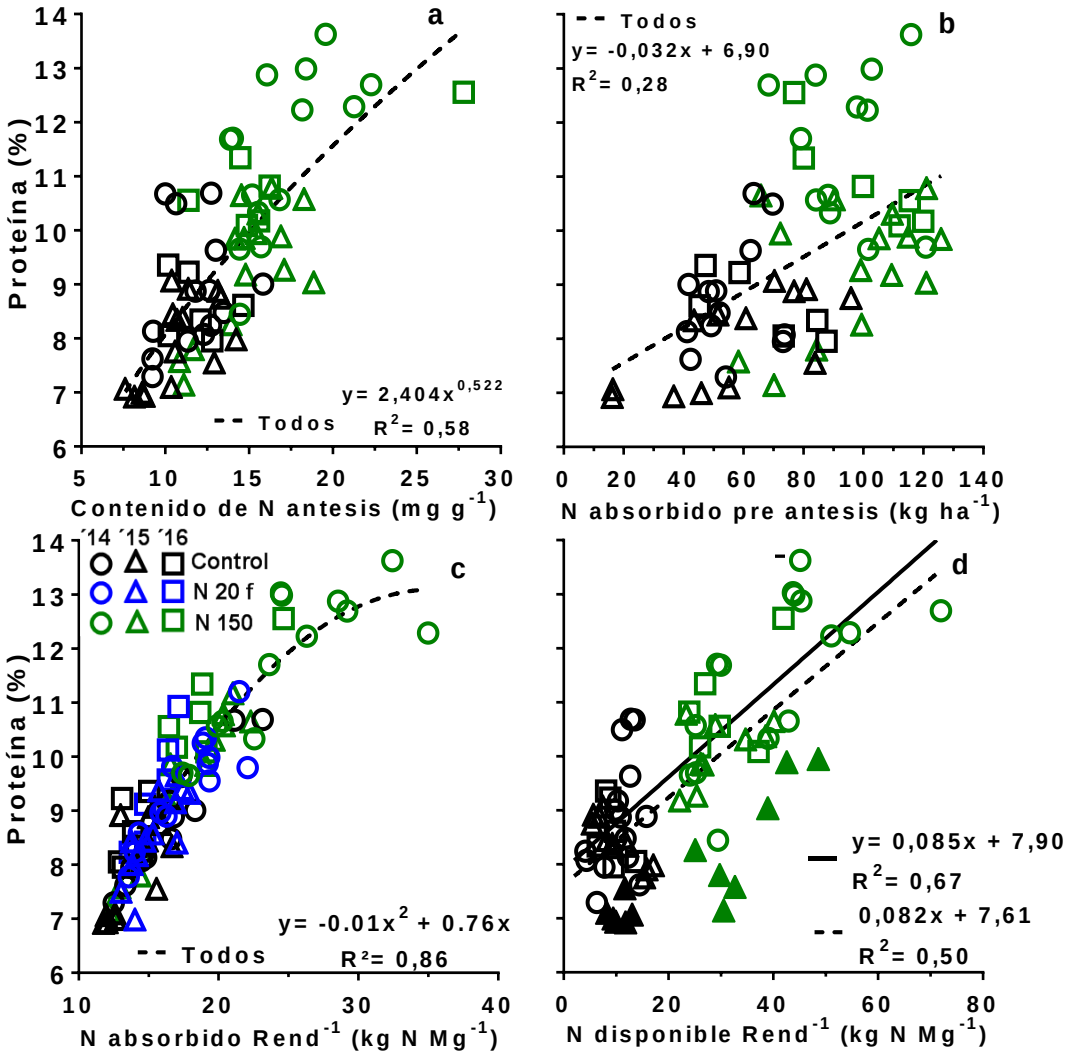


Figura 2.15: Relación de la proteína en grano con: el contenido de N en antesis (a), el N absorbido pre-antesis (b), el N absorbido final por Mg de rendimiento (c), el N disponible al inicio del cultivo por Mg de rendimiento (d). La línea punteada es la función ajustada a todos los sitios, la línea llena corresponde a la función ajustada excluyendo los sitios donde la precipitación entre emergencia y antesis fue mayor a 400 mm, los símbolos llenos corresponden a los sitios excluidos de la regresión.

La relación entre el contenido de N en antesis y la proteína fue dependiente de la proporción del N en el grano proveniente de la removilización. En el 50% de los sitios que tuvieron mayor proporción de N en grano proveniente de removilización (más del 66,9% del N del grano; Figura 2.16b), el contenido de N en antesis explicó el contenido de proteína en grano en mayor medida que en el caso del 50% de los sitios que tuvieron menor contribución de la removilización al grano (R^2 0,85 vs R^2 0,56; Figuras 2.16a y 2.16b).

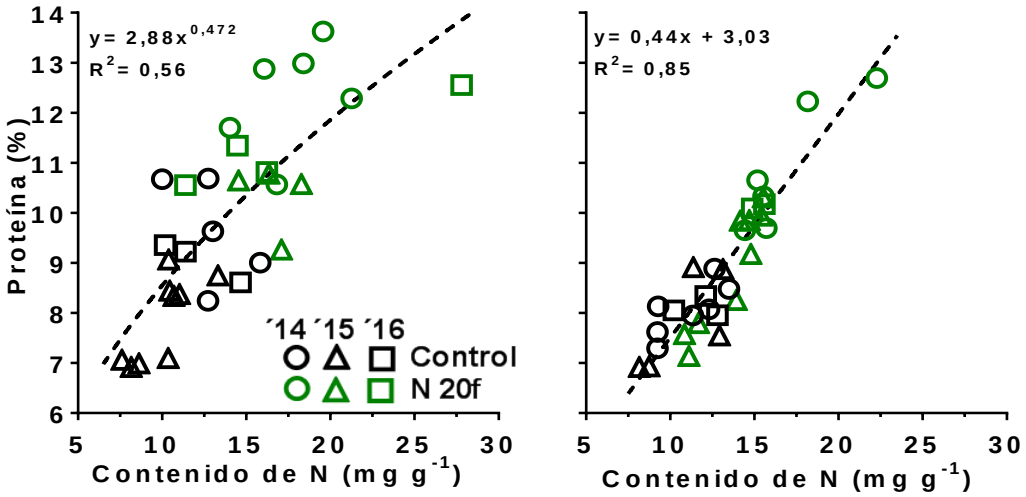


Figura 2.16: Relación entre la proteína y el contenido de N en antesis agrupados en función de la proporción del N en grano aportada por removilización (a) corresponde al 50% de los sitios que tuvieron la menor proporción de N aportado por la removilización, (51,6% en promedio). La figura b corresponde al 50% de los cultivos que tuvieron la mayor proporción de N en grano aportado por la removilización, (80,1% en promedio).

La proteína en grano se relacionó a los INN calculados con las curvas de dilución. El INN obtenido con la curva del tratamiento N150 se relacionó a la proteína, sin embargo, el INN calculado con la curva de Zhao, 2014 tuvo un mejor ajuste (Figuras 2.17a y 2.17b).

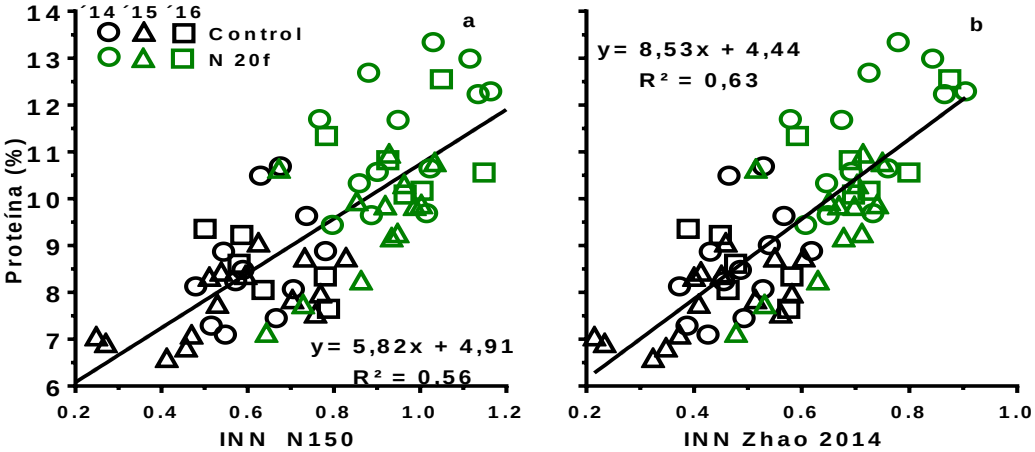


Figura 2.17: Relación entre la proteína y los índices de Nutrición Nitrogenada. Calculados con las curvas de dilución (a) de N150 y (b) de Zhao, 2014. Los INN de las curvas Justes et al., 1994 y N150* no se muestran por tener R^2 inferior a las mostradas.

La suma de temperaturas máximas diarias en los primeros 30 días post-antesis, usando una temperatura mínima para la suma de tiempo térmico de 29 ^{0}C, que tuvo la mejor relación entre las temperaturas mínimas probadas (Figura 2.18), se asoció positivamente a la proteína para todos los tratamientos. El tratamiento N150 tuvo mayor pendiente y ordenada al origen, mientras que los tratamientos Control y N20f tuvieron igual pendiente pero diferentes ordenadas al origen.

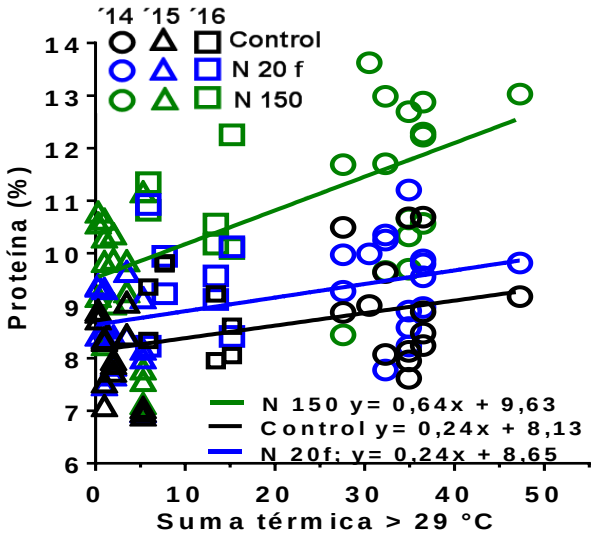


Figura 2.18: Relación entre la proteína y la suma de temperatura máximas diarias mayores a 29°C en los primeros 30 días post-antesis.

Un modelo de regresión múltiple permitió explicar la proteína en grano con un mejor ajuste que una sola variable medida en antesis. En el modelo, la proteína se asoció positivamente al INN calculado con la curva de Zhao (2014) y a la suma de temperaturas máximas por encima de la temperatura mínima de 29 °C en post-antesis y negativamente a la humedad en el suelo, hasta los 100 cm. El modelo obtenido se estableció de la siguiente manera:

Ecuación 2.1

Proteína = 6,55 + 8,67*INN Zhao + 0,032*ST29 – 0,010*HA

R^2 = 0,73; n = 59

Donde INN Zhao es el índice de nutrición nitrogenada calculado con la curva de Zhao (2014), HA es el agua total del suelo en antesis hasta 100 cm de profundidad (mm) y ST29 es la suma térmica, con temperatura mínima de 29 °C en los primeros 30 días del llenado.

La proteína calculada con el modelo de regresión múltiple se relacionó a la proteína observada y el ajuste aumentó respecto al INN individual (R^2 = 0,73 vs R^2 = 0,63). La relación no resultó estadísticamente diferente de la línea 1:1 (Figura 2.19).

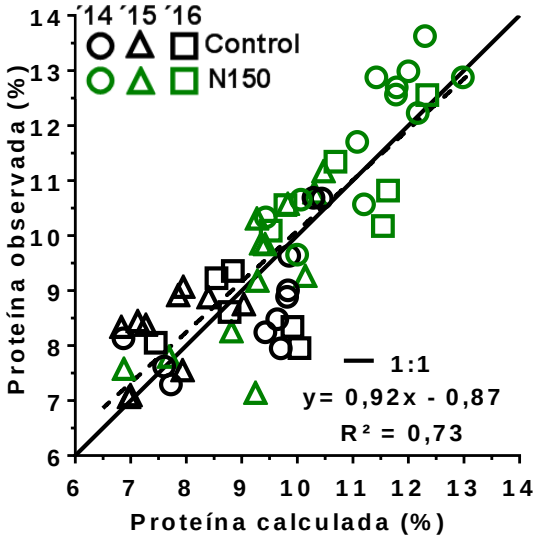


Figura 2.19: Relación entre la proteína observada y la proteína calculada con el modelo de regresión múltiple previamente descripto.

La aplicación foliar de 20 kg de N en antesis incrementó la proteína respecto al Control, y el aumento fue dependiente del sitio. En promedio incrementó la proteína en 0,67 puntos porcentuales, lo que representó un incremento del 7,9% respecto del tratamiento Control (Cuadro 2.3). La respuesta del 50% de los casos centrales fue de entre 0,34 y 0,99 puntos porcentuales. En el 54% de los casos (21 sitios) la proteína del tratamiento N20f superó el límite inferior para la comercialización (vs 38% del Control). La proteína en el tratamiento N20f se relacionó a la proteína en el tratamiento Control (Figura 2.20a), la función ajustada fue diferente a la línea 1:1, en los sitios donde el tratamiento Control tuvo menor proteína, se observó un mayor incremento por la fertilización foliar. La respuesta a la aplicación foliar, en términos de incremento proteico, se relacionó negativamente, al crecimiento del cultivo en el momento de antesis, aunque el valor de R^2 fue bajo (Figura 2.20b). La respuesta no se relacionó al N disponible en suelo (Figura 2.20c), ni al rendimiento del cultivo, tanto en forma absoluta como relativa (datos no mostrados). El status nitrogenado del cultivo, evaluado mediante índices de nutrición nitrogenada obtenidos de curvas de dilución, tampoco se asoció a la respuesta a la aplicación foliar (Figura 2.20d). El análisis de regresión múltiple con variables ambientales consideradas (Agua del suelo y NO_3 disponible en antesis), no mejoró la relación respecto al crecimiento pre-antesis.

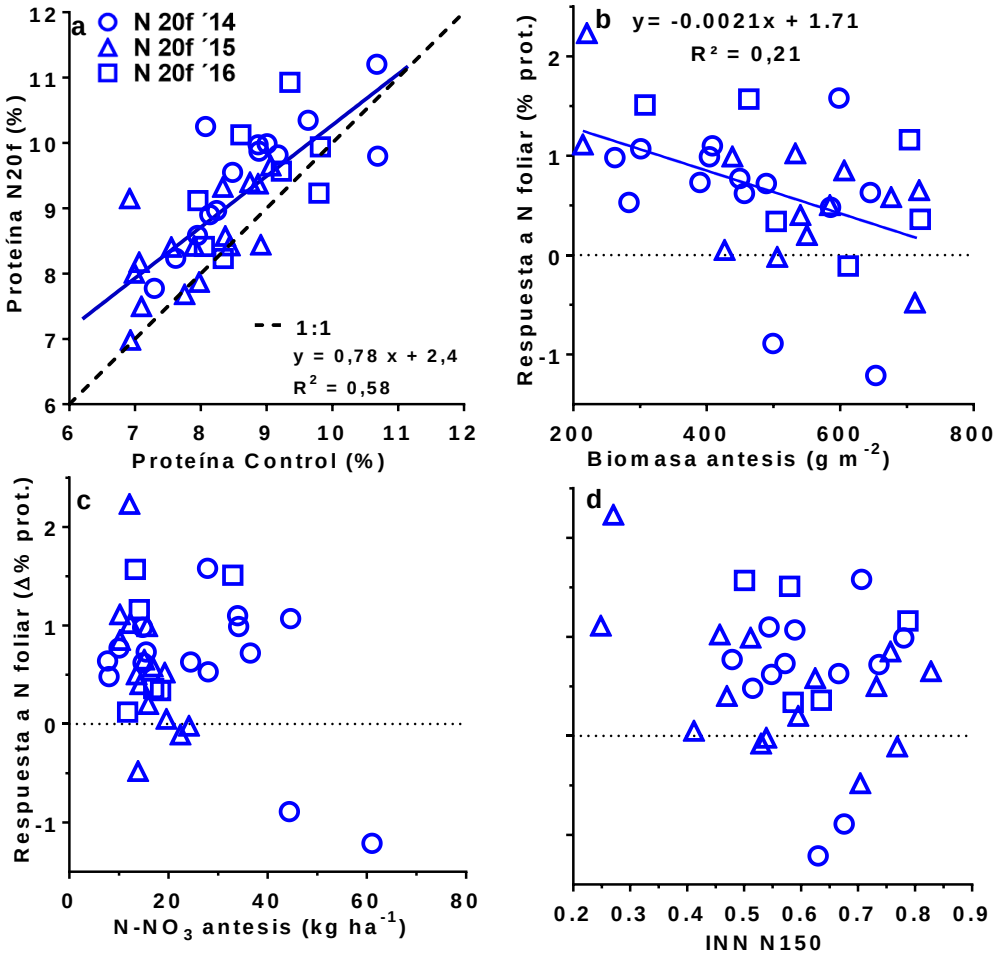


Figura 2.20: Relación entre la proteína en grano en el tratamiento N20f y la proteína en grano en el tratamiento Control (a). Relación entre la respuesta a la fertilización foliar, en incremento de contenido proteico, y la biomasa aérea en antesis (b), el N disponible en antesis como N-NO_3 (c) y el INN obtenido con la curva ajustada al tratamiento N150 (d).

2.4 DISCUSIÓN

2.4.1 Crecimiento y rendimiento

La red experimental exploró un amplio rango de variabilidad ambiental, reflejado por los rendimientos del Control, que variaron entre 2105 y 7640 kg ha^{-1}. La mayoría de los cultivos en los sitios bajo estudio fueron deficientes de N, la reducción del crecimiento pre-antesis, la biomasa final y el rendimiento, comparados con los que recibieron N en emergencia, tuvo un amplio rango de debido a la variabilidad ambiental (Figura 2.3). En el 59% de los sitios el Control, que refleja el manejo por parte del productor, tuvo un rendimiento relativo al tratamiento N150 menor al 90%. El menor crecimiento pre-antesis en los cultivos que no recibieron fertilización nitrogenada (Cuadro 2.2) llevó a que fijen un menor número de granos, asociado directamente al rendimiento (Figura 2.3b). Trabajos previos mostraron que, en cereales, el crecimiento en el período cercano a antesis resulta

crítico para la determinación del número de granos y por lo tanto del rendimiento, tanto en cebada (Baethgen et al., 1995; Prystupa et al., 2004; Arisnabarreta & Miralles 2008), como en trigo (Savin & Slafer, 1991; Ehdaie & Wines, 2001).

El peso de los granos estuvo débilmente asociado al rendimiento (Figura 2.3d). El tratamiento Control, presentó un mayor peso y calibre de grano respecto del tratamiento N150 (Cuadro 2.2). El tratamiento N150 tuvo un menor peso de grano y a consecuencia de ello, menor calibre, resultados similares fueron observados por varios autores (Eagles et al., 1995; Zhao et al., 2006), con dosis de N similares a la usada en el presente trabajo. Contrariamente a lo que sucede con fertilizaciones tempranas, la aplicación en antesis no afectó el calibre (Cuadro 2.2). Factores ambientales como la suma térmica, con temperatura mínima de 27 °C, en los primeros 30 días de llenado redujeron el calibre y el peso de los granos (Figuras 2.5a y 2.5b). La respuesta de ambas variables a la suma térmica se ajustó a una función lineal plateau, por lo que bajas sumas térmicas acumuladas no tienen efecto ni sobre el calibre ni el peso de grano. La sensibilidad del cultivo a la exposición a altas temperaturas después de antesis no tuvo interacción con la fertilización (las pendientes de ambos tratamientos son iguales: Figuras 2.5a y 2.5b). Este resultado difiere de lo observado en trigo por Elia et al. (2018), quienes observaron, que el aumento de la disponibilidad de N aumenta la sensibilidad a las temperaturas altas, aunque los valores de N disponible en dicho trabajo fueron mayores a los de la presente red. En el presente trabajo se observó que el peso de grano fue afectado por temperaturas post-antesis inferiores a las que producen daños por golpe de calor en cereales (Álvarez Prado et al., 2017). Entonces, la reducción del peso de grano se atribuye a una disminución del período de llenado, más que al daño directo de la temperatura sobre el cultivo. Trabajos previos demostraron que, en cereales, altas temperaturas en el llenado afectan el peso del grano debido a una reducción del período de llenado, principalmente por acelerar la senescencia del canopeo (Wardlaw et al., 1989; Slafer & Miralles, 1992). Se determinó previamente que el menor peso de grano en cultivos que sufren altas temperaturas en llenado se debe a una menor acumulación de almidón en el grano (Savin & Nicolas, 1996), ya que afectan el proceso de síntesis (Jenner, 1994).

La aplicación de N en antesis en la mayoría de los sitios no tuvo efecto sobre el rendimiento, solo en el 12% de los casos se observó una respuesta significativa, que no se relacionó a variables de sitio o de cultivo. En trabajos anteriores se observaron resultados dispares respecto al efecto de la aplicación foliar, en períodos cercanos a antesis, sobre el rendimiento. La mayoría de los trabajos, al igual que en la presente red, no observaron efectos generalizados sobre el rendimiento por aplicación foliar en dosis similares a las usadas en este ensayo, tanto en trigo (Heitholt et al., 1990; Wuest & Cassman, 1992; Wolfolk et al., 2002; Ma et al., 2006) como en cebada (Bulman & Smith, 1993). Algunos trabajos reportaron respuestas puntuales, como la observada en la presente red, a la aplicación foliar en algunas situaciones en cultivos de trigo (Gooding et al., 1991, Strong, 1982).

2.4.2 Efecto de la disponibilidad de N sobre la absorción y removilización post-antesis.

La absorción en el período pre-antesis resultó clave para el aporte de N al grano ya que el N cosechado en el grano estuvo significativamente asociado a la absorción pre-antesis (Figuras 2.8a y 2.8b). La absorción de N en este período estuvo relacionada a la

disponibilidad de N en el suelo al comienzo del cultivo (Figura 2.6a). Sin embargo, la proporción del N disponible al inicio del cultivo que fue absorbida en el período pre-antesis fue afectada negativamente por la disponibilidad de N (Figura 2.6b). Trabajos anteriores en cebada (Bulman & Smith, 1993b; Baethgen et al., 1995) y en trigo (Bancal et al., 2008) mostraron que, tanto el rendimiento como el número de granos, se relaciona a la cantidad de N absorbida previamente al período crítico. Tal como fue observado previamente en cereales, la absorción pre-antesis es el principal aporte de N al grano (Austin et al., 1977; Malhi et al., 2006). La cantidad de N absorbido se asoció al rendimiento (Figura 2.7). Los valores de eficiencia fisiológica calculados fueron similares a los determinados previamente en cebada en Argentina (Abeledo et al., 2008). Asimismo, al igual que lo observado en el trabajo de Abeledo et al., 2008, la eficiencia fisiológica disminuyó con la fertilización inicial.

La relación entre el contenido de N en antesis y el crecimiento pre-antesis se ajustó a una curva de dilución (Figura 2.9a). El contenido de N, para todo el rango de biomasa considerado, para el tratamiento N150, estuvo muy por debajo de las curvas de dilución determinadas para cebada por otros autores (Justes et al., 1994; Zhao, 2014). Según estas curvas de dilución críticas, todos los cultivos del tratamiento N150 sufrieron limitaciones en su crecimiento debido al contenido de N. Sin embargo, en nuestra red hubo varios sitios donde no se observaron diferencias en el crecimiento pre-antesis entre el tratamiento Control y N150 (puntos llenos en la figura 2.9a). Los cultivos del tratamiento N150 en esos sitios deberían quedar por encima de una curva de dilución crítica, ya que es evidente que no sufrieron ninguna limitación en su crecimiento pre-antesis por falta de N. Estos resultados sugieren que las curvas descriptas en los estudios previos no representan adecuadamente los cultivos de cebada de nuestra red experimental. Las diferencias podrían atribuirse a que las curvas de referencias fueron realizadas con cebada de invierno o que en el caso de la curva obtenida por Justes, se usaron cultivares más antiguos, que tienden a tener mayor contenido de N en la biomasa que los cultivares actuales (Abeledo et al., 2008). A pesar de no contar con una curva de dilución crítica calibrada para los cultivos de cebada de nuestra red, los INN calculados a partir de las curvas, fueron indicadores de la limitación por N ya que se relacionaron significativamente al rendimiento relativo, indicador de la limitación por N (Figuras 2.9b y 2.9c).

La cantidad de N removilizado en el período post-antesis se relacionó a la cantidad de N absorbido en el período pre-antesis (Figura 2.10a). Estos resultados coinciden con los previamente reportados en trigo (Kichey et al., 2007) y en cebada (Przulj & Momčilović, 2003). La cantidad de N removilizado post-antesis estuvo asociada al rendimiento (Figura 2.10b), por lo que la demanda de N por parte de los granos durante el llenado parece ser un determinante de la removilización del N, como fue sugerido por Gregersen (2008). La aplicación de N foliar en antesis incrementó la cantidad de N removilizado, respecto al Control, prácticamente todo el N absorbido a partir de la aplicación foliar se removilizó en el período post-antesis (Cuadro 2.3). La ERN se relacionó negativamente al contenido de N de la biomasa aérea, tanto en antesis como en madurez (Figuras 2.11c y 2.11d), por lo que a mayor contenido de N una menor proporción de N fue removilizada. La ERN no fue afectada por la aplicación foliar (Cuadro 2.3), por lo tanto, un alto porcentaje del N absorbido fue removilizado en post-antesis. La aplicación tardía, permitió incrementar el aporte de N al grano sin disminuir la eficiencia del proceso de removilización del N absorbido previamente,

como ocurre cuando el N se aplica temprano. La cantidad de N absorbido post-antesis no afectó la ERN (Figura 2.11b), por lo que la removilización de N dependió de la cantidad de N absorbido en la planta (Figura 2.10a). Trabajos previos mostraron que la alta disponibilidad de N en el suelo disminuye la eficiencia de removilización, tanto en cebada (Bulman & Smith, 1994) como en trigo (Papakosta, & Gagianas, 1991; Khan, 2017), con dosis similares de N. Sin embargo, en este trabajo la eficiencia de removilización (ERN) se relacionó débilmente tanto a la disponibilidad de N en antesis (Cuadro 2.3; Figura 2.11a), como a la oferta de N en el llenado. En promedio los tratamientos Control y N20f removilizaron 71,8 y 72% respectivamente, mientras que N150 removilizó un 66,5% del N absorbido pre-antesis (Cuadro 2.3).

La removilización aportó, en promedio, el 66% del N cosechado en grano, y fue similar en todos los tratamientos (Cuadro 2.3). El aporte de N por removilización al grano resultó algo superior a la lo informado para cebada, que está alrededor del 60% (Bulman & Smith, 1993). Los valores fueron similares a valores reportados para trigo, donde se observó una contribución media de la removilización de alrededor de 70%, (Kichey et al., 2007) mientras que Heitholt et al., (1990), determinaron que el aporte de N al grano por removilización puede ser superior al 80%. La proporción del N en grano aportada por removilización estuvo principalmente asociada a la oferta de N en el período post-antesis estimada como la suma de la cantidad de N-NO_3 en antesis y el N mineralizado post-antesis (Figura 2.12d). La absorción post-antesis, que en promedio aportó el 34% del N en grano, se relacionó a la oferta de N para el cultivo durante el llenado, estimada como la sumatoria del N-NO_3 en antesis y el N mineralizado en post-antesis (Figura 2.13a), en línea con lo observado previamente en trigo donde la absorción post-antesis se relacionó a la oferta de N en el suelo en antesis (Cassman et al., 1992). Sin embargo, la medición del contenido N-NO_3 en antesis no estimó la absorción, por lo que la mineralización post-antesis constituye un aporte importante para el grano. La absorción de N en período post-antesis también se relacionó a la demanda del cultivo, estimada a través del crecimiento post-antesis (Figura 2.13b), en línea con lo observado en cebada por Przulj & Momčilović, (2003).

El índice de cosecha de N se relacionó significativamente al contenido de N en la biomasa aérea final (Figura 2.14b), también relacionó negativamente a la disponibilidad de N en el suelo en antesis (Figura 2.14a), como fue reportado en trabajos anteriores en trigo (Ehdaie & Waines, 2001; Ercoli et al., 2008, aunque en menor medida. La aplicación foliar no modificó el ICN (Cuadro 2.3), debido a que un alto porcentaje del N absorbido a partir del aplicado vía foliar se exportó al grano (80%). La alta eficiencia con que el N absorbido vía foliar se traslocó al grano hizo que este tratamiento no aumente la cantidad de N remanente en el rastrojo (Cuadro 2.3), como fue descripto en trigo por Woolfolk et al. (2002).

2.4.3 Proteína

El contenido proteico en el tratamiento Control, representativo del manejo de los cultivos en la región, resultó bajo, en 28 de los 39 sitios experimentales fue inferior al 9%, base mínima para su comercialización a malterías. Esta problemática fue observada previamente en la región pampeana (Matthiess et al., 2002; Michiels & Degenhart, 2004). El contenido proteico en el tratamiento Control estuvo limitado por la disponibilidad de N, en

más de la mitad de los sitios (27 de los 39 sitios) fue inferior al tratamiento N150. La proteína en grano se relacionó significativamente al contenido de N en planta al momento de antesis, una relación más débil se observó con la cantidad de N absorbido en pre-antesis (R^2= 0,58 vs R^2= 0,28 Figuras 2.15a y 2.15b). Trabajos previos observaron que el contenido de N en planta cerca de antesis se relacionó significativamente a la proteína final en trigo (Sexton et al., 2006; Feng et al., 2008). El N absorbido a madurez por unidad de rendimiento fue la variable que mejor explicó la proteína en grano (R^2= 0,86), esta relación no fue afectada por el tratamiento (Figura 2.15c). En menor medida, la proteína se relacionó linealmente con la disponibilidad de N en suelo por unidad de rendimiento (Figura 2.15d). La disponibilidad N necesaria para un 10 % de proteína fue de 24,7 kgN Mg^{-1}, similar a lo observado en otro trabajo realizado en la región, donde se determinó que se necesitan 23,6 kgN Mg^{-1} para un 10% de proteína (Prystupa et al., 2018)

La relación entre la proteína en grano y el contenido de N en antesis fue afectada por la proporción del N en grano proveniente de la removilización (Figuras 2.16a y 2.16b). En los cultivos donde la proporción del N en grano aportada por removilización fue mayor, el contenido de proteína estuvo más relacionado al estado nutricional del cultivo en antesis, evaluado mediante el contenido de N (R^2= 0, 85 donde el aporte por removilización fue mayor al 66% vs R^2= 0, 56 donde el aporte fue menor al 66%). El status nitrogenado del cultivo, evaluado a través de INN calculados con las curvas de dilución ajustadas al tratamiento N 150 y las curvas de referencia explicó mejor la proteína en grano que el contenido de N en antesis (R^2= 0.63 vs R^2= 0,58; Figuras 2.17a y 2.17b). La relación con el INN de la curva de Zhao (2014), resultó levemente superior al ajuste obtenido con la curva ajustada al tratamiento N150 (R^2= 0.56 vs R^2= 0,63).

Además de la nutrición nitrogenada del cultivo, la proteína fue afectada por las altas temperaturas durante el llenado del grano. Un índice que reflejó la exposición del cultivo a altas temperaturas, calculado como la suma de temperaturas máximas mayores a 29 °C en los primeros 30 días post-antesis, se relacionó positivamente con la proteína (Figura 2.18). El incremento en el contenido porcentual de N en grano se debe a que las altas temperaturas durante el llenado reducen el período de acumulación de carbohidratos en grano, mientras que no afectan el período de acumulación de N, que en cereales ocurre previamente a la acumulación de carbohidratos (Bhullar & Jenner, 1985; Stone & Nicolas, 1994; Savin & Nicolas, 1996). La sensibilidad a las altas temperaturas dependió de la disponibilidad de N. El tratamiento N150 tuvo una mayor sensibilidad al incremento de la temperatura, manifestado por una mayor pendiente de la recta respecto al tratamiento Control (Figura 2.18). Las diferencias entre las pendientes probablemente se deben a que el tratamiento N150 podría haber sufrido un déficit hídrico mayor que el Control atribuido al mayor consumo de agua por su mayor crecimiento pre-antesis. La combinación de altas temperaturas y déficit hídrico afectan la acumulación de carbohidratos en mayor medida que las temperaturas altas (Savin & Nicolas, 1996). La fertilización en antesis no afectó la sensibilidad a altas temperaturas ya que el tratamiento N20f tuvo igual pendiente que el tratamiento Control (Figura 2.18). Mediante un modelo lineal de regresión múltiple, que incluyó el INN y factores ambientales se explicó la proteína en grano con mayor precisión respecto a una variable individual (R^2= 0,73 del modelo vs R^2= 0,63 del INN). Este modelo incluyó la suma térmica

durante el llenado, debido a su relación positiva con la proteína y la humedad en antesis que se relacionó en forma negativa con la proteína.

La aplicación foliar de N en antesis incrementó el contenido proteico y permitió alcanzar la calidad maltera varios sitios donde el cultivo no llegó al 9% de proteína. En el tratamiento Control un 28% de lotes lograron la calidad adecuada, mientras que con el tratamiento N20f se logró que un 54% de los lotes resulten aptos para maltería (11 sitios en el Control vs 22 en N20f). El aumento promedio fue de 0.67 puntos porcentuales (Cuadro 2.3), representando un 7,9% más de proteína respecto al Control. Estos resultados coinciden con varios trabajos que observaron respuestas generalizadas a las aplicaciones de N en períodos cercanos a antesis. En cebada (Bulman & Smith, 1993b), obtuvieron un incremento de 7,5% del contenido proteico con la aplicación de 50 kg ha^{-1} de N vía foliar, por lo que la dosis de 20 kg ha^{-1} de N usada en el presente trabajo resultó más eficiente. En trigo, con aplicaciones foliares en dosis de entre 10 y 34 kg de N, se obtuvieron incrementos de entre 10 y 12% de proteína, (Strong, 1982; Woolfolk et al., 2002; Ma et al., 2006). En etapas avanzadas del cultivo, la aplicación de N foliar resulta más adecuada que la aplicación al suelo. Heitholt et al. (1990) observaron que las aplicaciones tardías de N en el suelo post-antesis no afectan el contenido proteico. La eficiencia de absorción del N aplicado vía foliar fue, en promedio, del 46.5% del N aplicado al momento de la aplicación, con un amplio rango de variabilidad, donde el 50% de los casos estuvo entre un 23 y un 70% de absorción y no se relacionó a variables del cultivo. La información disponible acerca de la eficiencia de absorción para cebada a campo es escasa, los valores de absorción observados en otros estudios son muy variables. En trigo, con una dosis mayor de N (40 kg N ha^{-1}), se observaron valores de eficiencia de absorción mayores al observado en el presente trabajo, llegando hasta un 70% de absorción (Powlson et al., 1989). Contrariamente, en trigo en cámara de cultivo, reportan que la recuperación de N aplicado vía foliar resultó como máximo del 27% (Rawluk et al., 2000), muy inferior al promedio observado en la presente red, coincidiendo con los sitios donde la eficiencia fue baja. La eficiencia con que el N absorbido vía foliar se removilizó al grano fue alta (82% en promedio), variando entre 73 y un 98% para el 50% de los casos. La eficiencia en promedio resultó algo menor a lo reportado por Powlson et al. (1989), quiénes observaron una eficiencia de recuperación en el grano del 92% del N absorbido a partir de la aplicación foliar en antesis. Sin embargo, la recuperación de N en grano fue más alta que lo observado en trigo por Moller et al., donde la translocación de N al grano fue de alrededor del 50% del total de N aplicado.

La proteína en grano en el tratamiento N20f se relacionó a la proteína del tratamiento Control, los sitios que tuvieron menor proteína en el tratamiento Control mostraron un mayor incremento en el tratamiento N20f (Figura 2.20a). La respuesta a la aplicación foliar no se relacionó a la disponibilidad de N en el suelo en antesis (Figura 2.20c), contrariamente a lo reportado en una revisión de trabajos Gooding & Davies (1992), quienes observaron una relación negativa entre el incremento de contenido proteico por la aplicación foliar de N y el N disponible para el cultivo en antesis. La respuesta a la aplicación foliar solo se correlacionó en forma negativa y débil al crecimiento del cultivo en antesis (Figura 2.20b), probablemente debido a una dilución del N absorbido. La respuesta no se relacionó ni con el rendimiento ni el crecimiento relativo en antesis, tal como fue propuesto previamente que la respuesta a la fertilización foliar en trigo depende del rendimiento relativo (Bly & Woodard, 2003). El

status nitrogenado, evaluado a través del INN, al momento de aplicación no se relacionó a la respuesta del cultivo (Figura 2.20d), probablemente debido a que el N aplicado se moviliza al grano sin afectar los procesos que determinan el aporte de N al grano, como la eficiencia de removilización y la absorción post-antesis. Dado que mediante la aplicación foliar de N se incrementa la absorción post-antesis sin afectar la removilización del N acumulado pre-antesis, se incrementa el aporte de N al grano y por lo tanto su contenido proteico, tal como fue sugerido previamente (Monaghan et al., 2001).

2.5 CONCLUSIONES

La Hipótesis planteada para este capítulo: "La relación entre el estado nutricional del cultivo en antesis y el contenido de proteína en el grano a cosecha depende de la proporción de N del grano que proviene de la removilización, y de las condiciones ambientales durante el llenado de grano", fue aceptada. La relación entre el contenido de N en antesis y el contenido de proteína en grano fue más estrecha cuando la proporción de N en el grano proveniente de removilización fue alta.

El contenido proteico de los cultivos en la región fue inferior al requerido por la industria maltera en la mayoría de los casos, limitado por la disponibilidad de N, que se tradujo en un menor crecimiento, absorción y contenido de N en biomasa aérea al momento de antesis. El contenido de N al momento de antesis y el INN, calculado con curvas de referencia y con una curva ajustada en el presente trabajo, fueron los mejores estimadores de la proteína en grano. La proteína se relacionó al N absorbido final por unidad de rendimiento y, en menor medida, al N disponible al inicio del cultivo por unidad de rendimiento.

La aplicación foliar en antesis incrementó la proteína ya que gran parte del N absorbido fue removilizado al grano, por lo que la técnica es altamente efectiva para aumentar el N aportado al grano. La aplicación foliar de N no afectó la removilización del N acumulado previamente ni el índice de cosecha de N. Sin embargo, la eficiencia de absorción del N fue relativamente baja. La magnitud del incremento de proteína de los granos por la fertilización foliar se relacionó a la proteína del tratamiento Control y en menor medida al crecimiento del cultivo y no se relacionó al status nitrogenado del cultivo al momento de la aplicación.

A partir de lo observado en este trabajo se determinó la utilidad de un índice de nutrición nitrogenada para predecir la proteína en antesis y decidir una aplicación complementaria de N para mejorar la calidad maltera. La determinación del INN en antesis permite una estimación de la proteína que se espera obtener a la cosecha más precisa que una estimación realizada al inicio del ciclo del cultivo basada en la cantidad de N disponible y el rendimiento esperado.

CAPÍTULO 3: EVALUACIÓN DEL ESTADO DEL CULTIVO EN ANTESIS Y ESTIMACIÓN DEL RENDIMIENTO Y LA PROTEÍNA MEDIANTE ÍNDICES ESPECTRALES

3.1 **INTRODUCCIÓN**

Para optimizar el manejo de la nutrición nitrogenada es necesario conocer el status nitrogenado del cultivo en un período cercano a antesis. El diagnóstico puede hacerse, como se describió previamente, mediante la cosecha de biomasa y determinación de su contenido de N, sin embargo, esta metodología normalmente resulta poco práctica en la producción. El uso de sensores remotos es la alternativa más sencilla y rápida frente a los métodos destructivos que, si bien son de alta precisión, son lentos y costosos (Erdle et al., 2011). El rápido acceso a la información usando métodos de diagnóstico remotos es fundamental para el manejo de la fertilización durante el ciclo del cultivo (Hatfield et al., 2008; Xu et al., 2014).

Dado el número de bandas que presentan los sensores multiespectrales pueden calcularse numerosos índices que se relacionan con distintas características de un cultivo. Los más comunes utilizan la reflectancia de dos bandas, siendo las más usadas la reflectancia en el rojo, infrarrojo cercano (NIR), verde, azul o borde rojo, debido a su sensibilidad a cambios en características del canopeo como cobertura, área foliar, biomasa acumulada, o el contenido de clorofila (Gitelson et al., 2003; Hatfield et al., 2008; Thenkabail et al., 2011). Las formas de cálculo más habituales de un índice de vegetación (VI) son un simple cociente (e.g. RVI = NIR/rojo) o la diferencia normalizada de la reflectancia de dos bandas (e.g. NDVI = (NIR-rojo) / (NIR+rojo)) (Sims & Gamon, 2002; Pettersson & Eckersten, 2007). Uno de los índices más usado para la caracterización de cultivos es el NDVI (Lukina et al., 1999; Raun et al., 2002; Fox & Walthal, 2008; Moges et al., 2005), este índice, calculado como la diferencia normalizada entre bandas del rojo e infrarrojo, se relaciona principalmente con el área foliar o biomasa acumulada y, en segundo término, con la cantidad de N absorbido. Este índice sufre interferencias por la reflectancia del fondo (e.g. suelo) a valores bajos de área foliar (Eitel et al., 2008), y tiende a saturarse a valores de área foliar de 3-4 y altos contenidos de clorofila (Fox & Walthal, 2008). Se han desarrollado otros índices para intentar resolver estos inconvenientes, como el GNDVI, similar al NDVI, pero utilizando la reflectancia del verde en lugar del rojo en su cálculo. El GNDVI tuvo una mayor sensibilidad en un rango más amplio de valores de área foliar y N absorbido en el canopeo (Gitelson et al., 1996). Otro índice de vegetación propuesto fue el OSAVI, que introduce una corrección para reducir la influencia del color de la superficie del suelo sobre el índice (Rondeaux et al., 1996). Otra aproximación para disminuir las interferencias por fondo o condición atmosférica fue integrar la reflectancia de tres bandas en un índice (e.g. TVI: verde, rojo y NIR; CARI y TCARI: verde, rojo, y borde rojo), o utilizar un cociente de dos índices (e.g. TCARI/OSAVI) (Broge & Leblanc, 2000; Haboudane et al., 2002). Varios autores observaron relaciones significativas entre varios índices de vegetación medidos en espigazón-floración y el rendimiento tanto en el cultivo de trigo como en el de cebada. Estas relaciones entre los índices y el rendimiento fueron significativas y con altos valores de ajuste (r^2> 0,8), tanto en estudios basados en pocos sitios experimentales (Hansen et al., 2002; Pettersson et al., 2006; Xue et al., 2007), como en estudios regionales (Wang et al., 2014).

Si bien existen numerosos índices que permiten estimar el status nitrogenado del cultivo alrededor de antesis, se observó que la predicción de la proteína en grano mediante sensores remotos fue mucho más débil y variable que para rendimiento, tanto en trigo como en cebada (Hansen et al., 2002; Freeman et al., 2003). Los errores en las estimaciones de

proteína en etapas tempranas del cultivo se deben a que la proteína depende, además del status nitrogenado del cultivo en antesis, de otras características del cultivo, principalmente de la removilización del N acumulado hacia el grano durante el llenado, y del rendimiento efectivamente alcanzado. Una de las razones que determinan la relación entre el contenido de N en planta en antesis y el contenido proteico final es la proporción del N en el grano que proviene de la removilización (Capítulo 2 de la presente tesis). Se observó que cuando es mayor la proporción de N en el grano que proviene de removilización, el contenido de N en antesis explica en mayor medida las variaciones en el contenido de proteína de los granos. Sin embargo, la removilización es afectada por diferentes factores durante el llenado, afectando la proporción de N que aporta al grano, estos factores pueden ser difíciles de conocer o estimar al momento de antesis dificultando la predicción. La recomendación de una aplicación de N en antesis, para aumentar la proteína en grano, podría basarse en una estimación del rendimiento junto a otras variables del cultivo (e.g.: biomasa, contenido de N) o de suelo (e.g.: N-NO_3, agua útil), relacionadas con las dos fuentes de N para el grano (removilización del N absorbido en antesis y absorción de N del suelo durante el llenado).

La proteína en grano está relacionada con el contenido de N en antesis, tanto en trigo como en cebada (Wright et al., 2004; Xue et al., 2007; Spaner et al., 2005). Sin embargo, esta relación puede ser afectada por el cultivar (Xue et al., 2007), o el año del experimento (Spaner et al., 2005). Se han desarrollado índices específicos para evaluar el contenido de N con independencia de la biomasa del cultivo, para que resulten útiles bajo diferentes condiciones agronómicas y ambientales. Entre los índices más usados se encuentran el índice transformado de la absorción de la clorofila TCARI (Kim et al., 1994) y el índice de vegetación ajustado por la reflectancia del suelo OSAVI (Rondeaux et al., 1996). A su vez, en otros trabajos se observó que combinaciones entre alguno de dichos índices son mejores estimadores del contenido de N, que los índices por separado. Este mejor ajuste se logra debido a que son más resistentes a las variaciones en el índice de área foliar entre diferentes condiciones de crecimiento del cultivo. Haboudane et al., (2002) sugiere que el cociente TCARI/OSAVI es adecuado para la estimación de clorofila a nivel canopeo, minimizando la interacción del suelo. Eitel et al., (2008) observaron una buena relación del cociente de MCARI/MTVI2 con el contenido de N en hoja en trigo, aunque esta relación no fue generalizada ya que se observó solo en uno de los tres ensayos realizados. En cultivos de cebada, se observó una buena relación ($r^2 > 0,50$) entre varios índices y el contenido de N en hojas (Xu et al., 2014).

3.1.1 Objetivos específicos

Los objetivos de este capítulo fueron:

Evaluar el crecimiento, la absorción y el contenido de N en antesis a través de mediciones indirectas (sensor multiespectral portátil).

Predecir la necesidad de fertilización complementaria mediante evaluaciones del estado nutricional del cultivo en antesis obtenidas con el sensor multiespectral.

3.2 MATERIALES Y METODOS

3.2.1 Mediciones a campo

Las mediciones de la reflectancia se realizaron sobre los ensayos descriptos en el capítulo anterior. La reflectancia se midió la semana previa a antesis del cultivo con el objetivo de evitar la influencia de las espigas en la reflectancia del canopeo. Las fechas de antesis se estimaron usando el programa Cronocebada (Alzueta et al., 2014) y los datos de temperatura para cada localidad. La reflectancia del cultivo se midió con un radiómetro pasivo multiespectral portátil (CropScan MSR16, Rochester EEUU). Las mediciones se realizaron en el horario comprendido entre las 10 y 16 hs., para asegurar un adecuado ángulo de incidencia de la luz solar y una radiación suficiente para las mediciones. La reflectancia de cada parcela se calculó como el promedio de 4 mediciones. También, en el mismo momento, se determinó el índice de verdor mediante un clorofilómetro Minolta SPAD en la anteúltima hoja tomando una muestra de 20 plantas por parcela. El sensor midió la reflectancia en las siguientes longitudes de onda (nm): 450, 500, 550, 610, 660, 680, 710, 730, 760, 780, 810, 870, 950, 1080, 1220, 1600. Para el cálculo de algunos índices se estimó la reflectancia en las bandas espectrales de 670 y 720 nm por interpolación lineal con la reflectancia en bandas cercanas (i.e. 660-680 y 710-730, respectivamente).

3.2.2 Análisis de los datos de reflectancia

A partir de las lecturas de reflectancia obtenidas se realizó un gráfico de reflectancia en las distintas longitudes de onda medidas (Firma espectral) para los tratamientos Control y N150, en cada longitud de onda se compararon las reflectancias de los tratamientos Control y N150 mediante test t apareado. Se calcularon varios índices espectrales descriptos en estudios previos (Cuadro 3.1). En los casos de índices donde las bandas requeridas fueron diferentes a las medidas por el radiómetro, se usaron las bandas más cercanas medidas por el radiómetro, correspondientes al mismo al mismo color que en el índice original, según se describe en la columna ‘Fórmula usada’ en la Cuadro 3.1. Además, se calcularon los siguientes cocientes simples entre índices TCARI/OSAVI (Haboudane et al., 2002), MCARI/OSAVI, TCARI/MTVI, MCARI/MTVI (Haboudane et al., 2004).

Además de los índices descriptos en el Cuadro 3.1, se calcularon todos los cocientes simples (n=240) y diferencias normalizadas (n=120) posibles con todas las bandas medidas, tal como fue descripto por Sims & Gamon, (2002). Algunos de estos cocientes o diferencias normalizadas resultaron iguales o similares a otros reportados en estudios previos; por lo que se citó la referencia al trabajo en el Cuadro 3.3. Además, se calcularon los mismos índices relativos al tratamiento N150 en cada sitio.

Cuadro 3.1: Fórmulas de los índices descriptos en trabajos previos, que fueron calculados en este trabajo. En los casos donde no se midieron las bandas correspondientes se usaron las bandas medidas más aproximadas a las descriptas en la fórmula.

Índice	Fórmula original	Fórmula usada	Referencia
NDVI	$(R_{800} - R_{670})/(R_{800} + R_{670})$	$(R_{810} - R_{670})/(R_{810} + R_{670})$	Rouse et al., 1973
GNDVI	$(R_{870} - R_{550})/(R_{870} + R_{550})$	Sin cambios	Gitelson et al., 2002
REIP	$700+(40(((R_{670} + R_{780})/2) - R_{710})/(R_{740} - R_{710}))$	$700 + (40*(((R_{670} + R_{780})/2) - R_{710})/(R_{730} - R_{710}))$	Collins, 1978
TCARI	$3[(R_{700} - R_{670}) – 0,2(R_{700} – R_{550})(R_{700}/R_{670})]$	$3[(R_{710} - R_{670}) – 0,2(R_{710} - R_{550})(R_{710}/R_{670})]$	Haboudane et al., 2002
OSAVI	$(1+0,16)(R_{800} – R_{670})/(R_{800} + R_{670} + 0,16)$	$(1+0,16)(R_{810} - R_{670})/(R_{810} + R_{670} + 0,16)$	Rondeaux, et al., 1996
MCARI	$[(R_{700} - R_{670}) – 0,2(R_{700} - R_{550})](R_{700} /R_{670})$	$[(R_{710} - R_{670}) – 0,2(R_{710} -R_{550})](R_{710} /R_{670})$	Daughtry et al., 2000
MTVI	$1,2[1,2(R_{800} - R_{550}) - 2,5(R_{670} - R_{550})]$	$1,2[1,2(R_{810} - R_{550}) - 2,5(R_{670} - R_{550})]$	Haboudane et al., 2004

Se establecieron relaciones entre variables del cultivo y los índices calculados y además, se estableció la relación entre las variables de cultivo y la reflectancia en bandas individuales. Para ello se utilizaron las siguientes variables: contenido de N en la biomasa aérea en antesis (Nantesis), crecimiento pre-antesis, cantidad de N absorbido pre-antesis (Nabsant), índice de nutrición nitrogenada (INN), rendimiento, proteína y N absorbido total a cosecha final (Nabsfinal). Las funciones probadas fueron: lineal, cuadrática, exponencial y potencial. Se seleccionaron los índices, reflectancias, cocientes de reflectancias y diferencias normalizadas que tuvieron relación significativa con cada variable (p<0,05). Se seleccionaron aquellos que mejor explicaron las variaciones de cada variable a estimar en función de su valor de R^2. Además del valor de R^2, se calculó la asimetría de la distribución de los valores de cada índice. Cuando los valores de R^2 fueron similares se seleccionaron los índices con menor valor de asimetría, indicando una distribución más cercana a la normal.

Además de las relaciones directas, se elaboraron modelos de regresión múltiple para estimar el rendimiento y la proteína con índices espectrales calculados y variables de suelo en antesis (Humedad y N disponible). Las variables incluidas en el modelo se seleccionaron mediante una regresión stepwise. Se calcularon estimadores de proteína, descriptos en el capítulo 2, mediante índices y se relacionaron a la proteína medida. Se estableció la relación de la proteína con el N disponible por unidad de rendimiento (Nd/r), (usando el rendimiento estimado por índices y el N disponible medido) y con el N absorbido total por unidad de rendimiento (ambos estimados mediante índices). Las funciones obtenidas con los estimadores predichos (Nd/r estimado y N absfinal estimado /r estimado) se compararon con las funciones obtenidas con los datos medidos (Capítulo 2), mediante comparación de funciones a través de un test de F.

3.3 RESULTADOS

La reflectancia media del cultivo para los tratamientos Control y N150 se muestra en la Figura 3.1. En la comparación de las reflectancias entre tratamientos se observó que en las longitudes de onda desde 450 a 550 nm no hubo diferencias entre el Control y el tratamiento N150. En las longitudes de onda siguientes, hasta 710 nm el Control presentó una reflectancia mayor, mientas que a partir de 710 nm el tratamiento N150 tuvo mayor reflectancia hasta 1600nm donde no hubo diferencias entre tratamientos.

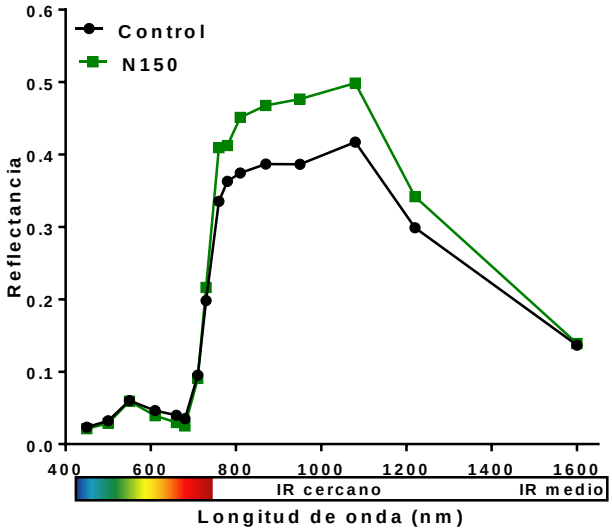


Figura 3.1: Reflectancia del cultivo en función de la longitud de onda.

3.3.1 Relación entre índices espectrales y el estado del cultivo en antesis.

El crecimiento pre-antesis se relacionó significativamente a varios de los índices espectrales propuestos en estudios previos y, entre ellos, el OSAVI fue el índice que mejor explicó las variaciones en el crecimiento del cultivo pre-antesis (Cuadro 3.2). También se relacionó con la reflectancia en varias de las bandas evaluadas, con un mayor ajuste en la banda R_{780} (Cuadro 3.4; Figura 3.2). El agregado de una segunda reflectancia, en forma de cociente simple y/o diferencia normalizada mejoró la relación con el crecimiento del cultivo. Dentro de los índices calculados con la reflectancia en dos bandas, el cociente R_{780}/R_{450} mostró la mejor relación (Cuadro 3.3; Figura 3.2), con un ajuste similar al índice OSAVI (Cuadro 3.2, Figura 3.2). Varias diferencias normalizadas se relacionaron con el crecimiento del cultivo, mejor que bandas individuales, aunque el R^2 fue menor al índice OSAVI y al cociente R_{780}/R_{450} (Cuadro 3.2; Figura 3.2). Entre los índices que tuvieron los valores de R^2 más altos, el cociente R_{780}/R_{450} tuvo menor asimetría en su distribución respecto al OSAVI, indicando una distribución más homogénea y por lo tanto menor tendencia a la saturación a valores altos de biomasa aérea acumulada en antesis.

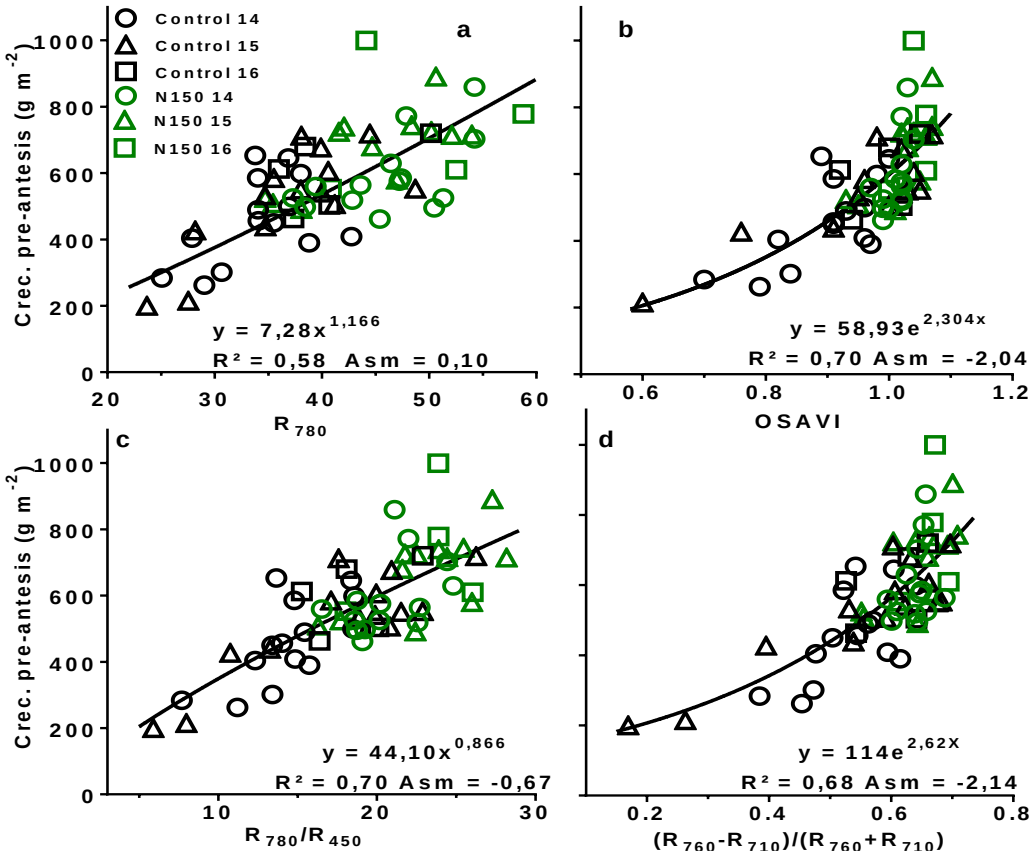


Figura 3.2: Relación entre el crecimiento pre-antesis y la reflectancia de la banda R_{780} (a), el índice OSAVI (b), el cociente R_{780}/R_{450} (c) y la diferencia normalizada entre R_{760} y R_{710} (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x.

Cuadro 3.2: Relación entre el crecimiento pre-antesis, contenido de N en planta, N absorbido pre-antesis y los índices espectrales descriptos en bibliografía. Se muestran los valores de R^2 en aquellas relaciones que resultaron significativas (p<0,05), ns: regresión no significativa: (p>0,05). Los valores de R^2 en negrita corresponden a las regresiones que mejor explicaron las variaciones en cada una de las variables analizadas.

Índice	**Crec. preant.(g m^{-2})**		**Nantesis (mg N g^{-1})**		**Nabsant. (kg N ha^{-1})**	
	Ecuación	R^2	Ecuación	R^2	Ecuación	R^2
NDVI	$57{,}89e^{2{,}622x}$	0,678	$4{,}500e^{1{,}227x}$	0,279	$2{,}564e^{3{,}869x}$	0,732
GNDVI	$8{,}098e^{4{,}885x}$	0,698	$2{,}040e^{2{,}134x}$	0,250	$0{,}902e^{5{,}826x}$	0,739
REIP	$2x10^{-7}e^{0{,}029x}$	0,553	$1.10^{-5}e^{0{,}018x}$	**0,416**	$3.10^{-14}e^{0{,}047x}$	**0,744**
TCARI	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
OSAVI	$88{,}35e^{2{,}540x}$	**0,702**	$4{,}601e^{1{,}066x}$	0,283	$162.9x^{2{,}432}$	0,706
MCARI	$280{,}2e^{3{,}875x}$	0,445	$20{,}69x^{0{,}255}$	0,164	$28{,}03e^{5{,}396x}$	0,445
MTVI	$875{,}94x^{0{,}869}$	0,652	$16{,}18x^{0{,}400}$	0,275	$16{,}15e^{2{,}461x}$	0,675
TCARI/OSAVI	$1619e^{-6{,}267x}$	0,435	$5{,}865x^{-0{,}451}$	0,130	$328{,}8e^{-8{,}839x}$	0,465
MCARI/OSAVI	$1598x^{0{,}731}$	0,286	ns	ns	$27{,}35e^{4{,}037x}$	0,226
TCARI/MTVI	$1245e^{-3{,}810x}$	0,653	$6{,}636x^{-0{,}430}$	0,245	$234{,}5e^{-5{,}534x}$	0,713
MCARI/MTVI	$1013x^{0{,}816}$	0,674	$17{,}12x^{0{,}362}$	0,260	$16{,}23e^{3{,}026x}$	0,702
SPAD	$2.142x^{1{,}464}$	0,424	$0{,}731e^{0{,}764x}$	0,219	$9{,}207e^{0{,}046x}$	0,379
SPAD rel.	ns	Ns	$12{,}78x^{1{,}272}$	0,285	$2{,}811e^{3{,}241x}$	0,276

Cuadro 3.3: Relación entre la biomasa, contenido de N en planta, N absorbido en antesis y la reflectancia en bandas individuales, cocientes y diferencias normalizadas entre bandas. Se muestran los valores de R^2 en aquellas relaciones que resultaron significativas (p<0,05). Los valores de R^2 en negrita corresponden a las regresiones que mejor explicaron las variaciones en cada una de las variables analizadas. (ns: regresión no significativa: valor p>0,05).

Predictor	**Crec. preant.(g m^{-2})**		**Nant. (mg N g^{-1})**		**Nabsant. (kg N ha^{-1})**	
Reflectancia	Ecuación	R²	Ecuación	R²	Ecuación	R²
R_{450}	$1333x^{-1,134}$	0,386	$17,80x^{-0,411}$	0,101	$244,7x^{-1,574}$	0,378
R_{550}	$3303x^{-1,013}$	0,228	ns	ns	$886,3x^{-1.421}$	0,226
R_{730}	$20,38x^{1,080}$	0,129	ns	ns	$0,740x^{1,499}$	0,126
R_{780}	$7,280x^{1,166}$	**0,583**	$1,109x^{0,656}$	0,294	$0,113x^{1,742}$	0,652
R_{870}	$6,209x^{1,190}$	0,528	$1,262x^{0,619}$	0,280	$0,063x^{1,868}$	0,659
R_{1080}	$3,652x^{0,309}$	0,426	$5,111e^{0,02x}$	**0,376**	$3.193x^{-1.65}$	**0,669**
Cocientes						
R_{730}/R_{710}	$144,31x^{1,635}$	0,670	$7,321x^{0,689}$	0,258	$11,29x^{2,267}$	0,684
R_{760}/R_{550}	$77,88x^{1,064}$	0,680	$4.870x^{0,529}$	0,361	$4.268x^{1,540}$	0,748
R_{760}/R_{710} (1)	$147,3x^{0,938}$	0,667	$6,649x^{0,470}$	0,361	$10,61x^{1,366}$	**0,751**
R_{760}/R_{730} (2)	$180x^{1,907}$	0,574	$6,502x^{1,167}$	0,459	$12,80x^{2,956}$	0,733
R_{780}/R_{450}	$44,10x^{0,866}$	**0,703**	$4,2038x^{0,386}$	0,274	$2,192x^{1,199}$	0,717
R_{1080}/R_{730}	$129,7x^{1,809}$	0,356	$3,546x^{1,620}$	**0,594**	$5,339x^{3,266}$	0,617
R_{1220}/R_{730}	ns	ns	$5,926x^{1,758}$	0,314	ns	ns
Dif. Norm.						
$(R_{730}-R_{780})$	$294.8e^{-1,783x}$	0,221	$6.699e^{-1,90x}$	0,498	$23.03e^{-3.31x}$	0,385
$(R_{760}-R_{550})$ (3)	$33,44e^{3,891x}$	0,673	$3,195e^{1,936x}$	0,376	$1,218e^{5,661x}$	0,773
$(R_{760}-R_{710})$ (4)	$114,5e^{2,625x}$	**0,685**	$5,861e^{1,316x}$	0,367	$7,221e^{3,837x}$	0,767
$(R_{870}-R_{730})$	$128,0e^{4,178x}$	0,599	$5.144e^{2.630x}$	0,507	$549.6x^{1,903}$	**0,786**
$(R_{950}-R_{730})$ (5)	$125,1e^{4,275x}$	0,447	$3,958e^{3,407x}$	0,598	$5,945e^{7,191x}$	0,675
$(R_{1080}-R_{730})$	$108,0e^{4,314x}$	0,381	$3,119e^{3,761x}$	**0,611**	$4,155e^{7,553X}$	0,623

(1): Similar a Red Edge Simple Ratio (750/700) Gitelson & Merzlyak, 1997
(2): Erdle et al., 2011
(3): Similar a nd705 Gitelson et al., 1998 (750-705)
(4): Hackl et al., 2012
(5): Similar a Elsayed et al., 2018 (952-720)

El contenido de N en biomasa aérea se relacionó significativamente a varios de los índices probados, con valores de R^2 relativamente bajos, comparados a los valores de R^2 observados para el crecimiento y el N absorbido pre-antesis. El REIP fue el índice que mejor explicó las variaciones en esta variable (Cuadro 3.2). El contenido de N se relacionó con la reflectancia en la banda R_{1080}, mientras que cuando se agregó la banda R_{730}, tanto como cociente simple o diferencia normalizada, mejoró la estimación en términos de R^2 (Cuadro 3.3; Figura 3.3). El cociente R_{1080}/R_{730} tuvo una distribución más cercana a la normal respecto a la diferencia normalizada y el índice REIP. Las relaciones entre bandas exploradas en este trabajo explicaron las variaciones en el contenido de N en biomasa mejor que los índices reportados en estudios previos (Cuadros 3.2 y 3.3).

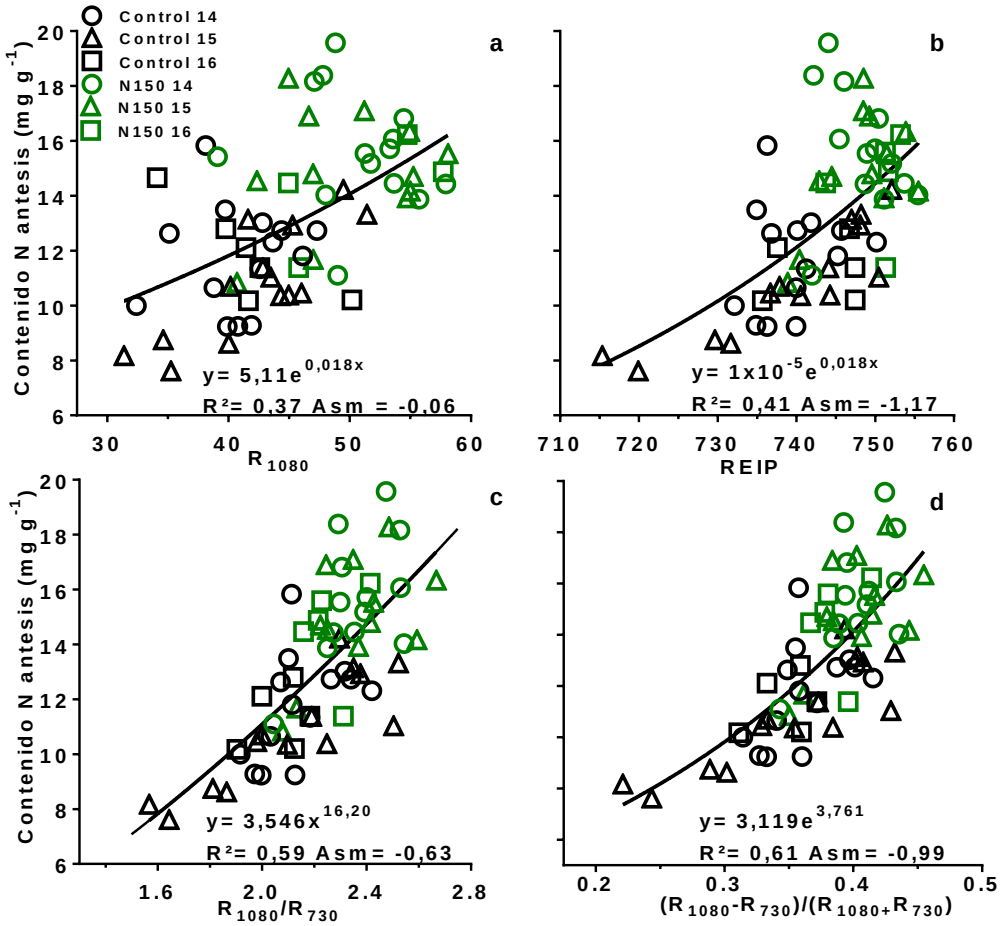


Figura 3.3: Relación entre el contenido de N en antesis y la reflectancia de la banda R_{1080} (a), índice REIP (b), cociente R_{1080}/R_{730} (c) y diferencia normalizada R_{1080}-R_{730} (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x.

La cantidad de N absorbido pre-antesis (Nabsant) se relacionó significativamente a varios de los índices reportados en estudios previos, entre los que el REIP tuvo el mejor ajuste (Cuadro 3.2). Al igual que el crecimiento, se relacionó a la reflectancia en varias bandas, donde R_{780} mostró el mejor ajuste. Los cocientes y diferencias normalizadas explicaron las variaciones en el N absorbido pre-antesis mejor que las reflectancias individuales. La diferencia normalizada R_{870}-R_{730} y el cociente R_{760}/R_{710} tuvieron las relaciones más robustas con el N absorbido, siendo este último el que tuvo menor asimetría en su distribución y por lo tanto menor tendencia a la saturación (Cuadro 3.3; Figura 3.4).

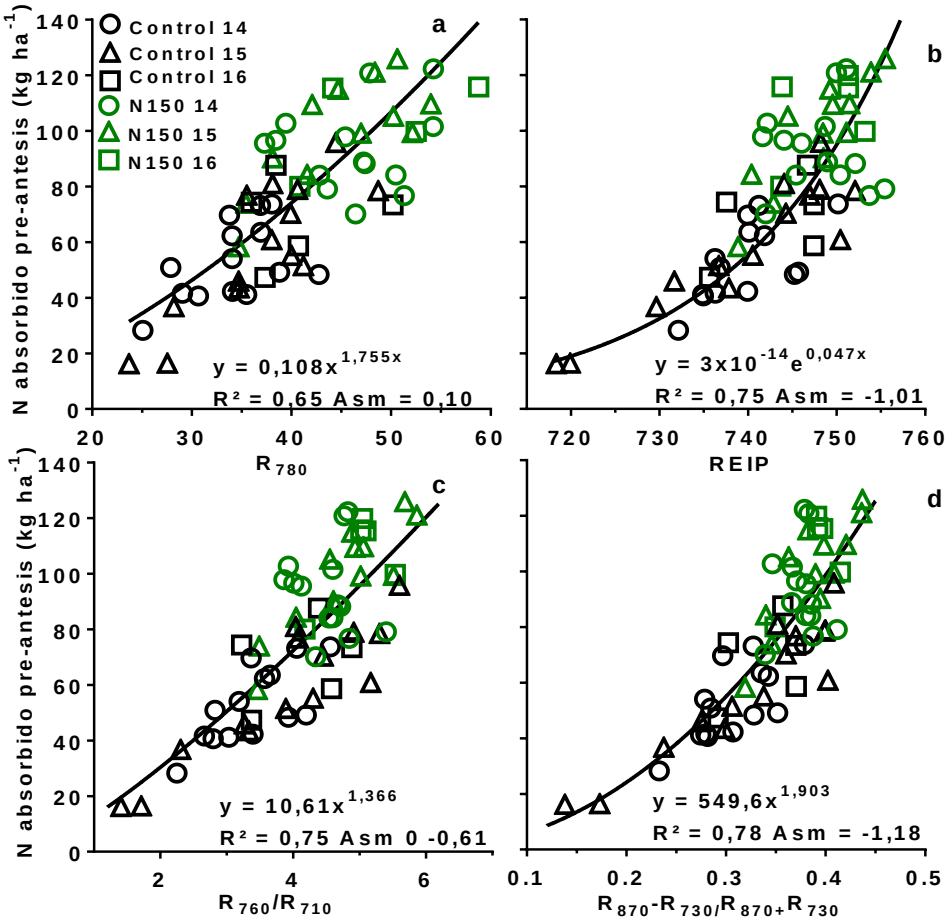


Figura 3.4: Relación entre la cantidad de N absorbido pre-antesis y la banda R_{780} (a), índice REIP (b) cociente R_{760}/R_{710}(c) y diferencia normalizada R_{870}-R_{730} (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x.

Los índices de nutrición nitrogenada (INN), calculados en el Capítulo 2, que integran el contenido de N con el crecimiento del cultivo, se relacionaron a varios de los índices espectrales evaluados. La diferencia normalizada $R_{870} – R_{730}$, que también resultó el mejor estimador del N absorbido pre-antesis, fue el mejor estimador de los INN, tanto de los calculados con el tratamiento N150 como del calculado con la curva de Zhao et al., 2014. Los cocientes de bandas probados tuvieron ajustes ligeramente inferiores a las diferencias normalizadas, entre ellos, el cociente R_{1080}/R_{730} tuvo la relación más robusta con los INN evaluados. Entre los índices el REIP fue el mejor estimador, aunque con un ajuste inferior a las diferencias normalizadas y cocientes de bandas (Cuadro 3.4; Figura 3.5).

Cuadro 3.4: Relación del INN, INN Zhao e INN 50% con índices, reflectancia en bandas individuales, cocientes simples y diferencias normalizadas entre bandas. Se muestran los valores de R^2 en aquellas relaciones que resultaron significativas (p<0,05). Los valores de R^2 en negrita corresponden a las regresiones que mejor explicaron cada una de las variables, (ns: regresión no significativa, valor p>0,05).

Predictor	**INN**		**INN Zhao**		**INN 50%**	
Índices	Ecuación	R²	Ecuación	R²	Ecuación	R²
NDVI	$0{,}073e^{2{,}625x}$	0,640	$0{,}076e^{2{,}250x}$	0,578	$0{,}2133e^{1{,}5782x}$	0,273
GNDVI	$0{,}011e^{4{,}738x}$	0,618	$0{,}0161e^{4{,}0396x}$	0,552	$y = 0{,}059e^{3{,}047x}$	0,299
OSAVI	$0{,}057e^{2{,}562x}$	0,609	$0{,}062e^{2{,}195x}$	0,540	$y = 0{,}151e^{1{,}746x}$	0,289
REIP	$2{,}05.10^3x^2 + 0{,}10x - 2{,}77$	**0,610**	$1{,}01.10^3x^2 + 0{,}028x - 15{,}1$	0,571	$8{,}10^3x^2 - 0{,}104x + 33{,}144$	0,447
Bandas						
R_{550}	$3{,}713x^{-0{,}94}$	0,192	$2{,}136x^{-0{,}785}$	0,164	ns	ns
R_{780}	$0{,}008x^{1{,}191}$	0,574	$0{,}012x^{1{,}021}$	0,519	$0{,}376e^{0{,}019x}$	0,251
R_{870}	$0{,}004x^{1{,}327}$	0,612	$0{,}007x^{1{,}145}$	0,561	$0{,}032x^{0{,}863}$	0,284
R_{1080}	$0{,}001x^{1{,}659}$	**0,633**	$0{,}002x^{1{,}458}$	**0,601**	$0{,}014x^{1{,}055}$	**0,288**
Cocientes						
R_{730}/R_{710}	$0{,}208x^{1{,}530}$	0,588	$0{,}183x^{1{,}301}$	0,520	$0{,}283x^{1{,}312}$	0,526
R_{760}/R_{550}	$0{,}097x^{1{,}077}$	0,691	$0{,}096x^{0{,}928}$	0,631	$0{,}148x^{0{,}935}$	0,634
R_{760}/R_{710}	$0{,}184x^{0{,}954}$	0,686	$0{,}167x^{0{,}823}$	0,628	$0{,}258x^{0{,}829}$	0,631
R_{760}/R_{730}	$0{,}199x^{2{,}150}$	0,702	$0{,}176x^{1{,}885}$	0,681	$0{,}272x^{1{,}898}$	0,683
R_{780}/R_{450}	$0{,}061x^{0{,}836}$	0,644	$0{,}065x^{0{,}716}$	0,579	$0{,}101x^{0{,}721}$	0,583
R_{1080}/R_{730}	$0{,}089x^{2{,}586}$	**0,721**	$0{,}082x^{2{,}340}$	**0,712**	$0{,}126x^{2{,}352}$	**0,713**
Dif. Norm.						
$(R_{730}-R_{780})$	$0{,}27e^{-2{,}756x}$	0,490	$0{,}22e^{-2{,}528x}$	0,512	$0{,}34e^{-2{,}539x}$	0,511
$(R_{760}-R_{550})$	$1{,}575x^{2{,}445}$	0,698	$1{,}064x^{2{,}107}$	0,644	$1{,}669x^{2{,}124}$	0,647
$(R_{760}-R_{710})$	$1{,}266x^{1{,}121}$	0,660	$0{,}881x^{0{,}965}$	0,608	$1{,}380x^{0{,}973}$	0,611
$(R_{870}-R_{730})$	$3{,}04x^{1{,}378x}$	**0,780**	$1.940x^{1.220}$	**0,750**	$3{,}01x^{1{,}220x}$	**0,752**
$(R_{950}-R_{730})$	$4{,}250x^{1{,}688}$	0,760	$2{,}638x^{1{,}503}$	0,742	$4{,}154x^{1{,}512}$	0,750
$(R_{1080}-R_{730})$	$5{,}238x^{2{,}053}$	0,729	$3{,}222x^{1{,}842}$	0,730	$5{,}074x^{1{,}853}$	0,730

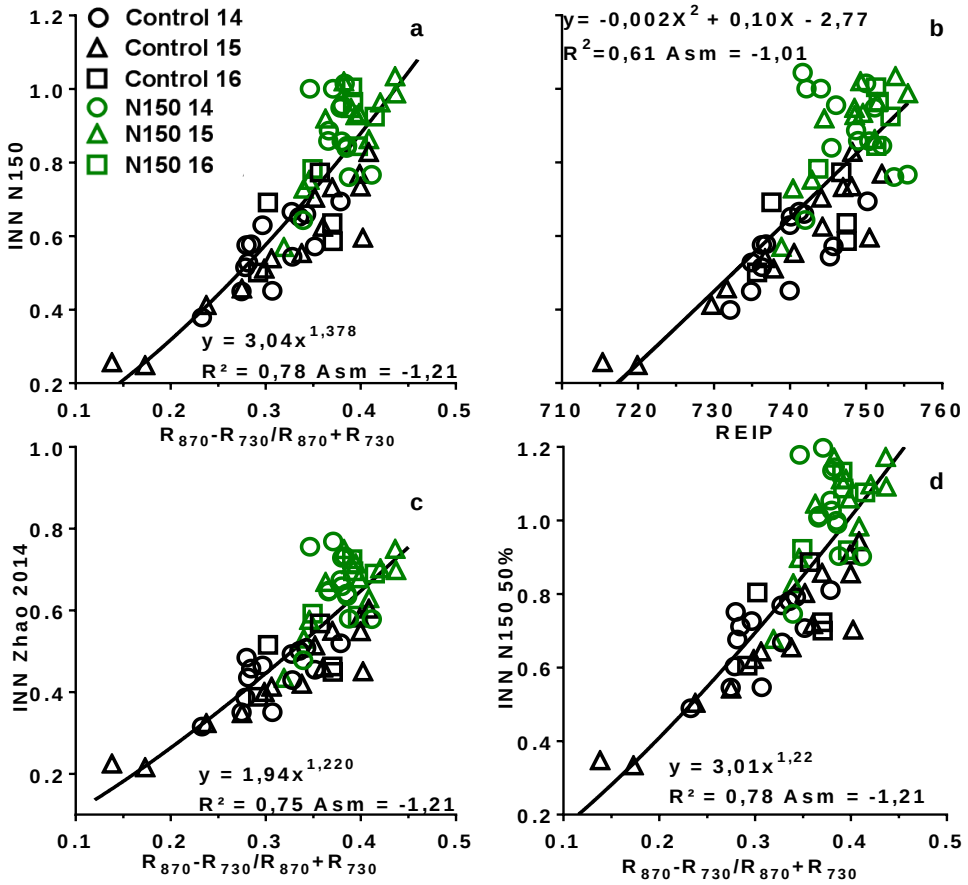


Figura 3.5: Relación entre el INN calculado a partir de la curva ajustada al tratamiento N150 y la diferencia normalizada R_{870} - R_{730} (a). Relación entre el INN calculado a partir de la curva ajustada al tratamiento N150 y el índice REIP (b). Relación entre el INN calculado a del 50% inferior del tratamiento N150 y la diferencia normalizada R_{870} - R_{730} (c). Relación entre el INN calculado a partir de la curva de Zhao, 2014 y la diferencia normalizada R_{870} - R_{730} (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x.

3.3.2 Relaciones entre mediciones en antesis con el cultivo a cosecha final

El rendimiento se relacionó significativamente a varios índices espectrales, y OSAVI, al igual que para el crecimiento pre-antesis, explicó mejor las variaciones en este parámetro (Cuadro 3.5; Figura 3.6). Además, el rendimiento se relacionó a la reflectancia en varias bandas, donde R_{780} ajustó mejor. Los cocientes de bandas y diferencias normalizadas mejoraron la relación respecto a índices y bandas individuales (Cuadro 3.6; Figura 3.6). El cociente R_{730}/R_{710} y la diferencia normalizada R_{730}-R_{710} se relacionaron mejor al rendimiento, superando al índice OSAVI en términos de R^2. El cociente R_{730}/R_{710} tuvo la distribución más homogénea respecto a índices y a la diferencia normalizada (Figura 3.6).

Cuadro 3.5: Relación entre el rendimiento, proteína y N absorbido final con índices espectrales descriptos en trabajos previos. Se muestran los valores de R^2 en aquellas relaciones que resultaron significativas (p<0,05), (ns: regresión no significativa; valor p>0,05). Los valores de R^2 en negrita corresponden a las regresiones que mejor explicaron cada una de las variables.

Índice	**Rend. (Mg ha^{-1})**		**Proteína (%)**		**Nabsfinal (kg N ha^{-1})**	
	Ecuación	R^2	Ecuación	R^2	Ecuación	R^2
NDVI	$7{,}367x^{1{,}832}$	0,521	Ns	ns	$4{,}76e^{3{,}506x}$	0,760
GNDVI	$9{,}933x^{4{,}007}$	0,551	Ns	ns	$1{,}511e^{5{,}536x}$	0,789
REIP	$1x10^{-9}e^{0{,}03x}$	0,459	$0{,}009e^{0{,}009x}$	**0,147**	$4x10^{-13}e^{0{,}04x}$	0,766
TCARI	ns	ns	Ns	ns	ns	ns
OSAVI	$0{,}527e^{2{,}416x}$	**0,576**	Ns	ns	$192{,}1x^{2{,}002}$	**0,772**
MCARI	$0{,}929x^{0{,}638}$	0,403	Ns	ns	$408{,}9x^{0{,}798}$	0,513
MTVI	$8{,}897x^{0{,}887}$	0,522	Ns	ns	$184.7x^{1{,}189}$	0,742
TCARI/OSAVI	$0{,}588x^{-1{,}258}$	0,416	Ns	ns	$4{,}924x^{-1{,}671}$	0,571
MCARI/OSAVI	$14{,}56x^{0{,}660}$	0,167	Ns	ns	$310{,}4x^{0{,}805}$	0,206
TCARI/MTVI	$1{,}084x^{-1{,}030}$	0,537	Ns	ns	$11.29x^{-1{,}134}$	0,791
MCARI/MTVI	$10{,}37x^{0{,}839}$	0,550	Ns	ns	$223.4x^{1{,}105}$	0,760
SPAD	$0{,}009x^{1{,}688}$	0,428	Ns	ns	$0{,}023x^{2{,}209}$	0,563
SPAD rel.	ns	ns	Ns	ns	$106{,}2x^{3.814}$	0,482

Cuadro 3.6: Relación entre rendimiento, proteína y N absorbido en grano con bandas, cocientes y diferencias normalizadas entre bandas. Para los cocientes de bandas y las diferencias normalizadas se muestran sólo los que presentaron mejor ajuste con cada variable. Se muestran los valores de R^2 en aquellas relaciones que resultaron significativas (p<0,05), (ns: regresión no significativa: valor p>0,05). Los valores de R^2 en negrita corresponden a las regresiones que mejor explicaron cada una de las variables.

Predictor	**Rend. (Mg ha^{-1})**		**Proteína (%)**		**Nabsfinal (kg N ha^{-1})**	
Reflectancia	Ecuación	R^2	Ecuación	R^2	Ecuación	R^2
R_{450}	$12{,}80x^{-1{,}076}$	0,280	Ns	ns	$332{,}3x^{-1{,}608}$	0,451
R_{550}	$45{,}44x^{-1{,}194}$	0,254	ns	ns	$1929x^{-1{,}699}$	0,376
R_{780}	$0{,}065x^{1{,}199}$	**0,466**	ns	ns	$0{,}211x^{1.868}$	**0,652**
R_{1080}	$0{,}032x^{1{,}346}$	0,331	$1{,}535x^{0{,}473}$	**0,154**	$0{,}028x^{2{,}121}$	0,639
Cocientes						
R_{730}/R_{710}	$1{,}326x^{1{,}744}$	**0,633**	ns	ns	$16.82x^{2{,}153}$	0,746
R_{760}/R_{550}	$0{,}758x^{1{,}083}$	0,594	$5{,}892x^{0{,}248}$	0,120	$6{,}89x^{1{,}141}$	**0,809**
R_{760}/R_{710}	$1{,}436x^{0{,}961}$	0,578	ns	ns	$18{,}23x^{0{,}164}$	0,739
R_{760}/R_{710}	$1{,}902x^{1{,}825}$	0,436	$6{,}937x^{0{,}521}$	0,135	$19{,}87x^{2{,}734}$	0,729
R_{780}/R_{450}	$0{,}494x^{0{,}828}$	0,540	ns	ns	$4{,}173x^{1{,}081}$	0,705
R_{1080}/R_{730}	$1{,}475x^{1{,}661}$	0,242	$4{,}982x^{0{,}800}$	0,188	$8{,}955x^{2{,}983}$	0,623
R_{1220}/R_{730}	ns	ns	$6{,}021x^{1{,}036}$	**0,214**	ns	ns
Dif. norm.						
$(R_{730}-R_{710})$	$1{,}206e^{3.959x}$	**0,643**	ns	ns	$397{,}4x^{1.445}$	0,757
$(R_{760}-R_{550})$	$0{,}312e^{3.994x}$	0,597	ns	ns	$289{,}3x^{3{,}274}$	0,790
$(R_{760}-R_{710})$	$1{,}105e^{2.698x}$	0,589	ns	ns	$216{,}3x^{3{,}232}$	0,746
$(R_{870}-R_{730})$	$20{,}73x^{1.2325}$	0,508	$14{,}3x^{0{,}403}$	0,159	$639{,}1x^{1{,}759}$	**0,802**
$(R_{950}-R_{730})$	$1{,}397e^{3.997x}$	0,324	$4{,}86e^{1{,}876x}$	0,239	$821{,}1x^{1{,}997}$	0,687
$(R_{1080}-R_{730})$	$23{,}27x^{1.453}$	0,300	$19{,}93x^{0{,}775}$	**0,268**	$1022x^{2{,}404}$	0,649

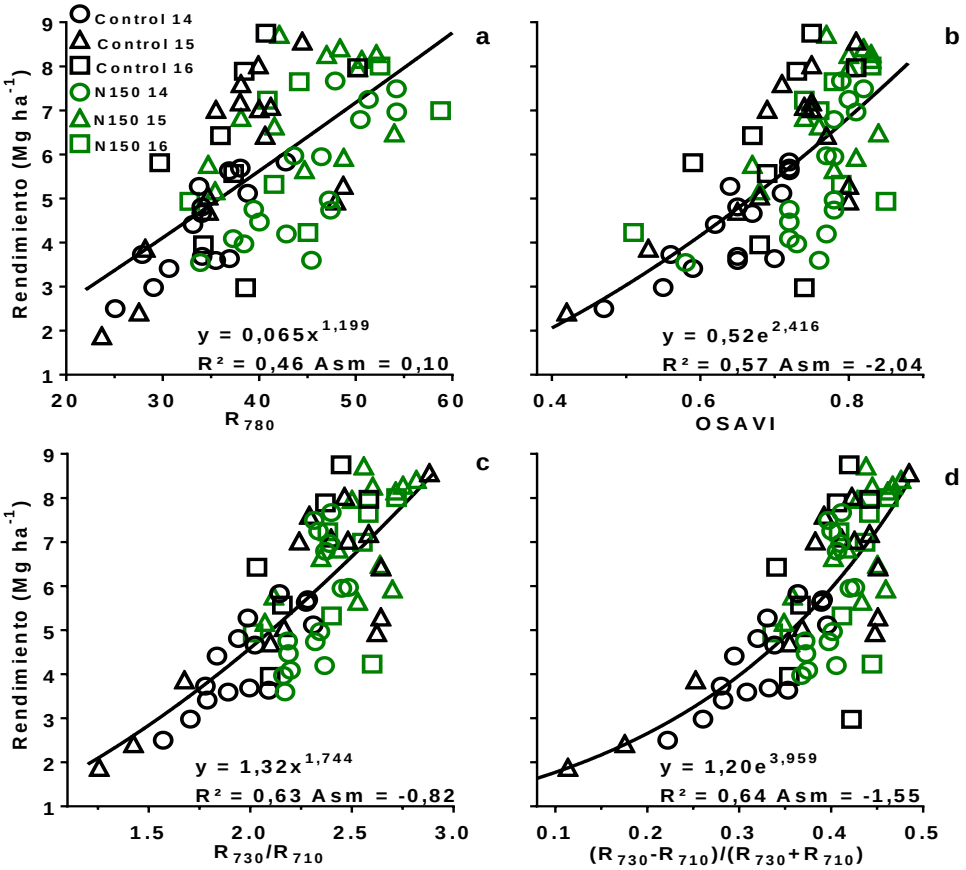


Figura 3.6: Relación entre el rendimiento y la banda R_{780} (a), índice OSAVI (b), cociente R_{1080}/R_{730} (c) y diferencia normalizada ($R8_{70}$-R_{730}) (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x.

Si bien el rendimiento se relacionó a varios índices, medidos al momento de antesis, dicha asociación se estimó con mayor precisión mediante la combinación lineal de índices espectrales descriptos en la Ecuación 3.1 (R^2= 0,64 de la diferencia normalizada R_{730}-R_{710} vs R^2= 0,81 del modelo de regresión múltiple). Las variables de suelo en antesis (N disponible y Humedad) no fueron retenidas en el modelo.

Ecuación 3.1:

Rendimiento (Mg ha^{-1}) = 21+3,34*(R_{730}/R_{550})-10,62*(R_{1080}/R_{730})-16,91*GNDVI–0,93*(R_{710}/R_{500})

R^2 = 0,81 n = 65

El rendimiento estimado se ajustó al observado, la pendiente de la función no fue diferente de 1 y la ordenada al origen no fue diferente de 0 (p<0,05).

El N absorbido total se relacionó significativamente a varios índices (Cuadro 3.5). En general se observó una tendencia a la saturación con altos valores de N absorbido, que se reflejó en una alta asimetría en la distribución de los valores de los índices (eje x de las figuras). Entre los índices, el OSAVI explicó mejor las variaciones en el N absorbido final, aunque tuvo una clara dispersión de los datos hacia altos valores (Figura 3.7b). En cuanto a las reflectancias individuales, la banda R_{780} tuvo la mejor relación, seguida de la R_{1080}

(Cuadro 3.5; Figura 3.7a). Las relaciones entre bandas, ya sea en forma de cocientes o diferencias normalizadas estimaron mejor el N absorbido final que las bandas individuales e índices espectrales. Además de su relación significativa con el N absorbido total, tanto el cociente R_{760}/R_{550} como la diferencia normalizada (R_{870} - R_{730}) tuvieron una distribución menos asimétrica comparado con el índice OSAVI (Cuadro 3.6; Figuras 3.7c y 3.7d).

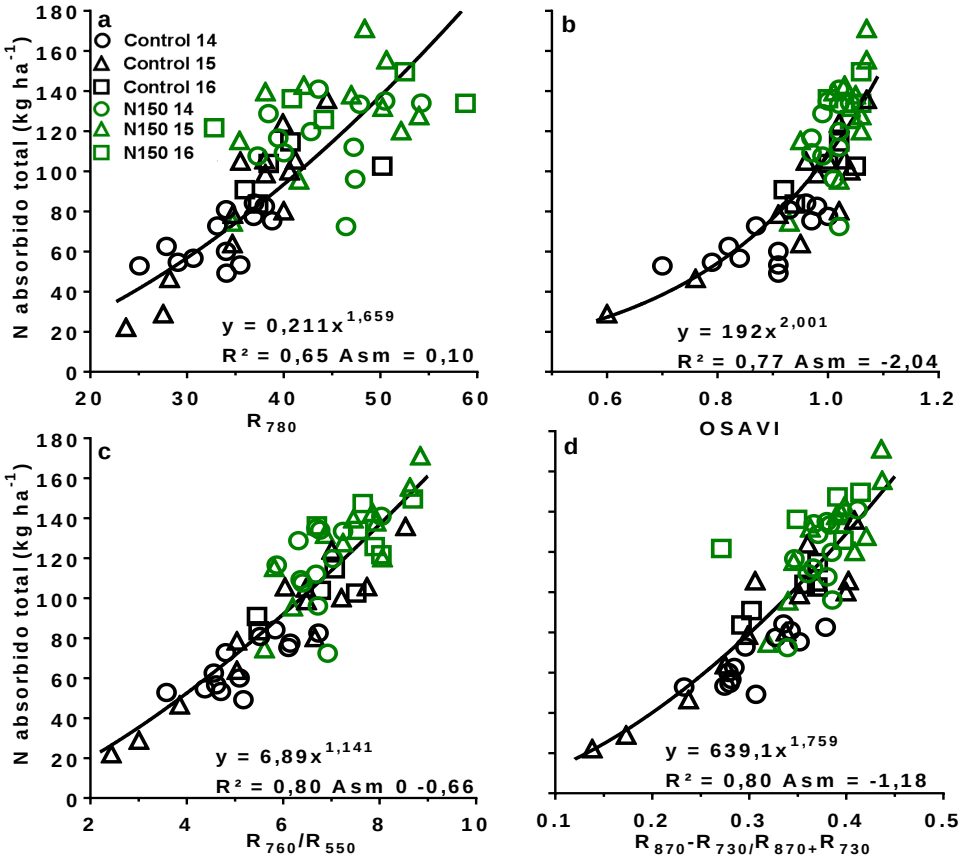


Figura 3.7: Relación entre el N absorbido total y la reflectancia en la banda R_{780}(a), índice OSAVI (b), cociente R_{760}/R_{550}(c) y diferencia normalizada R_{870}-R_{730} (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x.

La proteína en grano solo se relacionó significativamente al índice REIP, mientras que con el resto de los índices probados las relaciones no resultaron significativas (Cuadro 3.5; Figura 3.8b). Solo la reflectancia en la banda R_{1080} se relacionó a la proteína. Varios cocientes y diferencias normalizadas tuvieron una mejor relación que las reflectancias y los índices. El cociente R_{1220}/R_{730} y la diferencia normalizada R_{1080}-R_{730} ajustaron mejor, aunque explicaron menos del 30% de las variaciones en la proteína (R^2 <0,30) (Cuadro 3.6; Figuras 3.8c y 3.8d).

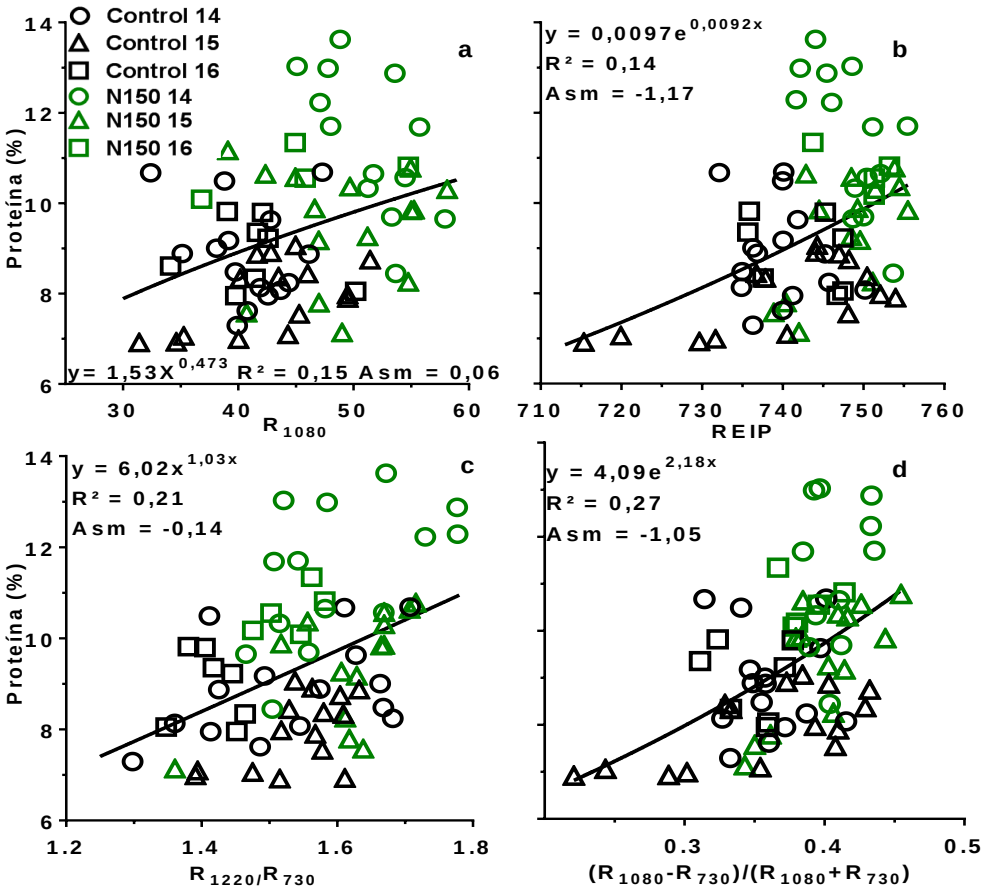


Figura 3.8: Relación entre la proteína y la banda R_{1080} (a), índice REIP (b) cociente R_{1220}/R_{730} (c) y diferencia normalizada R_{1080}-R_{730} (d). Asm: asimetría de la distribución de la variable x.

La relación entre la proteína y la diferencia normalizada (R_{1080} - R_{730}), fue afectada por la proporción del N final en grano que provino de la removilización. Al igual que la relación entre el contenido de N en planta y la proteína (Capítulo 2; Figura 2.16), en los sitios donde la contribución de la removilización fue mayor, el índice medido en antesis, explicó la proteína mejor (R^2= 0,52 vs. R^2= 0,36), respecto a los sitios donde aporte por removilización fue menor (Figuras 3.9a y 3.9b).

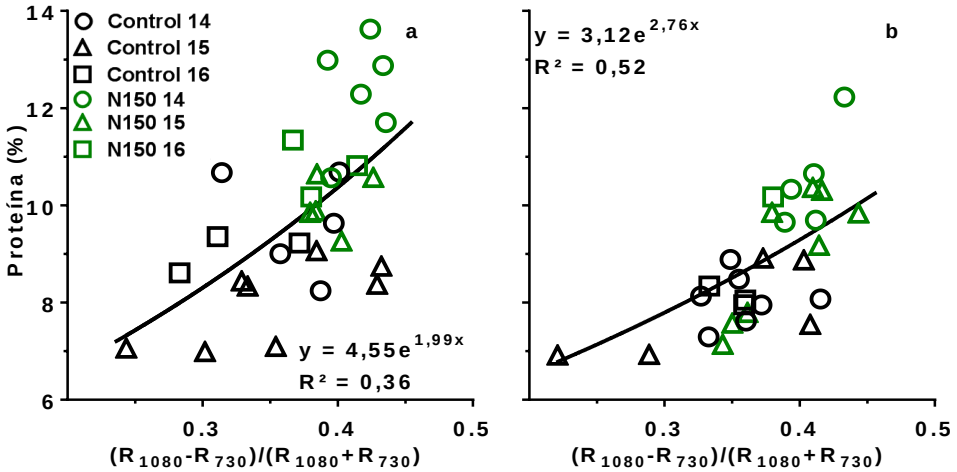


Figura 3.9: Relación entre la proteína en grano y la diferencia normalizada (R_{1080} - R_{730}), agrupados en función de la proporción del N total en grano aportada por la removilización de N. (a) corresponde al 50% de los sitios que tuvieron la menor proporción de N en grano aportado por la removilización. (b) corresponde al 50% de los sitios que tuvieron la mayor proporción de N en grano aportado por la removilización.

Con una combinación de índices y variables de suelo en antesis se estableció un modelo para estimar el contenido de proteína en grano, entre las variables de suelo en el modelo solo fue retenida la humedad de suelo en antesis:

Ecuación 3.2:
Proteína (%)= 4,1 – 9,21* (R_{730}-R_{780}/R_{730}+R_{780}) + 4,46*(R_{1220}/R_{730}) - 0,01 Humedad (mm) – 1,34*(R_{610}/R_{450})
Humedad: Contenido de agua en el suelo en antesis (0-100cm)
R^2= 0,54; n= 58

Usando solo índices se estimó la proteína con un ajuste menor al modelo anterior:
Ecuación 3.3:
Proteína (%)= -0,21– 10,33* (R_{730}-R_{780}/R_{730}+R_{780}) + 3,96*(R_{1220}/R_{730})
R^2= 0,42; n= 72

Los valores de proteína estimados por ambos modelos se relacionaron a los valores observados, en ambos casos las pendientes no resultaron diferentes de 1 y las ordenadas al origen no resultaron diferentes de 0 (p<0,05).

En el Capítulo anterior, se observó que la proteína en grano se relacionó con el N disponible al inicio del cultivo por unidad de rendimiento (Figura 2.15d, R^2 = 0,67), y con el N absorbido por unidad de rendimiento (Figura 2.15c, R^2 = 0,86). Se evaluó la relación entre la proteína y estos dos cocientes estimando las variables que no se conocen hasta la cosecha del cultivo (i.e. rendimiento y N absorbido). El rendimiento se estimó mediante el modelo lineal que combinó cuatro índices espectrales medidos en antesis (Ecuación 3.1) y el N absorbido mediante el cociente R_{760}/R_{550}, que tuvo el mejor ajuste entre los índices probados (Figura 3.7c), de la siguiente manera: Nabsfinal = 6,825*(R_{760}/R_{550})^{1,4469}.

En el caso del cociente entre N disponible y rendimiento estimado, su relación con la proteína en grano no fue diferente de la obtenida en el capítulo 2 con el cociente N disponible y rendimiento medido (valor *p* de la comparación de pendiente 0,93; valor *p* de la comparación de ordenadas al origen 0,78), el valor de R^2 resultó muy similar a la relación observada en el Capítulo 2 (Figura 3.10a). Según esta relación, para obtener un 10% de proteína de deben disponer de al menos 25,5kg de N por Mg de rendimiento estimado. En el caso del cociente entre N absorbido y Rendimiento (ambos estimados), su relación con la proteína en grano fue más débil que la obtenida con ambas variables medidas (R^2= 0, 86 vs R^2= 0, 47; Figura 3.10b) y más débil que la obtenida con el cociente entre el rendimiento estimado y el N medido al inicio.

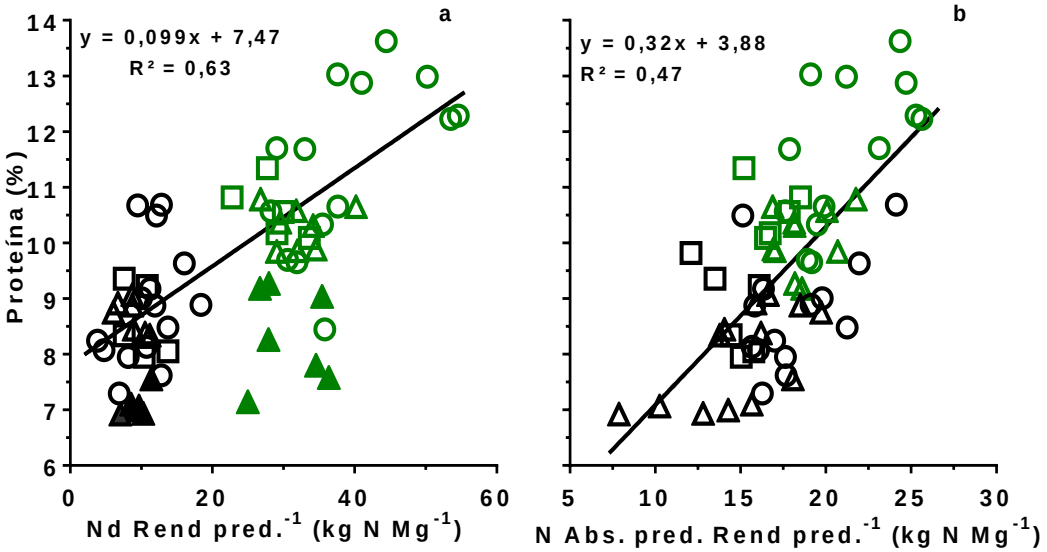


Figura 3.10: Relación entre la proteína con el estimador Nitrógeno disponible (Nd) por Mg de rendimiento estimado (a), los puntos llenos corresponden a los sitios que fueron excluidos de la regresión, al igual que en el Capítulo 2. Relación entre la proteína con la cantidad de N absorbido final estimado por Mg de rendimiento estimado (b).

Los índices espectrales no se relacionaron a la respuesta del cultivo, tanto en rendimiento como en proteína, a la aplicación foliar de N. Para todas las variables evaluadas, las funciones ajustadas no fueron diferentes para los tratamientos Control y N150. Los índices relativos al tratamiento N150 no mejoraron la estimación de ninguna de las variables evaluadas. Con algunos de los índices relativos se obtuvieron ajustes similares a los índices directos, aunque se descartaron por incluir solo al tratamiento Control.

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 Relación entre índices espectrales y el estado del cultivo en antesis

El crecimiento pre-antesis se relacionó a varios de los índices de vegetación descriptos en trabajos previos (Cuadros 3.2 y 3.3; Figura 3.2). Las diferencias normalizadas NDVI y GNDVI se relacionaron con la biomasa, que refleja el crecimiento del cultivo, como

fue observado previamente en cereales en numerosos trabajos (Kleman & Fagerlund, 1987; Gitelson et al., 1996; Lukina et al., 1999; Huete et al., 2002; Broge & Leblanc, 2002; Raun et al., 2002; Fox & Walthal, 2008; Fitzgerald et al., 2010; Kanke et al., 2012). A pesar de tener un alto valor de R^2, ambos índices mostraron una distribución asimétrica, indicando que tendieron a saturarse con altos valores de biomasa (mayores a 500 g m^{-2}, correspondientes a valores de NDVI mayores a 0,9), principalmente en el tratamiento N150, como fue reportado en varios trabajos (Barnes et al., 2000; Haboudane et al., 2004; Fox Walthal, 2008; Erdle et al., 2011). El índice OSAVI, propuesto por Rondeaux et al., (1996), resultó mejor estimador de la biomasa comparado con las diferencias normalizadas, por su mayor R^2 y ligeramente menor asimetría, aunque también mostró una tendencia a saturarse. El mejor ajuste del índice OSAVI podría estar relacionado a una mayor corrección del efecto del color del suelo, principalmente cuando existen diferentes grados de cobertura por parte del cultivo, generados por los distintos ambientes, como fue sugerido por Rondeaux et al., (1996). El crecimiento pre-antesis se relacionó a la reflectancia de varias bandas individuales (Cuadro 3.3), las bandas del infrarrojo cercano explicaron mejor las variaciones en este parámetro. La reflectancia medida en la banda R_{780} tuvo un ajuste más robusto, como fue reportado previamente en cultivos de poroto (Filella & Penuelas, 1994). El agregado de una segunda reflectancia, en forma de cociente o diferencia normalizada mejoró el ajuste (i.e. el cociente R_{780}/R_{450} y la diferencia normalizada R_{760}-R_{710}). Si bien el ajuste resultó similar al del índice OSAVI, el cociente R_{780}/R_{450} mostró una mejor distribución de las observaciones, sin tendencia a saturarse y explicó mejor las variaciones en el crecimiento pre-antesis observadas (Cuadro 3.3; Figura 3.2).

El contenido de N en biomasa aérea, que fue la característica del cultivo en antesis que mejor explicó la proteína en grano, mostró una débil relación con índices de trabajos previos, el índice REIP explicó mejor las variaciones en el contenido de N en planta (Cuadro 3.3; Figura 3.1). Boegh et al., 2002, en varios tipos de cultivos, determinaron que el índice REIP se relaciona al contenido de N en canopeo, aunque en la presente tesis el ajuste resultó inferior al reportado por los autores. La pobre relación del contenido de N con índices espectrales coincide con varios trabajos donde observaron que la relación de los índices, como NDVI con el N en planta es débil (Lukina et al., 1999; Li et al., 2014). El contenido de N se relacionó a la reflectancia en la banda R_{1080} y en menor medida a la reflectancia en la banda R_{780}, ambas bandas corresponden a la región NIR del espectro (Cuadro 3.3; Figura 3.3). Trabajos previos sugieren bandas del borde del rojo como estimadores del contenido de N en canopeo. Thenkabail et al., (2011), en varios cultivos, observaron que bandas de la región de R_{680} tienen mayor sensibilidad al contenido de clorofila. Lee et al., (2008), en arroz, observó que el contenido de N se relacionó a una banda similar (R_{735}). Sin embargo, en el presente trabajo, bandas cercanas a las descriptas no se relacionaron significativamente al contenido de N en antesis (Cuadro 3.3).

La relación entre el contenido de N y la reflectancia en la banda R_{1080} fue más robusta cuando se agregó la reflectancia en la banda R_{730}, correspondiente al borde de rojo, tanto en forma de cociente como de diferencia normalizada. Además de su valor de R^2, este cociente tuvo una distribución más homogénea que el REIP (Cuadro 3.3; Figura 3.3). La mejor relación al agregar la banda R_{730} se debería a que, según Gitelson et al. (2003), es la longitud de onda de mayor sensibilidad al contenido de clorofila en hojas. Cocientes entre bandas del

infrarrojo/borde de rojo fue propuesto por Ferwerda et al., 2005 como estimador del contenido de N en varias especies, aunque las bandas usadas en este trabajo (R_{1080}/R_{730}) resultaron diferentes a las reportadas por el autor (R_{1770}/R_{693}). En línea con los resultados observados, algunos trabajos sugieren que bandas del infrarrojo cercano, hasta 1500 nm se relacionan a la clorofila en hoja y por lo tanto permiten estimar el contenido de N en el canopeo (Kumar, 2006; Loozen et al., 2019). Contrariamente a lo observado, varios trabajos previos sugieren cocientes o diferencias normalizadas entre bandas de alrededor de borde del rojo, entre 680 y 750 nm, como estimadores del contenido de N en planta en diversos cultivos como arroz (Inoue et al., 2012) y trigo (Elsayed et al., 2018). Sin embargo, en este trabajo éstas se relacionaron débilmente al contenido de N (Cuadro 3.3). Los cocientes entre bandas del borde de rojo (700 a 750nm) y bandas de 500 a 750 nm, sugeridos por varios trabajos como estimadores de la clorofila, (Elsayed et al., 2018; Mistele & Schmidhalter, 2008) se relacionaron significativamente al contenido de N (Cuadro 3.4), pero con un menor R^2 que el cociente R_{1080}/R_{730} descripto en el presente estudio. Los índices TCARI, MCARI y los cocientes entre estos índices propuestos por varios autores (Haboudane et al., 2002 y 2004; Daughtry et al., 2000; Cilia et al., 2014), como estimadores del contenido de clorofila a nivel de canopeo en maíz no se relacionaron al contenido de N (Cuadro 3.2). Según lo descripto por Haboudane et al., 2002, la falta de relación entre índices y contenido de N en el canopeo puede deberse a diferencias de cobertura del suelo. Sin embargo, las diferencias de crecimiento entre los diferentes sitios, al momento de realizar las mediciones no influyó las relaciones ya la separación de los cultivos entre situaciones de mayor y menor crecimiento al momento de la medición no mejoró la estimación del contenido de N (relaciones no mostradas).

El N absorbido pre-antesis se relacionó a varios índices, tal como fue descripto en varios trabajos (Gitelson & Merzlyak, 1997; Moges et al., 2005; Fox & Walthal, 2008). El NDVI, uno de los índices más usados como estimador del N absorbido, se relacionó con esta variable, como fue observado en trigo por otros autores (Lukina et al., 1999; Raun et al., 2002; Stone et al., 1996). Aunque, al igual que la relación con el crecimiento, mostró una marcada asimetría y se saturó a altos niveles de N absorbido (valores mayores a 60 kg ha^{-1}, correspondientes a valores de NDVI cercanos a 0,85). Este inconveniente en el uso del NDVI en el diagnóstico de la nutrición nitrogenada fue observado previamente (Fox & Walthal, 2008; Erdle et al., 2013). Entre los índices reportados en bibliografía REIP resultó el mejor estimador, coincidiendo con otros trabajos (Mistele & Schmidhalter, 2008; Erdle et al., 2011). Además de los índices, el N absorbido se relacionó significativamente a la reflectancia en varias bandas, principalmente de borde rojo e infrarrojo cercano como fue observado en cereales (Feng, 2014), con un mayor ajuste en el caso de la banda R_{780}. Los cocientes y diferencias normalizadas entre estas bandas y bandas tanto del infrarrojo cercano como del espectro visible se relacionaron significativamente al N absorbido como fue descripto en varios trabajos previos (Carter et al., 1996; Gitelson & Merzlyak 1997; Erdle et al., 2011). La diferencia normalizada R_{870}-R_{730} fue el índice que mejor explicó las variaciones en el N absorbido, logrando un ajuste levemente superior a los índices descriptos en otros estudios.

Para el caso de los INN calculados, al igual que el N absorbido pre-antesis, la diferencia normalizada R_{870}-R_{730} fue el índice que mejor se relacionó a los INN evaluados (Figura 3.5). También el cociente $R_{1080}/R_{730,}$ que fue el mejor estimador del contenido de N

en antesis se relacionó a los INN con un ajuste levemente inferior a la diferencia normalizada R_{870}-R_{730}. El índice REIP, propuesto por Mistele & Schmidhalter, 2008 como estimador del INN en trigo, se relacionó significativamente a los INN calculados, aunque el ajuste fue inferior a la diferencia normalizada R_{870}-R_{730} (R^2 0,54 vs R^2 0,78: Cuadro 3.5).

El rendimiento se relacionó a varios índices medidos en antesis (Cuadro 3.5). El índice OSAVI tuvo el mejor ajuste, superando a NDVI, índice más comúnmente usado para predecir el rendimiento (R^2= 0,57 vs R^2= 0,52), aunque NDVI también tuvo una buena relación coincidiendo con varios trabajos (Hansen et al., 2000; Moges et al., 2005; Pettersson et al. 2006). El mejor ajuste del OSAVI se debió a su relación con el crecimiento pre-antesis (Cuadro 3.3; Figura 3.2), característica del cultivo que estuvo directamente relacionada al rendimiento (Capítulo 2; Figura 2.2a). La relación del rendimiento con el índice OSAVI medido en antesis fue reportada previamente, en cebada (Pettersson et al., 2006). En algodón, también se observó que el OSAVI fue mejor estimador del rendimiento que el NDVI (Zarco Tejada et al., 2005). El cociente y la diferencia normalizada entre las bandas R_{730} y R_{710} resultaron los mejores estimadores del rendimiento (Figuras 3.6c y 3.6d). Ambos índices calculados en este trabajo explicaron las variaciones en rendimiento mejor que índices de bibliografía (R^2= 0,64 de la diferencia normalizada R_{730} - R_{710} vs R^2= 0,57 del índice OSAVI). Además, los cocientes de bandas tuvieron una distribución menos asimétrica respecto al OSAVI y no mostraron tendencia a la saturación en altos valores rendimiento, como se observó en varios índices (Figuras 3.6c y 3.6d). A pesar de que el mejor estimador del crecimiento pre-antesis fue el cociente (R_{780}/R_{450}), este tuvo una relación levemente inferior con el rendimiento respecto a la diferencia normalizada R_{730} - R_{710} (Cuadro 3.5). La regresión múltiple usando varios índices espectrales mejoró la estimación del rendimiento respecto a índices individuales (R^2= 0,81 vs R^2= 0,64 de la diferencia normalizada R_{730}-R_{710}). En la regresión se incluyeron 3 índices relacionados al crecimiento pre-antesis (R_{730}/R_{550}, GNDVI y R_{710}/R_{500}), uno de ellos con coeficiente positivo y dos de ellos con coeficiente negativo. Además, incluye un índice relacionado al contenido de N (R_{1080}/R_{730}), con un coeficiente negativo. Los parámetros de suelo en antesis (N disponible y humedad) no fueron retenidos en el modelo, por lo tanto, se logró predecir adecuadamente el rendimiento solo con índices espectrales, como fue descripto previamente en cebada (Pettersson et al., 2006) y en trigo (Serrano et al., 2000; Chandel et al., 2019).

El N absorbido total a cosecha se relacionó significativamente a varios índices y, al igual que para el N absorbido pre-antesis, el índice OSAVI explicó mejor las variaciones en la cantidad de N absorbido, también se relacionó a los índices REIP, NDVI y GNDVI (Cuadro 3.5). Trabajos anteriores en trigo (Freeman et al., 2003; Xue et al., 2007), observaron que el NDVI es un buen estimador del N absorbido total. Sin embargo, en el presente trabajo, fue superado por el OSAVI, debido a la distribución asimétrica del NDVI que se satura en altos valores de N absorbido total (mayores a 80 kg ha^{-1}). Las relaciones de los índices con el N absorbido total se deben a su relación con el N absorbido pre-antesis (Cuadro 3.3; Figura 3.4), principal determinante del N absorbido final (Capítulo 2; Figura 2.8a). La reflectancia en la banda R_{780} explicó mejor las variaciones en este parámetro, debido a su mayor relación con el N absorbido pre-antesis (Cuadro 3.3). El cociente R_{760}/R_{550} tuvo un mejor ajuste respecto a otros cocientes como R_{760}/R_{710} propuesto por Erdle et al., 2011 como estimador del N absorbido en cereales, además tuvo una mejor distribución. La diferencia normalizada

(R_{870}-R_{730}) tuvo una relación similar al cociente R_{760}/R_{550}, aunque su distribución fue menos homogénea (Figura 3.7).

La proteína tuvo una débil relación tanto con índices utilizados en estudios previos como con la reflectancia en bandas individuales (Cuadros 3.5 y 3.6; Figura 3.8). Previamente se observó que índices espectrales medidos una vez durante el ciclo del cultivo, cerca del momento de antesis no estimaron adecuadamente la proteína, tanto en cebada, (Hansen et al., 2002), como en trigo (Freeman et al., 2003). Entre los índices evaluados, REIP se relacionó débilmente al contenido de proteína de los granos (Cuadro 3.5). En otros trabajos (Söderström et al., 2010; Pettersson et al., 2006), también observaron relaciones significativas entre el REIP y el contenido proteico en grano en cebada. Pettersson et al., (2006), observaron un mejor ajuste entre el índice REIP y la proteína que en el presente trabajo, debido probablemente, a la menor variabilidad ambiental (un único sitio durante tres años), donde solo se modificó la disponibilidad de N mediante fertilización. La baja relación obtenida entre la proteína y los índices se debe a que el contenido de N en antesis, principal determinante de la proteína (Capítulo 2; Figura 2.15a), tuvo, en general, una débil relación con la reflectancia (Figura 3.2). El índice TCARI no se relacionó al contenido proteico (Cuadro 3.4), contrariamente a lo reportado previamente donde se observó una relación negativa entre el TCARI y la proteína (Pettersson & Eckersten, 2007). En general en los trabajos analizados, donde se observaron relaciones entre índices, como el REIP, TCARI o algún cociente de ellos y la proteína, la relación observada es puntual (Pettersson et al., 2006; Söderström et al., 2010). En las situaciones puntuales, ensayos donde la variación en el contenido proteico es lograda mediante distintas dosis de N, las relaciones observadas entre algún índice y la proteína puede ser consecuencia de la covariancia de la proteína con otra característica del cultivo, también relacionada a la fertilización, tal como la biomasa, que resulta sensible a los índices espectrales. Esta razón puede explicar la falta de relación de los índices descriptos con la proteína en una red, como la evaluada en la presente tesis, donde la proteína está determinada por numerosos factores, principalmente por el aporte de N al grano por removilización. Los cocientes y diferencias normalizadas evaluadas en este trabajo mejoraron la estimación de la proteína respecto a los índices reportados en estudios previos. El mejor estimador resultó ser la diferencia normalizada R_{1080}-R_{730}, debido a su relación con el contenido de N en antesis (Cuadro 3.3; Figura 3.3). El cociente R_{1220}/R_{730}, que se relacionó al contenido de N y no fue afectado por la biomasa en antesis (Cuadro 3.3), resultó también un estimador individual de la proteína en grano (Figura 3.7). Como se observó que la relación entre el contenido de N en antesis y la proteína depende del porcentaje del N en grano que proviene de la removilización (Capítulo 2; Figura 2.16), también la relación entre la proteína y los índices medidos en antesis fue afectada por la contribución de la removilización al N en grano (Figura 3.9), ya que las mediciones en antesis, estiman el status nitrogenado al momento de la medición, pero no estiman la removilización de N ni el aporte desde el suelo.

Debido a que los índices individuales tienen una relativamente baja capacidad de estimar la proteína, se utilizaron los índices para calcular estimadores de la proteína, que previamente descriptos en el capítulo 2. El N absorbido total por unidad de rendimiento es una variable significativamente relacionada a la proteína (Capítulo 2 Figura 2.15c). El cociente entre el N absorbido total estimado con el índice R_{760}/R_{550} y el rendimiento estimado con la Ecuación 3.1 se relacionó a la proteína mejor que los estimadores directos (R^2= 0,47

vs R^2= 0,27 de la diferencia normalizada R_{1080}-R_{730}; Figura 3.10b). La relación obtenida entre la proteína y el N absorbido total por unidad de rendimiento estimado se debe a que ambas variables (rendimiento y N absorbido total) se pudieron estimar con buena precisión mediante los índices descriptos en este capítulo (Cuadro 3.4; Figuras 3.6 y 3.7). Una mejor estimación de la proteína se logró con el cociente entre el N disponible medido al comienzo del ciclo del cultivo y el rendimiento estimado con índices medidos en antesis (con el modelo de regresión múltiple, Ecuación 3.1; Figura 3.6). Por lo tanto, esta relación resultaría útil para estimar la proteína al momento de antesis, a diferencia del N disponible por unidad de rendimiento medido, observada en el Capítulo 2, que resulta explicativa pero no sirve para estimar la proteína en grano al momento de antesis. La función obtenida con el rendimiento estimado mediante índices no fue diferente a la observada con el rendimiento medido (Capítulo 2; Figura 2.15d) y el ajuste resultó similar.

Entre las combinaciones de estimadores de la proteína medidos en antesis evaluados en el presente trabajo, los estimadores que incluyen variables de suelo e índices, como el N disponible por unidad de rendimiento estimado (Ecuación 3.2) explicaron mejor el contenido proteico que los índices y/o combinaciones de índices (Ecuación 3.3). Si se dispone del dato del N disponible al inicio se puede calcular el N disponible por tn de rendimiento usando la Ecuación 3.1 para estimar el rendimiento, mientras que, si no se dispone de datos de suelo, se puede estimar el N absorbido total (Figura 3.7) por tn de rendimiento. En función de la proteína estimada se puede decidir aplicar una fertilización complementaria con N si esta se encuentra por debajo del umbral de calidad (10% de proteína). Debido a la gran variabilidad entre los sitios y los tratamientos, en la red se generó un amplio rango de condiciones de crecimiento, por lo tanto, los índices espectrales descriptos en este capítulo permitieron estimar tanto el rendimiento como la proteína en grano en un amplio rango de condiciones ambientales.

3.5 CONCLUSIONES

Los índices espectrales calculados a partir de la reflectancia del cultivo medida en un período cercano a antesis se relacionaron al crecimiento y al status nitrogenado del cultivo. El crecimiento y el N absorbido pre-antesis se relacionaron a índices utilizados en estudios previos (OSAVI y REIP respectivamente) y también a varios índices desarrollados en este trabajo con un ajuste similar, aunque en general estos últimos mostraron una mejor distribución. Para el contenido de N en planta, los índices previamente reportados tuvieron una relación débil, mientras que el cociente R_{1080}/R_{730} y la diferencia normalizada R_{1080}-$_{730}$, probada en este trabajo, tuvieron una relación más robusta con esta variable. Se cumplió con el objetivo específico planteado “Evaluar el crecimiento, la absorción y el contenido de N en antesis a través de mediciones indirectas (sensor multiespectral portátil)”.

Los índices que se relacionaron al crecimiento pre-antesis explicaron en mayor medida las variaciones en el rendimiento, mientras que las relaciones más robustas entre índices y el N absorbido en grano se lograron con aquellos índices que se relacionaron al N absorbido pre-antesis. Para el caso de rendimiento, la diferencia normalizada R_{730}-R_{710} y el cociente R_{730}/R_{710} desarrollados en este trabajo, tuvieron una relación más robusta que

índices previamente utilizados. Un modelo de regresión múltiple, con varios índices espectrales, explicó las variaciones en rendimiento mejor que índices individuales.

La proteína tuvo una débil relación con índices de referencia y algo mejor con la diferencia normalizada R_{1080}-R_{730}, desarrollada en el presente trabajo, la relación fue más robusta en los casos que la proporción del N en grano aportada por removilización fue mayor. Un modelo de regresión múltiple, que combinó índices espectrales y la humedad de suelo, medidos en antesis, explicó las variaciones en la proteína en grano. La combinación de índices descriptos en este capítulo como estimadores del rendimiento y el N disponible al inicio estimaron la proteína en grano mejor que índices individuales, por lo tanto, el modelo generado en este trabajo, que debería ser validado con datos independientes, podría ser usado como una herramienta de diagnóstico temprano para decidir si una fertilización nitrogenada complementaria para mejorar la calidad del grano es recomendable. Se cumplió el segundo objetivo específico planteado "Predecir la necesidad de fertilización complementaria mediante evaluaciones del estado nutricional del cultivo en antesis obtenidas con el sensor multiespectral". Con los índices desarrollados no parece ser necesario el uso de franjas de referencia, ya que la estimación de las variables de interés agronómico no mejoró con el uso de índices relativizados a un cultivo de referencia.

CAPÍTULO 4: REGULACIÓN DE LA REMOVILIZACIÓN DE N POST-ANTESIS

4.1 INTRODUCCIÓN

Como se mencionó previamente, el aporte más importante de N al grano proviene de la removilización durante el llenado (Hirel et al., 2007; Bieker & Zentgraph, 2013). En pre-antesis todo el N absorbido se almacena en las estructuras vegetativas, principalmente en forma de clorofila y proteínas foliares (Lawlor et al., 1989). La removilización ocurre durante la senescencia foliar que se da en forma simultánea al llenado de grano. La principal característica de esta etapa es el catabolismo de las estructuras fotosintéticas (la clorofila y otras macromoléculas que son degradadas), liberando nutrientes que pueden ser reciclados y destinados, principalmente, a los granos en desarrollo. Entre estas, las proteínas foliares son degradadas por la acción de proteasas a aminoácidos que luego son transportados vía floema para la síntesis de proteínas en los granos (Gan & Amasino, 1997; Hirel, 2007). La senescencia de los tejidos está fuertemente inducida en la última fase del desarrollo de las plantas, mediante sendos cambios en la expresión génica y de actividades enzimáticas. La represión de la transcripción de la clorofila y su marcada disminución de abundancia en las hojas representa uno de los primeros indicadores del inicio de esta etapa metabólica (Parrot et al., 2010). La clorofila es una de las primeras moléculas en ser degradadas al inicio de este proceso (Gregersen et al., 2008). El inicio de la senescencia depende la disponibilidad de N, en general se retrasa bajo condiciones de alta disponibilidad para la planta (Masclaux-Daubresse et al., 2010; Bieker & Zentgraph, 2013). La actividad de las proteasas y la tasa de senescencia aumentan notablemente bajo deficiencia de N (Crafts-Brandner et al., 1998; Parrot et al., 2010). Entre los indicadores del inicio y avance del proceso de senescencia foliar, trabajos previos mostraron que el gen SAG12 es activado durante las últimas etapas de la senescencia vegetal donde alcanza altos niveles de expresión, mientras que no se detecta su expresión en los tejidos no senescentes, por lo que es usado como indicador de la senescencia foliar (Gan & Amasino, 1997; Gregersen et al., 2013; Avice & Etienne, 2014).

La absorción de N en forma inorgánica del suelo, durante el llenado de los granos, constituye otro aporte hacia los granos en crecimiento. Su magnitud es dependiente tanto de la disponibilidad de N en el suelo, como de las condiciones de crecimiento del cultivo que determinan la duración del llenado (Cassman et al., 1992; Przulj & Momčilović, 2003). El N es absorbido en forma inorgánica del suelo, reducido y posteriormente incorporado a aminoácidos tanto en las hojas como en las estructuras reproductivas. El proceso de reducción comprende, la conversión del nitrato a nitrito mediado por la enzima nitrato reductasa y de éste a amonio por la nitrito reductasa. Luego el amonio es asimilado en aminoácidos mediante la acción de la enzima glutamina sintetasa (GS).

La contribución relativa de los procesos de asimilación directa del N y la removilización durante el llenado del grano es variable de una especie a otra y puede ser influenciada por la disponibilidad de N en el suelo en los distintos períodos del desarrollo de las plantas, por el momento de la aplicación del fertilizante y por condiciones ambientales como la luz o estreses bióticos y abióticos. Cuando la disponibilidad de N en el suelo es baja, el proceso de removilización vía floema cobra importancia, en este caso, el N llega al grano principalmente como glutamina y glutamato (Tully & Hanson, 1979) y la removilización se vuelve la principal fuente para el grano en crecimiento (Bieker & Zentagraph, 2013). La

eficiencia de este proceso, entonces, se convierte en el principal determinante del contenido de proteína en grano (Dalling, 1985; Barneix et al., 1992; Veliz et al., 2014).

Se han llevado a cabo numerosos estudios para identificar los pasos limitantes de la absorción, asimilación y removilización del N durante el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Hirel et al., 2007). De estos estudios surgió una diversidad de genes candidatos involucrados en la regulación de la eficiencia en el uso de los nutrientes. Estudios en maíz, arroz y trigo demostraron que la isoforma citosólica de la glutamina sintetasa (GS1), enzima central en la asimilación y transporte del N, se relaciona con la determinación del crecimiento y llenado de los granos (Tabuchi et al., 2005; Bernard & Habash, 2009). En las hojas GS tiene 3 isoformas activas y éstas se regulan diferencialmente. GS1 es la isoforma citosólica de la enzima que se encuentra en hojas y posee dos isoenzimas (GS1_1 y GS1_2), mientras que GS2 es la isoforma cloroplástica. La GS1 cumple la función de asimilar el amonio, proveniente de la absorción directa del N y de la desintegración de proteínas a aminoácidos. La expresión génica depende de la disponibilidad de N (Caputo et al., 2009).

La translocación de los aminoácidos desde los tejidos fuente hacia los tejidos destino puede llevarse a cabo en forma simplática, apoplástica o por ambas vías dependiendo de la especie. En el caso de la vía apoplástica, el transporte es mediado por proteínas transportadoras de aminoácidos pertenecientes a diversas familias génicas (Tegeder, 2012). En base a un estudio de secuencias de distintas familias de genes de transportadores de N, se determinó que la familia de las aminoácido permeasas (AAP) serían los transportadores predominantes en la removilización del N durante el llenado de los granos de cebada (Kohl et al., 2012). Dentro de esta familia se observó, por estudios de homología con secuencias de Arabidopsis y expresión génica en hojas fuente maduras y senesciendo, que los transportadores HvAAP6 y HVAAP7 parecieran cumplir un rol importante en la regulación del transporte por floema (Kohl et al., 2012; Veliz et al., 2017). La expresión de ambos transportadores de aminoácidos es alta en hojas maduras y no caen durante la senescencia, por lo que ambos son buenos candidatos a participar en la regulación de la movilización de aminoácidos por floema durante el llenado.

La comprensión de la removilización de N y su contribución a la proteína en grano resulta clave para mejorar la calidad de los granos sin aumentar la fertilización, aumentando la eficiencia de la removilización. Pese a la importancia del tema, es poco lo que se conoce sobre la regulación fisiológica, bioquímica y genética del proceso de senescencia y removilización de N.

4.1.1 Objetivo específico e hipótesis:

El objetivo de este capítulo es determinar el mecanismo por el cual el N aplicado en antesis es movilizado durante el llenado, su efecto sobre la sobre la regulación de la removilización de N de las hojas hacia los granos, y su relación con el contenido de proteínas establecido en los granos.

Las hipótesis asociadas a este objetivo son:

- La aplicación de N en antesis producirá un aumento, en estados tempranos del llenado, de la movilización vía floema de aminoácidos provenientes de la asimilación del N aplicado, hacia el grano.

-La asimilación del N incorporado en antesis producirá un retraso del inicio de la senescencia, que redundará en un retraso del inicio de la removilización del N almacenado pre-antesis.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal y diseño experimental

Se trabajó sobre 3 ensayos correspondientes a la red experimental descripta en el Capítulo 2, los sitios se ubicaron en 25 de mayo (Sitio 33), Junín (sitio 36) y Arribeños (Sitio 36). El diseño de los experimentos fue en bloques completos aleatorizados, con 4 repeticiones por sitio, y cada parcela experimental tuvo la misma dimensión de que la usada en la red (16 x 4 m). Los suelos se caracterizaron según lo descripto en el Capítulo 2. Además de los tratamientos de la red se agregó el tratamiento N40f, para un total de 4 tratamientos:

- **Control**: sin fertilización adicional a la empleada por el productor (Tecnología de Uso Actual).
- **N20f**: se aplicaron 20 kg ha^{-1} de N en antesis en forma foliar, mediante una pulverizadora manual. Se usó como fuente el fertilizante comercial Foliarsol U (grado 20-0-0), se aplicó puro en una dosis de 100 l/ha.
- **N40f**: se aplicaron 40 kg ha^{-1} de N, divididos en 2 aplicaciones, la primera a los 7 días pre-antesis y la segunda en antesis de igual manera a que para N20f.
- **N150**: se aplicaron 150 kg ha^{-1} de N, en forma de urea granulada, en la etapa de emergencia. El fertilizante se aplicó en forma manual, distribuido uniformemente sobre la superficie.

Para las determinaciones bioquímicas y moleculares se emplearon los tratamientos Control, N20f y N40f, mientras que el tratamiento N150 fue usado como indicador de la limitación de N del cultivo.

4.2.2 Toma de muestras y extracción de los exudados floemáticos

En antesis se muestreó la biomasa aérea y el suelo según lo descripto en el Capítulo 2. Durante el llenado de los granos, a los 7, 14 y 21 días post-antesis se tomaron muestras de hojas y exudados floemáticos de espigas sobre 10 vástagos elegidos al azar en cada parcela. Se tomaron las últimas 2 hojas por debajo de la hoja bandera, se cortaron de la planta y se conservaron en hielo seco durante el viaje y posteriormente en freezer a -50°C. Simultáneamente se tomaron muestras de biomasa aérea (1 metro lineal por parcela) para determinar el crecimiento del cultivo al momento del muestreo. En madurez se tomaron muestras biomasa aérea, sobre las que se midió rendimiento, biomasa final, N en grano y N en rastrojo, según lo descripto en el Capítulo 2.

Para la extracción de los exudados floemáticos se usó la técnica de exudación facilitada descripta por Veliz et al., (2014), para lo cual se cortaron las espigas de los 10 vástagos seleccionados, por sobre el ultimo nudo y se colocaron en tubos conteniendo 5 ml

de solución de ácido etilen-di-amino-tetra-acético (EDTA, 20 mM, pH 8). Se incubaron 15 minutos en oscuridad para lavar los restos celulares del corte efectuado y evitar contaminación con el exudado xilemático. Luego fueron transferidos a otro tubo conteniendo la misma solución de EDTA e incubados por 3 h también en oscuridad para disminuir la traspiración. Trascurrido el tiempo se guardó la solución en tubos y las espigas se guardaron para medir su peso fresco. El valor de exudación se calculó como la cantidad de aminoácidos trasportados en floema por hora por gramo de peso fresco de espiga. La exudación total en llenado se calculó como la integral de la función de la tasa de exudación de aminoácidos en el período de 7 a 21 días post-antesis y se expresó como µg de aminoácido por gramo de peso fresco de espiga.

4.2.3 Determinaciones bioquímicas y moleculares

Las muestras de hojas se molieron usando mortero y N_2 líquido, y se almacenaron en freezer hasta la extracción. Las extracciones se realizaron con una solución buffer 50 mM Tris–HCl pH 7.5 con 1% de PVPP (polyvinypolypyrrolidone) en relación 1:4 (0,25g de material vegetal + 1 ml de buffer de extracción). Se extrajo el sobrenadante mediante centrifugado a 10000 xg durante 20 minutos a 4ºC. En el sobrenadante se midió contenido de proteínas solubles (Bradford, 1976), aminoácidos libres por el método de ninhidrina (Yemm & Cocking, 1955), nitratos (Cataldo et al., 1975). En los casos en que se determinó la actividad de nitrato reductasa (Lewis et al., 1982) y glutamina sintetasa (GS) (Nesselhut & Harnischfeger, 1981) utilizando el mismo sobrenadante. En los exudados floemáticos se determinó el contenido de aminoácidos libres (Yemm & Cocking, 1955). La clorofila se extrajo con acetona sobre una muestra de tejido molido y se midió por espectrofotometría (Arnon, 1949).

En las hojas, también se analizó la expresión de los genes de las distintas isoformas de la GS (GS1_1, GS1_2, GS2), los trasportadores de aminoácidos AAP6 y AAP7, encontrados como relevantes para la carga de aminoácidos al floema (Veliz, 2017) y la expresión de SAG12 como marcador de senescencia (Avice & Etienne, 2014). La expresión de genes se midió mediante qPCR, usando como Control el gen de actina de cebada (acc nº AY145451). El ARN total fue extraído a partir de 100 mg del tejido congelado y molido con 1 ml reactivo TRIzol (Ambion, USA). Las muestras se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 0,2 ml de cloroformo, y se incubaron por 3 minutos. Posteriormente a la incubación se centrifugó a 10.000 xg, a 4°C por 15 minutos. La fase superior acuosa se extrajo, se mezcló con 0,5 ml de isopropanol, se incubó durante 10 minutos y se centrifugó a 10.000x g, a 4°C por 10 minutos. El pellet se lavó con 1 ml de etanol 75%, se centrifugó, se dejó secar y se resuspendió en 0,03 m de H_2O libre de nucleasas. La retrotranscripción del ARN mensajero se realizó con la enzima Superscript II (Invitrogen) y un oligo dT, siguiendo las indicaciones del manual del producto. Para la reacción de qPCR se usó SYBRgreen Master Mix de Applied Biosystems (2X), que incluye SYBRgreen para la cuantificación de ADN doble cadena y ROX como pigmento de referencia para el volumen. Los valores de fluorescencia obtenidos se analizaron con el software provisto por Agilent Technologies junto con el equipo MX3000P QPCR Systems.

4.2.4 Análisis estadísticos

Los datos se analizaron mediante ANOVA para determinar los efectos de tratamiento, sitio, fecha de muestreo e interacciones y los tratamientos se compararon mediante contrastes. Cuando la interacción sitio x tratamiento resultó significativa, se analizó el efecto en cada sitio mediante contrastes usando el software Infostat. Las relaciones entre variables se evaluaron por regresión lineal y ajustando funciones a los tratamientos que resulten diferentes entre sí en cuanto a su pendiente u ordenada al origen, con el software Graph Pad Prism 6. El crecimiento pre-antesis y contenido de N del tratamiento N150, al igual que el rendimiento y proteína de los tratamientos N20f y N40f se muestra relativo al Control.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterización de los sitios y de los cultivos en función de la disponibilidad de nutrientes

Las condiciones climáticas durante el ciclo del cultivo, en cuanto a la temperatura, fueron muy similares entre los sitios. No se observaron eventos extremos de temperatura durante el ciclo del cultivo en ninguna de las localidades. Las precipitaciones fueron mayores en los sitios de Junín y Arribeños respecto al sitio de 25 de mayo. Respecto a la humedad del suelo en antesis, Junín tuvo mayor cantidad de agua almacenada en el perfil, probablemente debido al menor crecimiento del cultivo y, por lo tanto, menor consumo. En 25 de mayo, el suelo tuvo menor humedad, probablemente debido a su textura más gruesa y menores precipitaciones. Respecto al contenido de N-$N0_3$ al inicio del ciclo, Arribeños tuvo mayor disponibilidad y, en antesis, Junín tuvo valores más altos que los otros sitios, dada la menor absorción del cultivo. Los datos de suelo y de cultivo se muestran en el Cuadro 4.1

Cuadro 4.1: Caracterización de los sitios y cultivos (Extraído de Capítulo 2; Cuadro 2.1).

						Inicio					Antesis		
S/Año	**Localidad**	**Ant.**	**CV**	**F. S.**	**Text.**	**MO**	**pH**	**P ext**	**N-N0$_3$**	**Hum.**	**N-N0$_3$**		**Hum.**
											Cont. N150.		
						%		**ppm**	**kg ha^{-1}**	**mm**	**kg ha-^{1}**		**mm**
33/2016	25 de Mayo	S	A	17-6	AF	1,03	5,8	12,7	45,1	179	13,3	20,1	101
35/2016	Arribeños	S	A	19-6	FL	1,77	5,6	9,5	75,3	240	14,1	25,3	158
36/2016	Junín	S	A	20-6	FA	0,97	5,9	11,9	56,9	191	32,9	76,3	211

S: Sitio Ant.: Antecesor: S: soja CV: cultivar: A: Andreia
FS.: Fecha de Siembra.
Text.: Textura: AF areno franco, FL: franco limoso, FA: franco arenoso
MO.: Materia Orgánica 0-20 cm P ext: P Bray 0-20 cm
Hum.: Humedad 0-100 cm
N-NO_3.: Nitrato 0-60 cm

Los 3 sitios se diferenciaron en cuanto al crecimiento y el contenido de N al momento de antesis (Figura 4.1). En el Control, a nivel general, no se observó una disminución del crecimiento pre-antesis por efecto de la limitación de N comparado con el tratamiento N150,

usado para evaluar el nivel de deficiencia de N del tratamiento Control. La limitación fue variable entre sitios (interacción SxT tendió a ser significativa $p<0,1$). En 25 de mayo el crecimiento pre-antesis disminuyó por la limitación de N ($p<0,05$), mientras que, por el contrario, en Junín el agregado de N tendió a reducir el crecimiento ($p<0,1$; Figura 4.1). En Junín el cultivo tuvo una deficiencia en S, determinada a partir de resultados obtenidos en un experimento de interacción NxS realizado en el mismo año y sitio, que mostró un significativo incremento del crecimiento y el rendimiento solo frente al agregado conjunto de S y N (datos no publicados). Además, se observó un color amarillento en el tratamiento fertilizado con N, característico de la deficiencia de S. Por su parte, en Arribeños el cultivo tuvo mayor crecimiento pre-antesis, tanto en el Control como en el tratamiento N150, indicando mejores condiciones de crecimiento del sitio, principalmente mayor disponibilidad inicial de N (Cuadro 4.1; Figura 4.1). El contenido de N en la biomasa aérea fue dependiente del sitio y estuvo limitada por la disponibilidad de N en los 3 sitios (Figura 4.1).

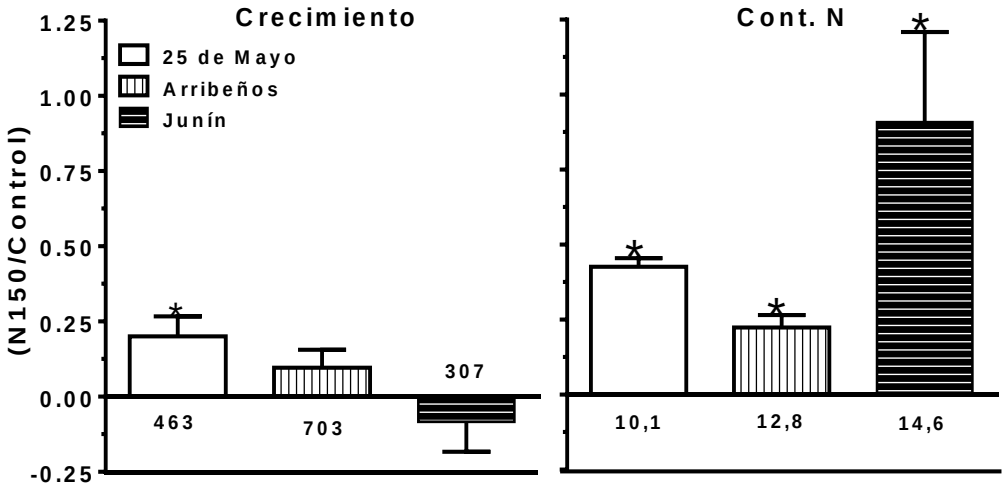


Figura 4.1: Crecimiento y contenido de N en antesis, relativo al tratamiento Control. * indica diferencias significativas (p contraste <0,05). Se testeó la interacción SxT cuando el valor p del ANOVA fue <0,1. Los números junto a las barras indican la biomasa aérea (g m^{-2}) y el contenido de N en tejidos de la parte aérea (mg g^{-1}) del tratamiento Control al momento de antesis.

Los rendimientos y la limitación por N en el Control fueron dependientes del sitio (Cuadro 4.3; Figura 4.2). Sólo en 25 de Mayo la fertilización nitrogenada del productor limitó el rendimiento (Figura 4.2). Este efecto se evidenció desde antesis, donde el Control creció un 16% menos que el tratamiento N150 (Figura 4.1). En Arribeños no se incrementó el rendimiento por agregar N, sugiriendo que la fertilización del productor fue adecuada para lograr el rendimiento potencial. Por otro lado, la disminución del rendimiento en Junín, frente al agregado de N pone de manifiesto el desbalance nutricional generado por agregar N cuando el S es el nutriente limitante.

El contenido proteico dependió del sitio y el tratamiento. En el Control fue inferior al óptimo requerido para malterías (10%), en los tres sitios. El tratamiento N150 incrementó la proteína en los tres sitios, indicando una insuficiente fertilización del productor (Cuadro 4.2; Figura 4.2). La cantidad de N en rastrojo dependió del sitio y aumentó con el agregado de N al inicio.

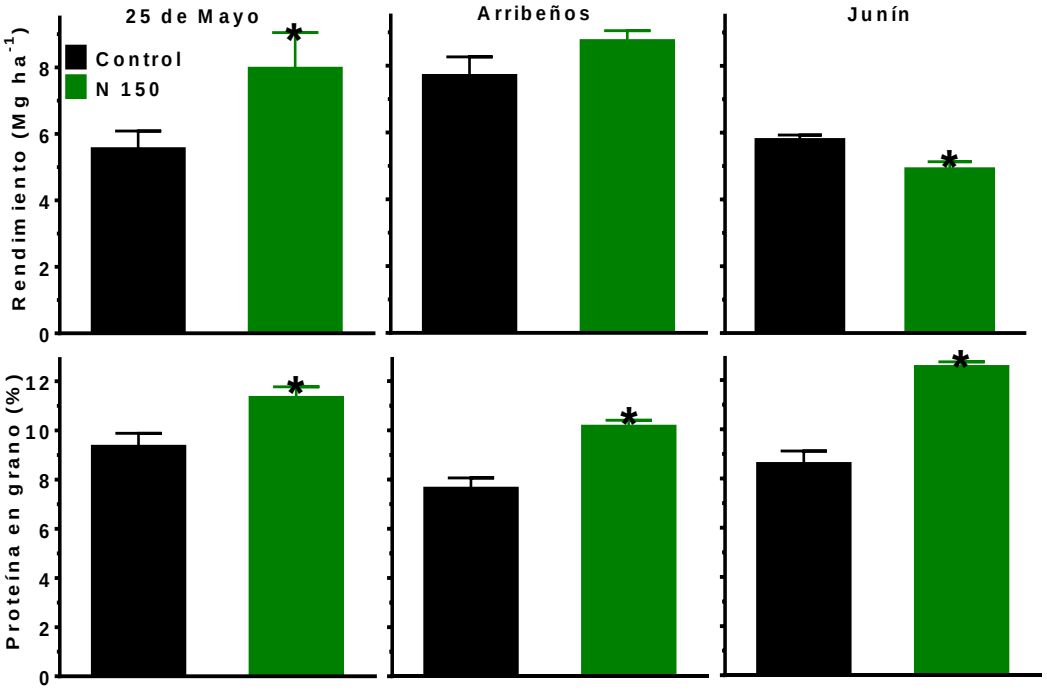


Figura 4.2: Rendimiento y proteína en grano para los tratamientos Control y N150. * indica diferencias significativas entre tratamientos (valor *p* del contraste <0,05).

Cuadro 4.2: ANOVA para las variables rendimiento, proteína, ERN y N absorbido en rastrojo y valores de los contrastes entre tratamientos. Los contrastes se realizaron cuando el efecto del tratamiento fue significativo (*p*<0,05) C= Control.

F.V	Rend.	Proteína	ERN	N rast.
Sitio	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**0,01**
Trat	0,17	**<0,01**	0,20	**<0,01**
Sitio*Trat	**<0,01**	**0,04**	0,06	**<0,01**
C vs N150	0,09	**<0,01**	-	**<0,01**
C vs N20f	0,44	**<0,01**	-	0,11
C vs N40f	0,54	**<0,01**	-	0,23
N20f vs N40f	0,82	0,68	-	0,66

4.3.2 Efecto de la fertilización en antesis: Crecimiento del cultivo y de los granos durante el llenado, rendimiento y proteína en grano

La aplicación foliar de N en antesis aumentó significativamente el contenido proteico en ambas dosis (20 y 40 kg de N ha^{-1}), sin diferencias entre dosis, Arribeños y Junín tuvieron

mayor respuesta que 25 de mayo. Ninguno de los tratamientos foliares afectó significativamente el rendimiento, respecto al Control (Cuadro 4.2).

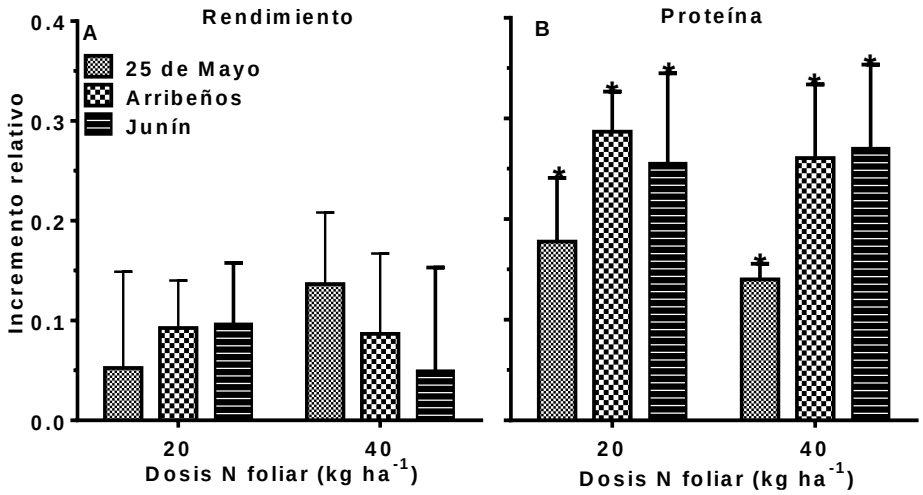


Figura 4.3: Variación en el rendimiento y proteína final para los tratamientos de fertilización foliar en antesis (N20f y N40f), relativo al tratamiento control. * Indican diferencias significativas respecto al tratamiento Control (p< 0,05).

Por otro lado, la ERN indicador de la proporción del N absorbido pre-antesis que es removilizado hacia el grano, no fue afectada por los tratamientos. Sin embargo, la interacción Sitio x Tratamiento tendió a ser significativa (p<0,1) y se observó una disminución de la ERN en Junín para el tratamiento N40f (p<0,05). Asimismo, al igual que en la red experimental, la aplicación foliar en antesis no afectó el contenido de N remanente en rastrojo en ninguna de las dosis probadas (Cuadro 4.2).

La biomasa aérea y el peso fresco de los granos medido indirectamente mediante el peso de las espigas frescas, fueron dependientes del sitio. Arribeños mostró los mayores valores de biomasa aérea, indicando que el sitio tuvo mejores condiciones de crecimiento que los otros, tanto en pre-antesis como post-antesis (Figura 4.4). Con respecto al crecimiento de los granos, se observó una interacción sitio x fecha, indicando que el crecimiento de los mismos no fue igual en todos los sitios (Cuadro 4.3). Las tasas de crecimiento tanto de la planta, como de los granos, evaluadas por la pendiente de la recta, no fueron afectadas por la fertilización foliar en ninguna de las dosis.

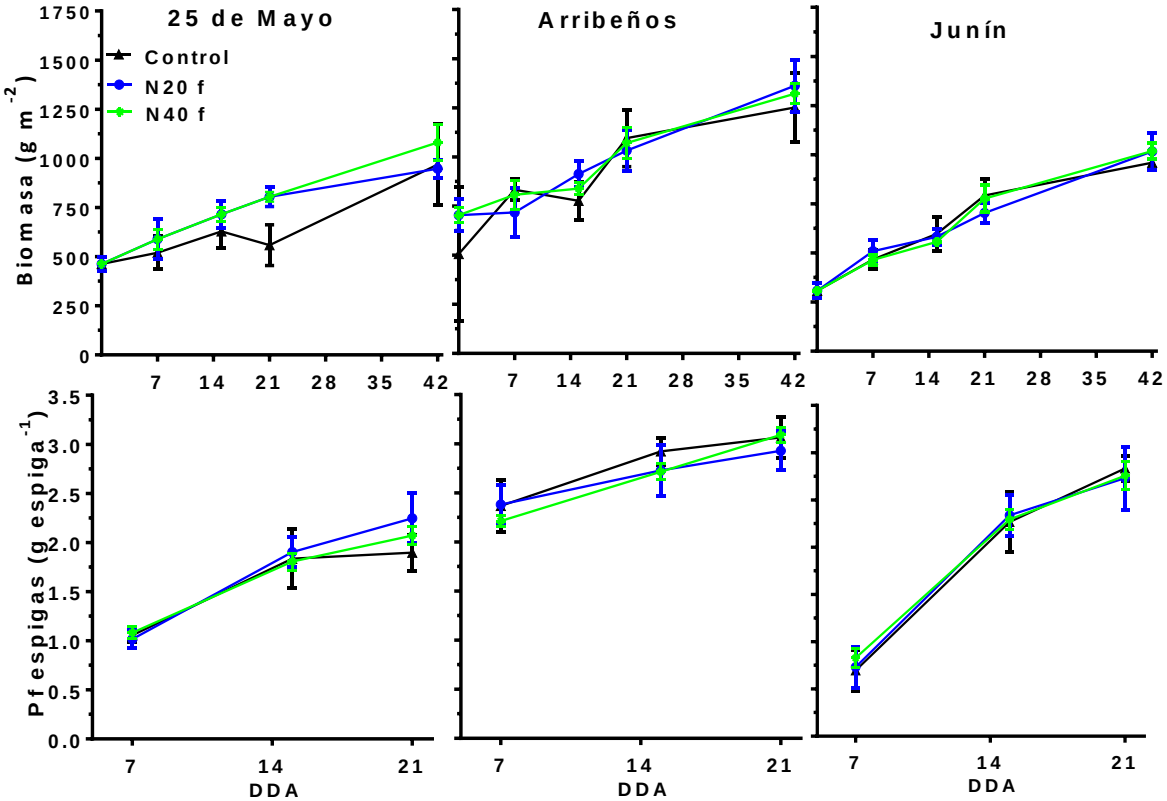


Figura 4.4: Biomasa aérea y peso de los granos, evaluados a través del peso de las espigas, durante en el período post-antesis, para los tratamientos Control N20f y N40f. DDA días después de antesis.

4.3.3 Partición del N en la hoja durante el llenado

El contenido de proteínas solubles y de clorofila en hoja disminuyó a medida que transcurrió el llenado, la aplicación de N en antesis incrementó ambas variables, la magnitud del incremento dependió del sitio (Cuadro 4.3). En el caso de la clorofila (Figura 4.5), en 25 de mayo el incremento dependió de la dosis, N40f generó un incremento respecto al Control y a N20f, mientras que N20f también aumento el contenido de clorofila respecto al Control. En Arribeños, N40f se diferenció significativamente del Control en todas las fechas, mientras que N20f sólo se diferenció del Control a los 7 días post-antesis, sin diferencias respecto al Control a nivel general (Cuadro 4.3). En Junín, el tratamiento no afectó el contenido de clorofila en ninguna de las dosis. La aplicación foliar no afectó la tasa de disminución de la clorofila, evaluada mediante análisis de pendientes de las rectas, en ninguno de los sitios (Cuadro 4.4).

Cuadro 4.3: Análisis de varianza para las variables crecimiento, peso fresco de granos, contenido de clorofila, proteína soluble, aminoácidos y nitrato en hoja y tasa de exudación de aminoácidos en floema en el período post-antesis. Los contrastes se realizaron cuando la interacción Sitio x Tratamiento resultó significativa (p<0,05).

F.V.	**Biomasa**	**Granos**	**Hoja**				**Floema**
	Crecimiento		**Clorofila**	**Proteína**	**Aa**	**Nitrato**	**Aa pf**
	g m^{-2}	**g espiga^{-1}**	**mg g^{-1}**				**ng g^{-1} h^{-1}**
Sitio	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**
Trat.	0,21	0,77	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**0,01**
Fecha	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**
Sitio*Trat.	0,76	0,11	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	0,47
Sitio*Fecha	0,10	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	0,43	**<0,01**
Trat.*Fecha	0,43	0,94	**0,02**	0,05	**<0,01**	0,71	0,06
S*T*F	0,29	0,44	0,58	0,06	0,47	0,64	0,10
25 de mayo			**Contrastes**				
C vs N20f	-	-	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	0,05	-
C vs N40f	-	-	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	-
N20f vs N40f	-	-	**<0,01**	0,35	0,71	**0,02**	-
Arribeños							
C vs N20f	-	-	0,21	**0,01**	0,36	0,30	-
C vs N40f	-	-	**0,02**	**<0,01**	**<0,01**	**<0,01**	-
N20f vs N40f	-	-	0,30	0,50	0,06	0,05	-
Junín							
C vs N20f	-	-	0,67	0,50	**<0,01**	0,07	-
C vs N40f	-	-	0,59	0,11	**<0,01**	**<0,01**	-
N20f vs N40f	-	-	0,91	0,33	0,60	**<0,01**	-

El contenido de proteínas solubles en hoja aumentó por la aplicación de N en 25 de mayo y Arribeños, en ambos sitios la respuesta no varió entre dosis, mientras que en Junín no se observó efecto de la aplicación foliar respecto al Control (Cuadro 4.3; Figura 4.5). En los dos sitios que respondieron a la fertilización en antesis, a los 7 días post-antesis ambos tratamientos tuvieron mayor proteína que el Control (evaluado mediante contrastes, en cada fecha; no mostrados). Al progresar el llenado se observaron comportamientos diferentes entre los sitios. En 25 de mayo N20f se diferenció del Control en los 3 momentos de muestreo, mientras que N40f se diferenció a los 7 y 21 días. En Arribeños, N40f se diferenció del Control a los 21 días, mientras que a los 14 días post-antesis no hubo diferencias entre tratamientos (Figura 4.5). En los sitios donde el cultivo respondió a la aplicación de N, la tasa de disminución de proteínas solubles aumentó, en 25 de mayo para ambas dosis y, solo para N20f en Arribeños (Cuadro 4.4). A pesar de la mayor tasa de disminución, tuvo mayor contenido de proteínas que el Control en ambos sitios a los 21 días, mientras que N20f en Arribeños no se diferenció del Control en dicha fecha. A los 7 días post-antesis, el incremento medio de la proteína fue de 25 y 28% para N20f y N40f respectivamente, mientras que fueron de 17 y 20% respectivamente en el período 7-21 días post-antesis.

Cuadro 4.4: Valores *p* del test F para la comparación de pendientes entre tratamientos para variables medidas en hoja (Proteína, Clorofila, Aminoácidos y Nitrato) y la tasa de exudación de aminoácidos en floema entre 7-21 días post-antesis. La comparación se realizó cuando el efecto de los tratamientos fue significativo (Cuadro 4.3). Aa: aminoácidos.

Variable	C vs. N20f	C vs. N40f	N20f vs. N40f	C vs. N20f	C vs. N40f	N20f vs. N40f	C vs. N20f	C vs. N40f	N20 vs. N40f
	25 de mayo			Arribeños			Junín		
Proteína	**0,03**	**0,02**	0,42	**<0,01**	0,48	**0,03**	-	-	-
Clorofila	0,24	0,31	0,71	0,25	0,38	0,92	-	-	-
Aa	**0,03**	**0,03**	0,93	-	**0,02**	0,19	**<0,01**	**<0,01**	0,27
Nitrato	**0,04**	**0,02**	0,28	-	**0,04**	**<0,01**	**0,03**	**<0,01**	0,10
Aa Floema	0,53	0,32	0,69	0,39	0,29	0,46	0,29	0,18	0,68

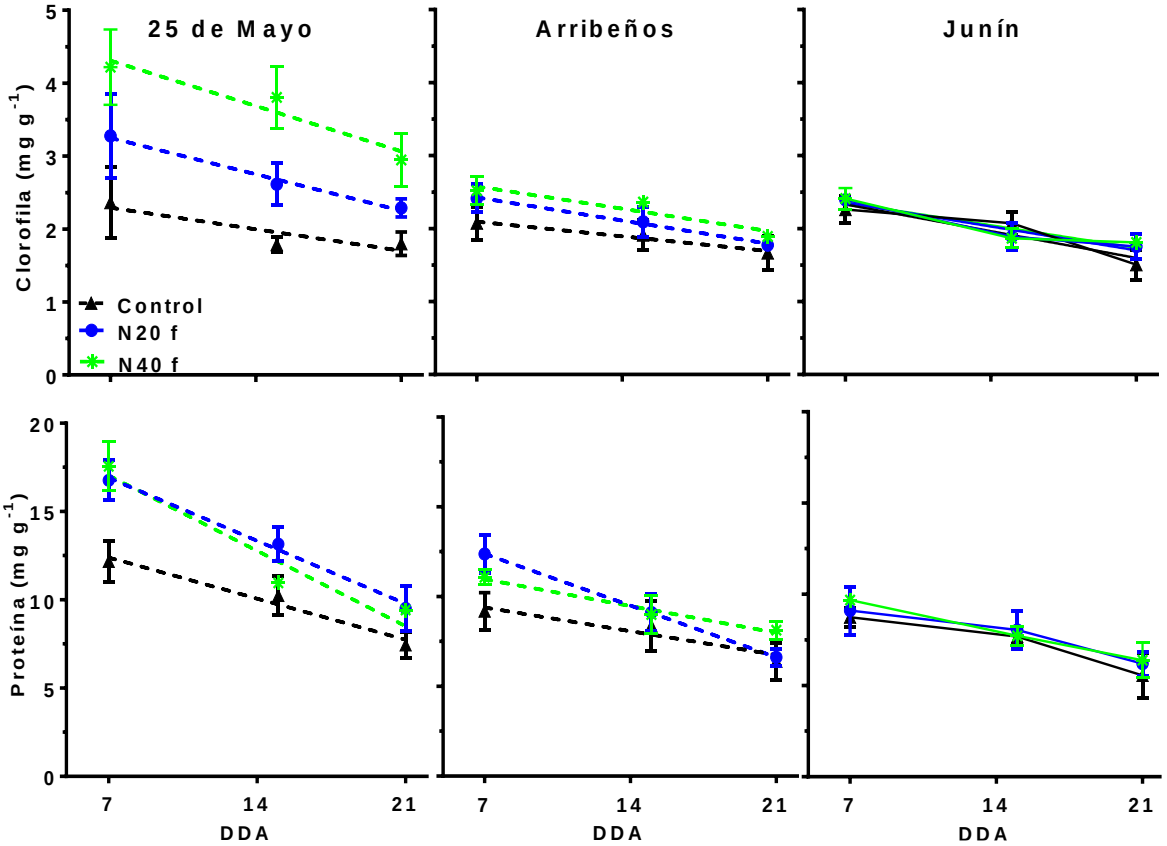


Figura 4.5: Contenido de clorofila y proteínas solubles en hoja durante el llenado. Las líneas punteadas corresponden a la función ajustada para evaluar la tasa de disminución, cuando los efectos de tratamiento resultaron significativos. Las funciones en todos los casos se ajustaron en el período 7-21 DDA. DDA días después de antesis.

El contenido de aminoácidos y nitrato en hoja disminuyó a medida que transcurrió el llenado. Los efectos de fecha de muestreo, tratamiento y la interacción sitio x tratamiento fueron significativas para ambas variables, la interacción tratamiento x fecha resultó significativa sólo para aminoácidos (Cuadro 4.3). En 25 de mayo y Junín ambos tratamientos fertilizados tuvieron mayor contenido de aminoácidos que el Control, mientras que, para

Arribeños, sólo se diferenció el tratamiento N40f. Las dosis no se diferenciaron entre sí en ninguno de los sitios (Cuadro 4.3; Figura 4.6). En el análisis por fecha se observó que los incrementos respecto del Control, se dieron a los 7 días post-antesis para ambas dosis. Luego a los 14 y 21 días post-antesis, sólo el tratamiento N40f se diferenció del Control en los 3 sitios (Figura 4.6). Las tasas de caída del contenido de aminoácidos en ambos tratamientos fertilizados en antesis fueron mayores que el Control, a excepción de N40f en Arribeños (Cuadro 4.4). Nuevamente a pesar de la mayor tasa de caída de esta variable, a los 21 días N40f tuvo mayor contenido de aminoácidos en los tres sitios.

El tratamiento N40f incrementó el contenido de nitrato en hoja respecto al Control y al tratamiento N20f en los 3 sitios, mientras que N20f sólo se diferenció del Control en 25 de mayo. La tasa de disminución de nitrato en hoja fue afectada por el tratamiento y el efecto fue variable entre sitios (Cuadro 4.4). En Junín la tasa de disminución fue mayor en ambas dosis de N, en 25 de mayo sólo N40f aumentó la tasa de caída respecto al Control mientras que en Arribeños, N20f tuvo menor tasa de caída que los demás tratamientos (Cuadro 4.4). Los tratamientos fertilizados que tuvieron una mayor tasa de caída, no se diferenciaron del Control en el último muestreo, a excepción de N40f en Junín (Figura 4.6).

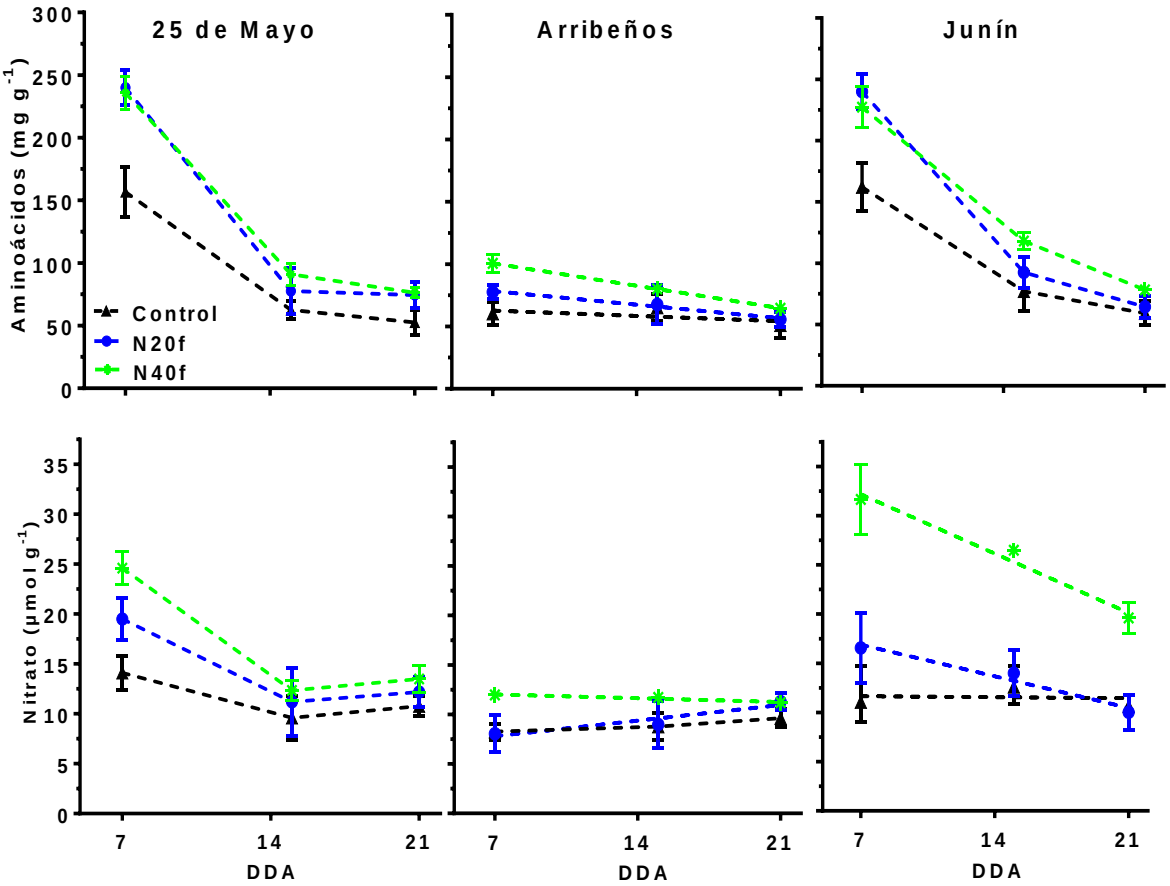


Figura 4.6: Contenido de aminoácidos y nitrato en hoja durante el llenado, para los tratamientos N antesis (N20 f y N40 f) y el Control. Las líneas punteadas corresponden a la función ajustada para evaluar la tasa de disminución. En 25 de mayo y Junín las funciones se ajustaron en el intervalo 7-14 DDA y 14-21DDA. DDA días después de antesis.

4.3.4 Movilización de aminoácidos vía floema durante el llenado

Ambos tratamientos aumentaron la movilización de aminoácidos vía floema, sin diferencias entre las dosis, independientemente del sitio y de la fecha (Cuadro 4.3). N40f incrementó significativamente el transporte de aminoácidos vía floema a los 7 días post-antesis en todos los sitios, mientras que el tratamiento N20f se diferenció del Control a los 7 días post-antesis en Junín y a los 21 días en el sitio de Arribeños (Figura 4.7). La caída en la tasa de exportación en el período de los 7-14 días, fue mayor en los tratamientos fertilizados, a excepción de N20f en Arribeños (Cuadro 4.5; Figura 4.9), mientras que en el período 14-21 días no se observaron cambios en la tasa de exportación por efecto de tratamiento. Todos los tratamientos lograron un similar nivel de exportación, a excepción de N20f en Arribeños (Figura 4.7). La tasa de movilización de aminoácidos hacia las espigas disminuyó a medida que progresó el llenado en los 3 sitios.

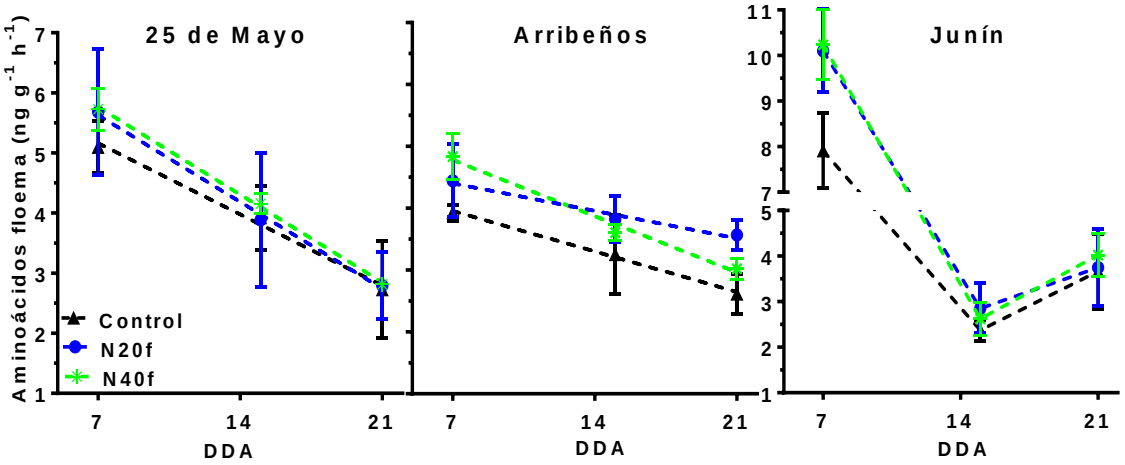


Figura 4.7: Tasa de exudación de aminoácidos en floema durante el llenado. Las líneas punteadas corresponden a la función ajustada a la tasa de exportación. En 25 de mayo y Arribeños las funciones se ajustaron en el intervalo 7-21 DDA y 14-21DDA. En Junín las funciones se ajustaron en el intervalo 7-14 DDA y 14-21 DDA.

Los pooles de aminoácidos y nitratos en hoja a los 7 días post-antesis, período en el cual se observaron los mayores efectos, se correlacionaron positivamente con el contenido final de proteína en los granos. Por otro lado, el contenido de clorofila y de proteínas no tuvieron relación (Figura 4.8).

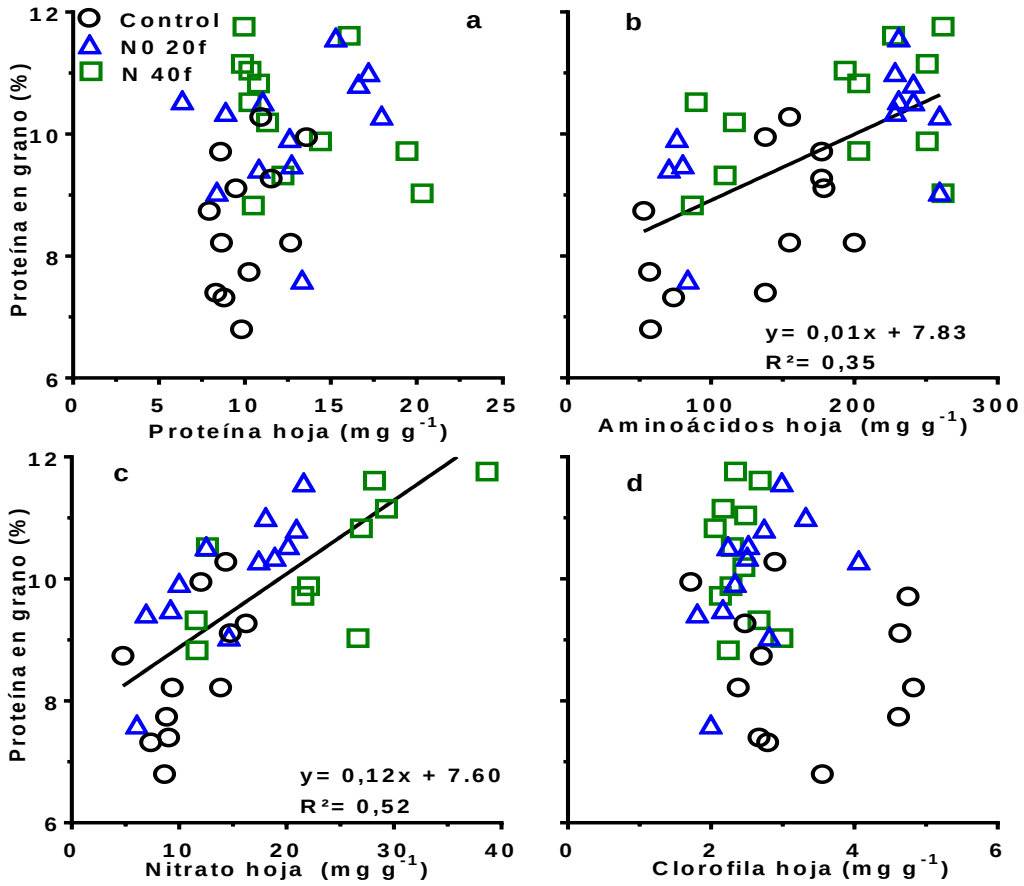


Figura 4.8: Relación de la proteína final en grano con variables bioquímicas mediadas en hoja a los 7 días post-antesis (a), el contenido de proteína (b), el contenido de aminoácidos (c), el contenido de nitrato y el contenido de clorofila (d).

La movilización acumulada de aminoácidos vía floema durante el llenado, calculada entre los 7 y 21 días post-antesis, mediante la integración de las funciones obtenidas en la Figura 4.7, mostró estar significativamente correlacionada al cotenido final de proteínas en los granos (Figura 4.9). Por el contrario, la tasa de exudación instantánea en ninguno de los momentos medidos se correlacionó con la proteína en grano (datos no mostrados).

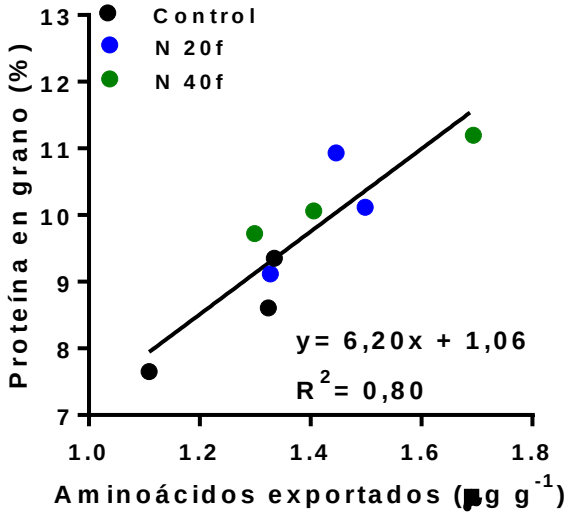


Figura 4.9: Relación entre la exudación de aminoácidos vía floema integrada entre los 7 y 21 días post-antesis y el contenido proteico en grano. Cada punto corresponde a un sitio-tratamiento.

4.3.5 Actividad de las enzimas Nitrato Reductasa (NR), Glutamina Sintetasa (GS) y expresión génica de las isoformas de GS, trasportadores de aminoácidos y SAG12

La actividad de las enzimas NR y GS fueron medidas en el sitio de Arribeños a los 7 días post-antesis, ya que fue el momento donde se evidenció el mayor efecto de los tratamientos sobre las variables asociadas a la asimilación y distribución del N en la planta (incremento de proteína foliar y exportación de aminoácidos en floema). Se seleccionó el sitio de Arribeños ya que fue donde se observó que el cultivo no presentaba deficiencias nutricionales, situación en la que se recomienda la fertilización foliar y ésta práctica permitió alcanzar los niveles de proteína requeridos por la industria. La actividad de GS fue afectada por el tratamiento (p=0,04). N40f incrementó significativamente la actividad de GS, mientras que N20f no se diferenció del Control (Figura 4.10). La actividad específica por unidad de proteína, los tratamientos no se diferenciaron entre sí (datos no mostrados). Por lo tanto, el aumento de la actividad parece estar relacionado con el aumento de proteínas generado por la fertilización foliar. Por otro lado, la actividad de NR no fue afectada por la fertilización foliar en ninguna de las dosis (Figura 4.10).

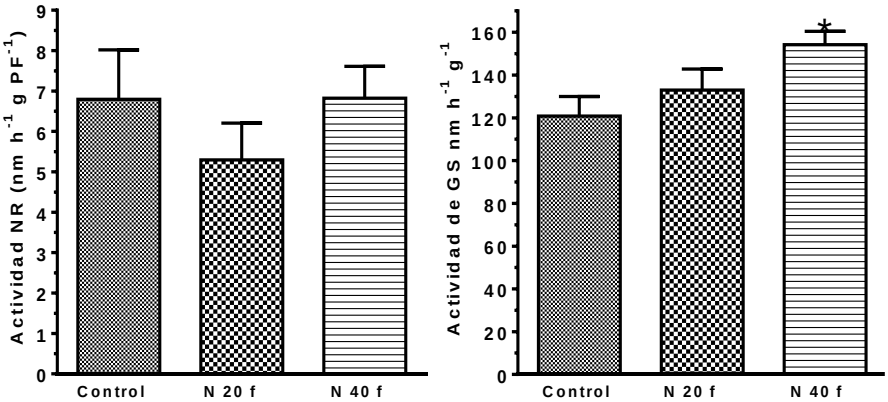


Figura 4.10: Actividad de la NR y GS para el sitio de Arribeños a los 7 días post-antesis. *indica diferencias significativas, contraste respecto al Control (p<0,05).

La expresión de la isoforma GS1_1 aumentó significativamente con la dosis menor (N20f), mientras que la dosis más alta (N40f) no tuvo efecto, ambas dosis se diferenciaron significativamente entre sí (Figura 4.11; Cuadro 4.5). Por otro lado, las otras isoformas, GS1_2 y GS2 aumentaron con el tratamiento N20f y solo GS2 para N40f, mientras que GS1_2 tendió a aumentar (p<0,1).

Cuadro 4.5: ANOVA y contrastes para la expresión génica de las isoformas de GS y trasportadores de aminoácidos a los 7 días post-antesis.

Efecto	GS1_1	GS1_2	GS2	AAP6	AAP7	SAG 12 7d	SAG 12 21d
Trat.	**<0,01**	0,09	0,16	**0,03**	0,31	**<0,01**	0,24
C vs N20f	**0,02**	**0,02**	**0,04**	**<0,01**	0,18	**0,01**	0,24
C vs N40f	0,50	**0,05**	**0,03**	**0,03**	**0,02**	0,30	0,18
N20f vs N40f	**<0,01**	0,73	0,97	0,34	0,26	**<0,01**	0,62

La expresión de los trasportadores de aminoácidos evaluados aumentó por la fertilización foliar. La expresión del gen de la enzima AAP6 aumentó significativamente debido a la fertilización en antesis sin diferencias entre las dosis aplicadas. Por otro lado, la expresión del gen de AAP7 sólo aumentó con la mayor dosis de N (Figura 4.11).

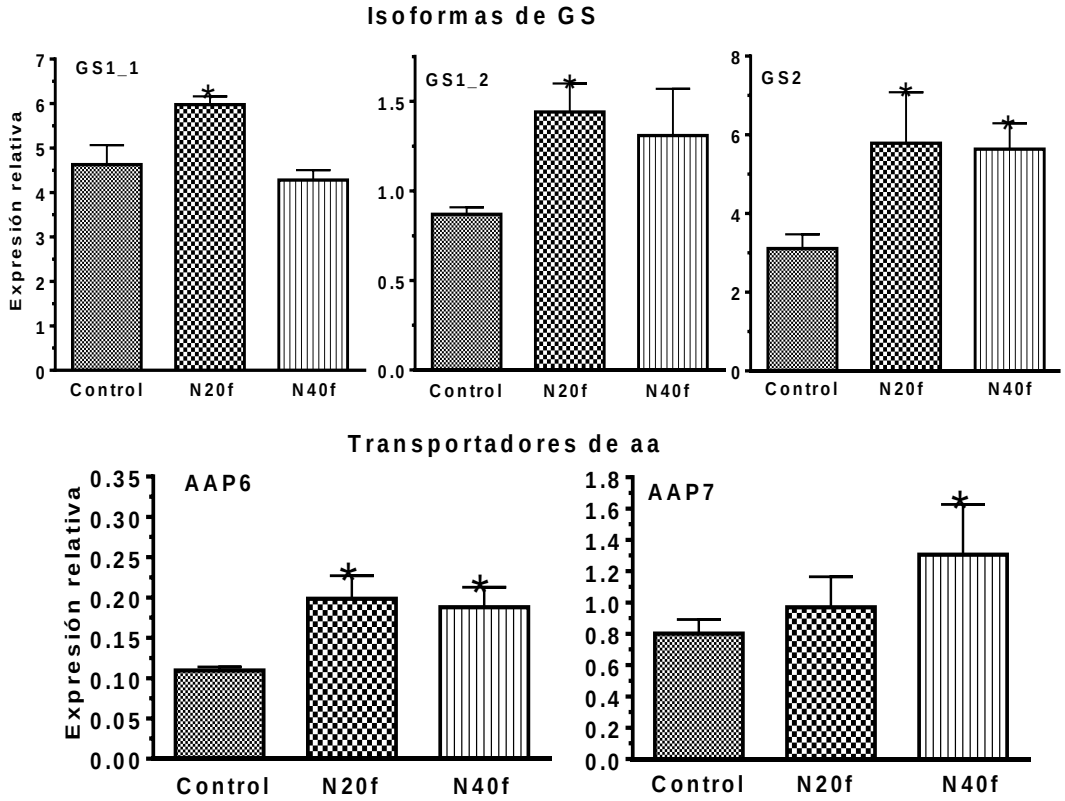


Figura 4.11: Expresión de los genes para isoformas de GS (GS1_1, GS1_2 Y GS2) y trasportadores de aminoácidos (AAP6 y AAP7) del sitio Arribeños a los 7 días post-antesis.

Finalmente se analizó la expresión génica de la proteasa SAG12, a los 7 y 21 días post-antesis. A los 7 días post-antesis, la dosis de 20 kg N ha^{-1} incrementó la expresión de la proteasa, mientras que la dosis de 40 kg N ha^{-1} no tuvo efecto respecto al Control (Figura 4.12). A los 21 días aumentó la expresión con respecto a los 7 días post-antesis, sin diferencias entre tratamientos.

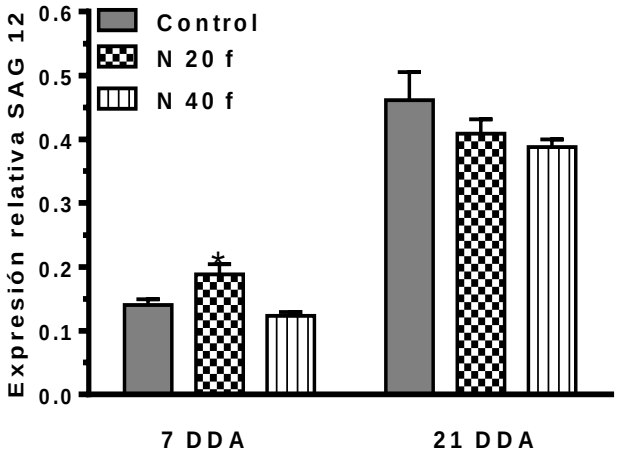


Figura 4.12: Expresión de los genes de la proteasa SAG 12 en Arribeños a los 7 y 21 días post-antesis.

4.4 DISCUSIÓN

4.4.1 Caracterización de los cultivos en función de su estado nutricional y efecto de la fertilización en antesis sobre variables agronómicas.

Al igual que el resto de la red experimental analizada en esta tesis, los sitios bajo estudio en el presente capítulo mostraron marcadas diferencias en cuanto a la disponibilidad de N y el manejo del cultivo. En 25 de mayo el crecimiento pre-antesis del tratamiento Control estuvo limitado por la disponibilidad de N, mientras que los otros sitios no presentaron restricciones al crecimiento atribuidas a la disponibilidad de N pre-antesis (Figura 4.1). En Junín se observó una limitación por S, que afectó la respuesta del cultivo al agregado de N. Se asume que el S fue deficiente ya que, en el mismo sitio, en un ensayo realizado simultáneamente donde se agregó S (150 ha^{-1} de S + 15 kg ha^{-1} de S), se incrementó significativamente el rendimiento frente al tratamiento que solo recibió N. Esta observación descarta la hipótesis de la limitación hídrica, ya que la disponibilidad de agua permitió que el cultivo que recibió N+S tenga un crecimiento mayor al tratamiento N150. La disminución del rendimiento del tratamiento N150 respecto al Control se atribuye a que la limitación en la disponibilidad de S fue agravada por el agregado de N (desbalance nutricional). La disminución del rendimiento frente a un agregado de N en cultivos deficientes de S ha sido reportada previamente en cultivos como colza (Malhi & Gill, 2007). Se atribuye esta caída en el rendimiento a una menor provisión de S hacia los órganos en crecimiento cerca del período crítico, debido a la imposibilidad del cultivo de removilizarlo. En cebada se determinó que la planta no aumenta la movilización de S hacia las hojas jóvenes, cuando las plantas crecen en deficiencia de este nutriente (Adiputra & Anderson, 1995). Se observó, en cultivos de soja, que la limitación de S no inicia el proceso de removilización de S orgánico

hacia los órganos en crecimiento a menos que ocurra simultáneamente una deficiencia de N que active el proceso de proteólisis y por lo tanto produzca removilización de S (Adiputra & Anderson, 1995). En función de lo reportado previamente, es esperable que la removilización de S sea menos eficiente en las plantas que recibieron N (tratamiento N150) respecto al tratamiento Control, por lo que sufrirán una deficiencia de S más marcada en el período crítico. Por otro lado, el contenido de N en la biomasa aérea estuvo limitada por la disponibilidad de N en los 3 sitios, aunque las magnitudes de incremento frente al agregado de N (N150) fueron diferentes. El mayor incremento se observó en Junín donde la biomasa no aumentó por el agregado de N, debido a la deficiencia de S previamente descripta (Figura 4.2) y, por lo tanto, no se diluyó el N absorbido.

A cosecha final la disponibilidad de N en el tratamiento Control limitó la proteína en los 3 sitios. Respecto al rendimiento, solo en 25 de mayo la disponibilidad de N fue limitante, debido al menor crecimiento pre-antesis, tal como se describió previamente (Capítulo 2 Figura 2.2), por lo que fue el sitio más deficiente de N. En Arribeños la fertilización del productor fue suficiente para lograr el rendimiento potencial pero no permitió alcanzar el nivel adecuado de proteína, por lo tanto, la disponibilidad de N resultó insuficiente, aunque en menor medida que en 25 de mayo. Por su parte en Junín el rendimiento disminuyó frente al agregado de N, debido al agravamiento de la deficiencia de S, aunque generó un importante incremento en el contenido de proteína, hasta niveles superiores a los requeridos (Figura 4.2). La aplicación foliar, en ambas dosis probadas, no afectó el rendimiento (Figura 4.3), ya que se realizó después del período crítico y, en los tres sitios analizados, no afectó la tasa de crecimiento del cultivo en post-antesis, respecto al Control (Figura 4.4). La aplicación foliar de N, en ambas dosis ensayadas, incrementó la proteína en grano (Figura 4.3), corroborando que es una estrategia adecuada para mejorar la calidad del grano. A pesar que, a nivel general, no se observó una interacción entre la respuesta y el status nutricional del cultivo (Capítulo 2; Figura 2.20d), particularmente se observó que el sitio más limitado de N (25 de mayo), fue el que mostró menor incremento relativo respecto a los sitios de Arribeños y Junín, donde el crecimiento del cultivo no estuvo restringido por N (Figura 4.3). No se observaron diferencias entre las dosis aplicadas (Cuadro 4.2), por lo tanto, la dosis de 20 kg N ha^{-1} parece ser más conveniente desde el punto de vista productivo. Este resultado coincide con observaciones previas (Ma et al., 2006), quienes determinaron que aplicaciones post-antesis de dosis altas de N (40 kg ha^{-1} igual a la usada en la presente tesis), no resultaron eficientes para aumentar la cantidad de N en grano. Por lo tanto, bajo limitaciones importantes de N, estas deben corregirse mediante una fertilización basal y, de ser necesario, una aplicación foliar para corregir la proteína si se espera que sea baja, según lo sugerido por Gooding & Davies (1992). La fertilización tardía, en ambos tratamientos, al igual que lo observado en el capítulo 2, no disminuyó la eficiencia de removilización del N almacenado ya que no incrementó la cantidad de N remanente en el rastrojo (Cuadro 4.2).

4.4.2 Partición del N en planta y efecto sobre la senescencia foliar

El N aplicado se distribuyó en las diferentes fracciones nitrogenadas de la hoja, la respuesta varió en función del estado nutricional de cada sitio. El contenido de clorofila y proteínas solubles se incrementó en 25 de mayo y Arribeños, siendo el cultivo más deficiente de N (25 de mayo) el que presentó los mayores aumentos (Figura 4.5). En Junín en cambio,

no se observó respuesta, probablemente debido a que la síntesis de proteínas está limitada en plantas con deficiencia de S como fue reportado previamente (Pedersen et al., 1998; Nikiforova et al., 2004). Asimismo, este sitio tuvo los valores de aminoácidos en floema más altos (Figura 4.7), lo que sugiere que el cultivo absorbió el N aplicado y al no poder incorporarlo a proteínas quedó disponible para ser exportado. Esta observación que refuerza la hipótesis de la limitación a la síntesis proteica frente a deficiencias de S.

La aplicación foliar de N no modificó la tasa de disminución de la clorofila (Figura 4.5), por lo que no atrasó el inicio de la senescencia. La clorofila es una de las primeras moléculas en ser degradadas al inicio de la senescencia foliar y es un indicador del avance del proceso (Gregersen et al., 2008). Un atraso en la senescencia sería indeseable desde el punto de vista productivo, ya que disminuiría la removilización de N desde los tejidos fuente a los granos, que se produce durante este proceso (Wingler et al., 2006) y, por lo tanto, el aprovechamiento del N almacenado previo a antesis. Además de la disminución de la clorofila, en los tratamientos que recibieron N foliar se incrementó la tasa de disminución de las proteínas foliares (Cuadro 4.4; Figura 4.5), indicando un aumento en velocidad de senescencia (Gan & Amasino, 1997; Martínez et al., 2008). Esta mayor tasa de disminución de las proteínas foliares se relacionó a un aumento de la expresión de la proteasa cisteínica SAG12, aceptada como indicador de la senescencia foliar (Chauhan et al., 2009; Avice & Etienne, 2012; Roberts et al., 2012), que se incrementó a los 7 días después de la aplicación foliar (Figura 4.12). Los resultados observados indicarían que la aplicación en antesis no solo no atrasa la senescencia foliar, sino que estaría induciendo la degradación de las proteínas de reserva, lo que permitiría explicar el motivo por el cual la ERN no disminuye tras la fertilización en antesis, como se observó en la red (Capítulo 2; Cuadro 2.3).

La aplicación de N en antesis también incrementó el contenido de aminoácidos en hojas a los 7 días post-antesis, con un marcado efecto de sitio. El sitio de mayor crecimiento (Arribeños), presentó los valores más bajos para todos los tratamientos (Figura 4.6), probablemente debido a su mayor capacidad de asimilar el N aplicado a proteínas y, además, una mayor biomasa aérea que generó una dilución del N absorbido. La fertilización foliar también incrementó el contenido de nitrato libre en hoja en los 3 sitios en magnitud variable entre sitios y tratamientos. A diferencia del resto de las variables bioquímicas, se observó un efecto de dosis, N40f se diferenció de N20f en 2 de los sitios. Cuando el cultivo tuvo mayor biomasa (Arribeños), la cantidad de nitrato fue menor, probablemente debido a la mayor asimilación hacia formas orgánicas observada (Cuadro 4.3; Figura 4.6). Como la actividad de NR permaneció constante en todos los tratamientos, podemos suponer que el aumento del contenido de nitrato no se debió a una caída en su actividad (Figura 4.10) y, por lo tanto, no disminuyó la asimilación del nitrato absorbido desde el suelo. El incremento de nitrato libre en hoja observado podría asociarse entonces a una sustitución de la fuente de N, donde el N absorbido vía foliar reemplaza al nitrato absorbido desde el suelo.

El contenido proteico en grano se correlacionó al contenido de aminoácidos y nitrato en hoja a los 7 días post-antesis, mientras que no tuvo relación con la proteína foliar ni la clorofila (Figura 4.8). La correlación positiva con el contenido de nitrato sugiere la posibilidad de que las plantas que tuvieron una oferta de N en forma de amonio (producto directo de la urea aplicada), durante el llenado no necesitaron reducir el nitrato absorbido del

suelo. Dado que el amonio puede ser incorporado directamente a proteínas, por lo que se requiere un paso menos de reducción con respecto al nitrato absorbido del suelo, pudieron haber causado una acumulación de este último, probablemente en vacuolas, apoyando la hipótesis del efecto de sustitución de la fuente de N. La débil relación observada entre el contenido de aminoácidos en hoja y la proteína en grano podría deberse al hecho que el aumento en el contenido de aminoácidos fue de carácter transitorio, ya que a partir de los 7 días post-antesis prácticamente no hubo diferencias. Por otro lado, la falta de correlación observada entre la proteína en grano y el contenido tanto de proteínas foliares como de clorofila puede ser debida a que la magnitud del incremento de ambas formas de N fue relativamente pequeño y transitorio.

4.4.3 Efecto de la fertilización foliar sobre la exportación de aminoácidos y la expresión de GS y trasportadores de aminoácidos

El aumento en la actividad y expresión génica de las tres isoformas de GS, una enzima clave en el proceso de asimilación del amonio y en el metabolismo del N en general (Bernard & Habash, 2009; Zhang et al., 2017), por efecto del agregado de N, indico una regulación positiva. La mayor dosis de N incrementó la actividad de GS a nivel global, posiblemente debido a la mayor disponibilidad de N para ser asimilado a aminoácidos (Figura 4.12). En trabajos anteriores, en cámara de cultivo, con aplicaciones de N en antesis, similares a las realizadas en este trabajo, también se observaron incrementos de la actividad de GS (Moller et al., 2009). Los resultados observados en el presente trabajo permiten corroborar a campo resultados obtenidos en condiciones controladas. Los incrementos en cámara, previamente reportados, fueron de mayor magnitud que los observados en el presente trabajo, probablemente debido a que las deficiencias nitrogenadas de los cultivos del tratamiento Control a campo, fueron menos severas que las deficiencias logradas en cámaras de cultivo. En cuanto a la expresión de las diferentes isoformas (Figura 4.11), pudimos observar que tanto GS2 como GS1_2, ambas isoformas relacionadas con la asimilación directa del N en cebada (Bernard & Habash, 2009), se vieron inducidas, en diferente magnitud, con ambas dosis de fertilizante. Para el caso de GS1_1 solo N20f incrementó la expresión a los 7 días post-antesis, mientras que N40f no se diferenció del Control (Figura 4.11). Este resultado podría estar sugiriendo que, para este gen, el aumento de la expresión frente a un incremento en la oferta de N es de carácter temporario (que solo es factible de ser visualizado dentro de los primeros 7 días posteriores a la primera aplicación). El aumento en la actividad observado sugiere que se indujo previamente la expresión del gen.

La aplicación foliar de N incrementó significativamente la tasa de exportación de aminoácidos vía floema a los 7 días post-antesis, mientras que a partir de los 14 días se diluyó el efecto, salvo en Arribeños (Figura 4.7). La tasa de movilización, está determinada por los aminoácidos provenientes tanto de la asimilación del N absorbido vía foliar, como de la removilización del N absorbido pre-antesis, ya que la aplicación de N no afectó la ERN. La movilización a los 7 días post-antesis fue dependiente del sitio, donde Junín tuvo una movilización mayor que los otros sitios, probablemente asociado a una menor síntesis de proteína en hoja y, por lo tanto, mayor disponibilidad de aminoácidos para ser exportados. La movilización de aminoácidos fue similar entre ambos tratamientos fertilizados, es posible que en el tratamiento N40f, la primera dosis haya generado un aumento de la movilización

alrededor de antesis que se diluyó con el tiempo y no fue detectado posteriormente, ya que el efecto se observó principalmente a los 7 días de aplicado. La tasa de movilización instantánea no estuvo asociada a la proteína en grano, sin embargo, la exportación total de aminoácidos entre los 7 y 21 días post-antesis, que determina el aporte de N vía floema a lo largo de ese período de llenado estuvo significativamente asociada a la proteína en grano (Figura 4.9). Esta observación indica que el aporte de N desde los órganos vegetativos es la principal fuente de N para el grano, como fue observado previamente (Dalling et al., 1976; Hirel et al., 2007; Habash et al., 2007; Bieker & Zentgraph, 2013) y apoya la teoría de que el contenido proteico en cereales es frecuentemente limitado por la fuente de N (Jenner et al., 1991). Por lo tanto, no solo la tasa de exudación, sino también la velocidad con que dicha tasa decae en el tiempo determinan la cantidad de aminoácidos que recibe el grano en formación durante el llenado. De esta forma, las condiciones que permitan mantener una mayor tasa de exudación en el llenado favorecerán el aporte de N al grano.

El aumento de la expresión de las isoformas citosólicas de GS1 (Figura 4.11) podría explicar en parte la mayor tasa de exudación de aminoácidos observada a los 7 días post-antesis, ya que trabajos anteriores sugieren que dichas isoformas juegan un rol importante en la regulación de la removilización y transporte de N en trigo (Bernard & Habash, 2009; Caputo et al., 2009). Se observó que la actividad de esta enzima está asociada a la eficiencia de removilización de N en trigo (Li et al., 2011; Zhang et al., 2017). Asimismo, este aumento de la exudación a los 7 días también podría estar relacionada con el aumento de la expresión de los genes AAP6 y AAP7 (Figura 4.11). Estos genes, que codifican para trasportadores de aminoácidos, de la familia de las aminoácido permeasas, que en trabajos anteriores se han reportado como posibles candidatos a mediar el transporte de aminoácidos vía floema desde los tejidos fuente a los destino (Kohl et al., 2012; Tegeder & Rentsch, 2010, Veliz, 2017). La alta eficiencia con que el N absorbido vía foliar se incorporó al grano parece estar relacionada con el incremento de actividad de GS, el aumento de la expresión de sus isoformas (Zhang et al., 2017) y la mayor expresión de los genes que codifican los trasportadores de aminoácidos AAP6 y AAP7.

4.5 CONCLUSIONES

La fertilización foliar en antesis incrementó todas las fracciones nitrogenadas analizadas en hoja: aminoácidos y nitrato aumentaron en todos los sitios, mientras que proteínas y clorofila aumentaron, solo en los casos donde el S no fue limitante.

La primera hipótesis planteada “La aplicación de N en antesis producirá un aumento, en estados tempranos del llenado, de la movilización vía floema de aminoácidos provenientes de la asimilación del N aplicado, hacia el grano”, fue aceptada. La cantidad de aminoácidos movilizados vía floema se incrementó en los tratamientos que recibieron N foliar a los 7 días post-antesis y luego se diluyó. La mayor movilización de N vía floema debida a la aplicación foliar, se debió a un incremento de la magnitud de la fuente de N, constituida por proteínas foliares y clorofila, y a un incremento de la tasa de disminución de las mismas, lo que indica una mayor degradación, manteniendo la removilización de N acumulado pre-antesis. El incremento de la degradación de proteínas y de la expresión de la proteasa SAG12 a los 7

días, indica que no solo no se retrasó el inicio de la senescencia foliar, sino pudo haberse inducido frente a un incremento en los pooles de N orgánico en el período post-antesis.

En función de estos resultados, se rechaza la segunda hipótesis planteada “La asimilación del N incorporado en antesis producirá un retraso del inicio de la senescencia que redundará en un retraso del inicio de la removilización del N almacenado pre-antesis”. Este mayor aporte, cuantificado como la integral de la tasa de exportación, fue la variable que mejor explicó el contenido final de proteína en el grano. El mayor aporte de N orgánico vía floema al grano se asoció a una mayor actividad y expresión génica de GS, confirmando observaciones de trabajos previos que indican que esta enzima resulta clave en el metabolismo de N y la productividad. La mayor movilización de N se relacionó a un incremento en la expresión génica de transportadores de aminoácidos.

El mecanismo descripto permitió comprender el efecto de la aplicación foliar en dosis de 20 y 40 kg de N ha^{-1}, sobre el contenido proteico. Los efectos fueron similares entre las dosis evaluadas, por lo tanto, la aplicación de 20 kg de N ha^{-1} parece ser suficiente para mejorar la calidad maltera. En función de los efectos sobre las variables agronómicas estudiadas, cuando el cultivo sufra limitaciones importantes de N, debería considerarse una fertilización basal, para corregir las deficiencias y lograr el potencial de rendimiento y maximizar la eficiencia de la aplicación foliar como método de manejo de la calidad de grano ya que aumentar la dosis de N aplicado en etapas tardías parece ser poco efectivo.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN GENERAL

5.1 Análisis de objetivos, hipótesis, principales resultados y relación entre los capítulos de la tesis.

En función de la problemática actual, planteada y discutida en el Capítulo 1, una de las alternativas tecnológicas propuesta es la aplicación de N en antesis, para corregir el contenido proteico de los granos. Si bien existía información disponible acerca del efecto de esta práctica, no se encontró una metodología ajustada para predecir la necesidad de aplicación y estimar su respuesta. Trabajos previos lograron buenas estimaciones, tanto del rendimiento como de la proteína, utilizando sensores remotos, aunque en general la información provenía de pocos sitios experimentales, en situaciones de baja variabilidad ambiental y de manejo de los cultivos. Asimismo, era escasa la información acerca del efecto que tiene la aplicación tardía de N sobre la removilización del mismo, particularmente en situaciones de campo. Esta tesis se propuso para un estudio del efecto de esta práctica a nivel productivo, en varios sitios experimentales durante 3 campañas, por lo que se logró una amplia variabilidad, tanto en la disponibilidad de N, como en las condiciones ambientales y de manejo de los cultivos. Esta tesis está basada en tres hilos principales, el estudio del efecto de la aplicación foliar de N sobre la proteína en grano, la estimación de la necesidad de fertilización y el estudio del mecanismo de asimilación y la regulación de la removilización.

El primer objetivo “Determinar el efecto de la aplicación de N en antesis sobre la proteína y el calibre de los granos en cebada y la removilización de N al grano” fue abordado en el Capítulo 2. Se determinó que, mediante la aplicación foliar de N se incrementó el contenido proteico en grano en promedio 0,67 puntos porcentuales, representando 0,0335 puntos por kg de N aplicado. La proteína en el tratamiento N20f se relacionó a la proteína del Control, los sitios de baja proteína, tuvieron una mayor respuesta (Figura 2.20a). La respuesta no se asoció al estado nutricional del cultivo ni a la disponibilidad de N del suelo al momento de la aplicación, por lo que no se pudo estimar al momento de la aplicación mediante variables de cultivo y/o de sitio. Se puede inferir que el incremento de proteína por la aplicación foliar será mayor cuando se espera que el cultivo tenga bajo nivel de proteína y en aquellos cultivos que tengan menor crecimiento pre-antesis independiente de su disponibilidad de N o estado de nutrición nitrogenada. Asimismo, no se afectó el rendimiento ni el calibre del grano (Cuadro 2.2).

Si bien se determinó que la fertilización foliar incrementó la proteína, desde el punto de vista productivo, es necesario determinar situaciones donde ésta será deficiente y, por lo tanto, recomendar esta práctica. Para ello se planteó el objetivo específico “Predecir la necesidad de fertilización complementaria mediante evaluaciones del estado nutricional del cultivo en antesis usando mediciones directas e indirectas (sensores remotos). Identificar variables de suelo o cultivo que puedan complementar los índices espectrales y permitan diagnosticar la necesidad de aplicación de N”. En función de este objetivo se ajustaron varias relaciones, entre mediciones directas del cultivo en antesis y la proteína, donde se estableció que el contenido de N en planta (Figura 2.15a) y los Índices de Nutrición Nitrogenada (INN), calculados con curvas de dilución (Figuras 2.17a y 2.17b), fueron las principales variables en antesis relacionadas a la proteína del grano a cosecha. Cuando se intentó evaluar el estado nutricional del cultivo mediante el cálculo de INN basados en curvas de dilución críticas reportadas previamente para cebada (Justes et al., 1994; Zhao, 2014), se observó que ambas

subestimaron en gran medida el estado nutricional del cultivo, por lo que no parecen representar adecuadamente a los cultivos de cebada actuales. Por este motivo, se elaboró una curva de dilución (Figura 2.9a), tomando de referencia los cultivos bien provistos de N para probarla como herramienta de diagnóstico de la nutrición nitrogenada. Si bien no se puede afirmar que es una curva de dilución crítica, ya que el diseño de los experimentos de esta Tesis no permite establecer el contenido crítico de N en cada sitio experimental, puede ser considerada una primera aproximación.

Se determinó también que la relación entre el contenido de N en planta en antesis y la proteína en el grano a cosecha depende de la proporción de N del grano que proviene de la removilización (Figuras 2.16a y 2.16b), que se relacionó inversamente a la oferta de N en post-antesis (Figura 2.12d). Es decir, en los sitios donde la oferta de N del suelo fue menor, la removilización de N resultó la principal fuente de N de los granos y hubo una estrecha relación entre el estado nutricional del cultivo en antesis y la proteína en los granos a cosecha. Es así como se aceptó la hipótesis propuesta que afirmaba que "La relación entre el estado nutricional del cultivo en antesis y el contenido de proteína en el grano a cosecha depende de la proporción de N del grano que proviene de la removilización, y de las condiciones ambientales durante el llenado de grano". Sin embargo, no se lograron identificar características del suelo asociadas a estos sitios con baja oferta de N durante el llenado. Sólo se evaluó el contenido de N como nitrato en antesis, pero éste no es la única fuente de N para el cultivo durante el llenado. La determinación de algún índice asociado a la capacidad de mineralización de N del suelo (e.g. mediante una incubación) quizás permita identificar suelos donde su baja oferta de N haga al cultivo más dependiente de la removilización de N. De esta manera sería más predecible el contenido de proteína en los granos evaluando del estado nutricional del cultivo en antesis. Integrando el INN en antesis con la humedad del suelo en antesis y las temperaturas máximas durante el llenado, superiores a 29 ^{0}C, en un modelo de regresión múltiple se logró una mejor estimación de la proteína (Ecuación 2.1). Por otro lado, la aplicación foliar no afectó la removilización del N acumulado en pre-antesis, contrariamente al efecto de la fertilización temprana con altas dosis de N (Cuadro 2.3).

Si bien el status nitrogenado del cultivo, evaluado por el contenido de N y los INN, permitieron realizar una estimación de la proteína en antesis, las mediciones de ambas variables (i.e. biomasa aérea y contenido de N), a nivel productivo pueden resultar lentas y engorrosas. En función de desarrollar una tecnología sencilla para estimar la proteína en grano, en el Capítulo 3 se ajustaron índices espectrales a partir de la reflectancia medida en antesis y modelos basados en dichos índices para predecir la proteína (Figura 3.9; Ecuación 3.3), que permitieron una rápida, aunque menos precisa, estimación de la nutrición nitrogenada. Varios índices reportados previamente como estimadores de proteína se relacionaron débilmente (REIP) o no se relacionaron (TCARI, MCARI, SR), por lo que se exploraron nuevos índices en función del sensor multiespectral usado. Esta falta de relación observada en la red con índices que fueron reportados como estimadores de la proteína se puede atribuir a que en la mayoría de los trabajos donde observaron una relación con la proteína, la variabilidad en el contenido de N en el cultivo se realizó mediante el agregado de N en varias dosis. En estos casos, las dosis de N no sólo cambian el contenido de N, sino también la acumulación de biomasa y de N absorbido en planta. Por lo tanto, un índice que se relacione con la biomasa y/o con el N absorbido, puede aparecer como relacionado con el

contenido de N del cultivo, ya que ambas variables cambian simultáneamente. Por lo tanto, los índices deben estar relacionados directamente al contenido de N en la biomasa área para poder estimar el estado nutricional en cultivos que son muy distintos al momento de la medición, como los analizados en la presente Tesis. La reflectancia en la banda de 1080 nm (R_{1080}, NIR) medida sobre el cultivo en antesis se relacionó con la proteína de los granos a cosecha. Su combinación con R_{730} (borde rojo) formando parte de índices (i.e. cocientes o diferencias normalizadas) permitieron una mejor estimación, aunque la precisión fue baja con todos los índices probados (Cuadros 3.5 y 3.6). Esta baja precisión en la estimación se debió a que los principales estimadores de la proteína al momento de antesis (i.e. contenido de N e INN) tuvieron una débil relación con los índices (Cuadros 3.2 y 3.3; Figuras 3.3 y 3.5). Al igual que en el caso de la medición directa, la precisión de la estimación estuvo relacionada a la contribución de la removilización (Figuras 3.9a y 3.9b). A diferencia de la proteína, el rendimiento se pudo estimar con alta precisión mediante índices medidos en antesis (Ecuación 3.1). A partir de esta estimación del rendimiento y la relación entre el N disponible por unidad de rendimiento y la proteína observada en el Capítulo 2 de esta tesis (Figura 2.15c), con el N disponible y el rendimiento estimado se logró una aceptable estimación de la proteína (Figura 3.10a). Se estableció que se debe disponer de al menos 25,5 kg de N por Mg de rendimiento estimado para obtener un 10% de proteína, si la disponibilidad fuera menor, sería recomendable una aplicación en antesis para corregir la baja proteína.

El segundo objetivo general “Determinar el mecanismo por el cual el N aplicado en antesis es movilizado durante el llenado, su efecto sobre la regulación de la removilización de N de las hojas hacia los granos, y su relación con el contenido de proteínas establecido en los granos”, fue abordado en el Capítulo 4. El estudio realizado, a nivel de las diferentes fracciones nitrogenadas en la planta, permitió comprender la manera en que el N absorbido vía foliar se movilizó hacia los granos para explicar el incremento de proteína en grano. El N absorbido a partir de la aplicación foliar aumentó las fracciones nitrogenadas de la hoja (Figuras 4.5 y 4.6), el efecto fue variable entre sitios debido a limitaciones nutricionales. Cuando el cultivo no tuvo deficiencia de S, se incrementaron todas las fracciones, sin embargo, bajo deficiencia de S, sólo se incrementó el contenido de aminoácidos y nitrato sin aumentar el contenido de proteína ni de clorofila (Figura 4.5). La deficiencia de S modificó la respuesta a la aplicación foliar en cuanto a las variables bioquímicas, sin embargo, no limitó el incremento de la proteína en grano ni deprimió el rendimiento como sí ocurrió con la aplicación inicial de N en alta dosis (Figura 4.2). La deficiencia de N, observada en el sitio de 25 de mayo (Figura 4.2), tampoco condicionó la respuesta a la aplicación foliar. La aplicación de una mayor dosis de N, en algunos casos incrementó ciertas fracciones nitrogenadas en hoja, aunque no se tradujo en un incremento de la proteína en el grano, por lo que parece existir algún mecanismo limitante a la síntesis de proteína a nivel del grano. En este Capítulo se establecieron las relaciones entre las distintas fracciones nitrogenadas en las hojas a los 7 días post-antesis y la proteína en grano. El contenido de nitrato y, en menor medida, el contenido de aminoácidos, se relacionaron a la proteína en grano (Figura 4.8). No obstante, la variable que permitió explicar en mayor medida la proteína en grano fue el total de los aminoácidos exportados vía floema al grano, calculado como la integral de la función de exportación entre los 7 y 21 días post antesis (Figura 4.9). De esta forma, se aceptó la primera hipótesis asociada que afirmaba que “La aplicación de N en antesis producirá un

aumento en estadios tempranos del llenado de la movilización vía floema de N, en forma de aminoácidos, al grano, provenientes de la asimilación del N aplicado". Esta mayor movilización se relacionó a una mayor actividad y expresión de la enzima Glutamina Sintetasa (GS), (Figura 4.12) y de dos trasportadores de aminoácidos (Figura 4.13).

Respecto al efecto de la aplicación foliar sobre la regulación de la removilización de N al grano, la hipótesis planteada "La asimilación del N incorporado en antesis producirá un retraso del inicio de la senescencia que redundará en un retraso del inicio de la removilización del N almacenado pre-antesis" fue refutada. La aplicación foliar no retrasó el inicio de la senescencia, estimado a través de la tasa de disminución de la clorofila y el nivel de expresión del gen marcador de senescencia SAG12 y, por el contrario, aumentó la tasa de disminución de las proteínas foliares (Figura 4.7). Por lo tanto, el incremento del contenido de proteínas foliares no reprimiría su degradación, ni retrasaría la senescencia foliar. En función de lo observado a nivel bioquímico y molecular (Capítulo 4), se pudo determinar el mecanismo de aporte de N al grano, que explicó la respuesta, en términos de proteína en grano frente a la fertilización foliar, observada en la red. Además, en este capítulo, se evaluó el efecto de un incremento de la dosis de N (40 kg ha^{-1}) y se determinó que, si bien aumentó el contenido de las diferentes fracciones nitrogenadas en la planta, este incremento de dosis no se tradujo en un aumento de la proteína del grano.

A nivel general se cumplieron los objetivos previstos para la presente tesis, la red tuvo una amplia variabilidad, en condiciones ambientales y tecnologías de manejo de los cultivos, que permitió evaluar la práctica de fertilización foliar para la corrección de la proteína sobre cultivos comerciales. Si bien los modelos generados en esta tesis no pudieron ser validados con datos independientes, permitieron un avance en la comprensión del efecto de la aplicación foliar. Esta tesis presenta un avance respecto a la estimación del contenido de proteína en grano ya que, en general, en la bibliografía se encuentran resultados o modelos obtenidos en condiciones de poca variabilidad, que son poco representativas de las condiciones a nivel de producción. Además, en el estudio a nivel bioquímico y molecular llevado a cabo se pudo avanzar en la compresión del proceso de removilización en condiciones de campo.

5.2 Aportes originales

Avance en la comprensión de la asimilación del N aplicado vía foliar: Se determinó que el N absorbido vía foliar se asimila en las fracciones orgánicas de N en hoja (proteína, clorofila y aminoácidos), debido a un incremento en la actividad y expresión génica de la enzima GS y, por lo tanto, se incrementa la reserva de N (proteína, clorofila). Además, se determinó que, si existe otra limitación, como la deficiencia de S, no se incrementa la síntesis de proteínas y se asimila sólo a aminoácidos. Este incremento del contenido de nitrato en hoja observado podría deberse a una sustitución de la fuente de N; ya que la aplicación foliar no redujo la actividad asimilatoria del nitrato absorbido del suelo, evaluada a través de la actividad de la Nitrato Reductasa (NR). La mayor magnitud de las reservas y su más rápida disminución, indicando una más rápida degradación, aumentaron la exportación de aminoácidos al grano, en todo el período de llenado, mediado por un incremento en la expresión, en etapas tempranas, de los genes de los transportadores de aminoácidos (AAP6

y AAP7), lo que explicó el aumento de la proteína en los granos. El contenido de proteínas foliares y de clorofila no se relacionaron al incremento de la proteína en el grano, por lo que parece, que todas las fracciones nitrogenadas contribuyeron al aporte al grano, lo que explica el efecto de la fertilización sobre la proteína en grano aún en los casos donde la síntesis de proteínas foliares fue limitada por una deficiencia de otro nutriente como el S.

Comprensión de la interacción entre la aplicación foliar y la removilización de N: Se determinó, a escala de cultivo, que la fertilización nitrogenada en antesis no afectó la removilización del N almacenado pre-antesis (Cuadro 2.3). En el estudio a nivel bioquímico y molecular, se determinó que la mayor magnitud de las reservas de N en hoja no retrasó el inicio de la senescencia. Además, en los sitios donde se incrementó el contenido de proteínas foliares y clorofila, aumentó la tasa de disminución de las mismas, por lo que se infiere que aumentó su velocidad de degradación. A consecuencia de la mayor tasa de disminución, la proteína en hoja al final del llenado fue similar al Control, por lo que la cantidad de N en rastrojo no aumenta y la eficiencia de removilización no disminuyó.

Desarrollo de modelos explicativos de la proteína en grano: En esta tesis se desarrollaron modelos que permitieron estimar y/o explicar la proteína de los granos, en situaciones de alta variabilidad en cuanto a cultivo y condiciones ambientales. La proteína se estimó con una serie de variables medidas en antesis, entre las que el INN calculado en base a una curva de dilución de referencia, tuvo la relación más robusta. A su vez, un modelo explicativo que incluyó el INN junto con la humedad del suelo en antesis y la suma térmica mayor a 29 ºC en los primeros 30 días del llenado, permitieron explicar la proteína con una mayor precisión (Ecuación 2.1). Se determinó que la principal limitante a la predicción fue la proporción de N que aportó la removilización al grano, inversamente relacionada a la oferta de N en el suelo en post-antesis, considerada como la cantidad de N-NO_3 disponible en antesis y la mineralización aparente en el llenado.

Desarrollo y evaluación de índices para estimar rendimiento y proteína a escala regional con sensores remotos: Para estimar el rendimiento se estableció un modelo lineal combinando varios índices (Ecuación 3.1), que mejoró el ajuste respecto a índices individuales. Este modelo, además de estimar el rendimiento permitió estimar la proteína conociendo el N disponible en el suelo al inicio del cultivo (Figura 3.10a). Otros modelos para estimar la proteína en grano que incluyeron únicamente índices, como el cociente entre el N absorbido final estimado por Mg de rendimiento estimado, disminuyeron la precisión. Debido a que los índices incluidos en el modelo, para estimar el rendimiento, no utilizaron franjas de referencia serían más prácticos a nivel productivo que sistemas de prescripción que se utilizan actualmente donde es necesaria una parcela sin limitación de N.

5.3 Propuestas para investigaciones futuras

Avanzar en la comprensión del aporte de N del suelo en post-antesis: En esta tesis se observó que la proporción de N en el grano proveniente de removilización, inversamente relacionado al aporte de N durante el llenado, es el factor que condiciona la precisión de la estimación de la proteína en antesis. La cantidad de nitrato disponible en antesis en el tratamiento Control (condiciones standard de producción), son muy bajos y no permitieron

estimar el aporte del suelo al grano, por lo tanto, la oferta de N durante el llenado dependió de la mineralización, aunque no se pudieron determinar los factores que regulan la magnitud de este aporte. Determinaciones como el N mineralizado durante una incubación anaeróbica podrían contribuir a estimar este aporte y mejorar la estimación de la proteína.

Desarrollar y probar los modelos de predicción obtenidos: A partir de mediciones con sensores multiespectrales a escala de cultivos usando diferentes plataformas, como drones o imágenes satelitales. Con mediciones a nivel de lote se podrían definir ambientes de altos rendimientos donde haya una alta probabilidad de obtener baja proteína o bien estimar directamente el status nitrogenado y predecir situaciones de baja proteína y recomendar una aplicación variable del N foliar.

Calibrar una curva de dilución crítica de N para el cultivo de cebada: se determinó que las curvas previamente reportadas en la literatura no representaron adecuadamente el estado nutricional del cultivo en la zona de estudio.

CAPÍTULO 6: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbate, P.E., Andrade, F.H., Culot J.P. & Brindraban, P.S. 1997. Grain yield in wheat: effects of radiation during spike growth period. Field Crops Research. 54: 245-257.

Abeledo, L.G., Calderini, D.F. & Slafer, G. A. 2003. Genetic improvement of barley yield potential and its physiological determinants in Argentina (1944–1998). Euphytica 130, 325–334.

Abeledo, L.G., Calderini, D.F., & Slafer, G.A. 2008. Nitrogen economy in old and modern malting barleys. Field Crops Research. 106(2): 171-178.

Adiputra, G.K. & Anderson, J.W. 1995. Effect of sulphur nutrition on redistribution of sulpbur in vegetative barley. - Physiol. Plant. 95: 643-650.

Alvarez Prado, S., Gallardo, J.A., Serrago, R.A., Kruk, B.C. & Miralles, D.J. 2013. Comparative behavior of wheat and barley associated with field release and grain weight determination. Field Crops Research 144: 28-33.

Alvarez Prado S., Gallardo J.M., Kruk B.C., Miralles D.J. 2017. Strategies for yield determination of bread wheat and two-row barley growing under different environments: A comparative study. Field Crops Research 203: 94-105.

Alzueta, I. Arisnabarreta, S., Abeledo, L.G. & Miralles, D. J. 2014. A simple model to predict phenology in malting barley based on cultivar thermo-photoperiodic response, Computers and Electronics in Agriculture. 107: 8-19.

Arisnabarreta, S. & Miralles. D.J. 2008. Critical period for grain number establishment of near isogenic lines of two- and six-rowed barley. Field Crops Research. 107: 196-202.

Arnon, D. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. Plant Physiology. 24 1-15.

Austin R.B., Ford, M.A., Edrich J.A. & Blackwell, R.D. 1977. The nitrogen economy of winter wheat. J. Agric. Sci. 88: 159-167.

Avice, J.C. & Etienne, P. 2014. Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (Brassica napus L.). Journal of Experimental Botany 65: 3813-3824.

Baethgen, W.E. & Alley, M.M. 1989. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. Communications in Soil Science and Plant Analysis 20: 961-969.

Baethgen, W., Christianson, C.B. & García Lamothe, A. 1995. Nitrogen fertilizar effects on growts, grain yield, and yield components of malting barley. Field Crops Research. 43: 87-99.

Bancal, M., Roche, R. & Bancal, P. 2008. Late foliar diseases in wheat crops decrease nitrogen yield through N uptake rather than through variations in N remobilization, Annals of Botany, 102: 579-590.

Barneix, A.J., Arnozis, P.A. & Guitman. M.R. 1992. The Regulation of Nitrogen Accumulation in the Grain of Wheat Plants (Triticum aestivum L.). Physiologia Plantarum 86: 609-615.

Barnes, E.M., Clarke, T.R., Richards, S.E., Colaizzi, P.D., Haberland, J., & Kostrzewski, M. 2000. "Coincident detection of crop water estrés, nitrogen status and canopy density using ground-based multispectral data," in Proceedings of the 5th International Conference on Precision Agriculture, Bloomington, MN.

Bell, M.J., Strong, W., Elliott, D., & Walker, C. 2013. Soil nitrogen-crop response calibration relationships and criteria for winter cereal crops grown in Australia. Crop and Pasture Science, 64: 442–460.

Bernard, S.M. & Habash, D.Z. 2009. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling, New Phytologist, 182: 608-620.

Bhullar S.S. &. Jenner, C.F. 1985. Differential responses to high temperatures of starch and nitrogen accumulation in the grain of four cultivars of wheat. Australian Journal of Plant Physiology 12: 363–375.

Bieker, S. & Zentgraf, U. 2013. "Plant senescence and nitrogen mobilization and signaling," in Senescence and Senescence-Related Disorders, eds Z. Wang and H. Inuzuka (Croatia: INTECH), 104: 53–83.

Bly, A.G. & Woodard, H.J. 2003. Foliar Nitrogen Application Timing Influence on Grain Yield and Protein Concentration of Hard Red Winter and Spring Wheat. Agronomy journal, 95: 335-338.

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 Sensing of Environment, 81: 179-193.

Bouyoucus, G. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. Agronomy Journal. 54: 464-465.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. – Anal. Biochem. 72: 248-254.

Bray, R.H. & Kurtz, L.T. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. Soil Science, 59: 39-45.

Briggs, D.E., Boulton, C.A., Brookes, P.A. & Stevens, R. 2004. Brewing. Science and practice. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England & CRC Press. Boca Raton. U.S.A.

Broge, N. & Leblanc, E. 2000. "Comparing Prediction Power and Stability of Broadband and Hyperspectral Vegetation Indices for Estimation of Green Leaf Area and Canopy Chlorophyll Density." Remote Sensing of Environment 76: 156-172.

Bulman, P. & Smith, D.L. 1993a. Grain protein response of spring barley to high rates and post-anthesis application of fertilizer nitrogen. Agronomy Journal. 85: 1109-1113.

Bulman, P. & Smith, D.L. 1993b. Yield and yield component response of spring barley to fertilizer nitrogen. Agronomy Journal. 85: 226-231.

Bulman, P. & Smith, D.L. 1994. Post-heading nitrogen uptake, retranslocation, and partitioning in spring barley. Crop Science, 34(4): 977-984.

Caputo, C., Criado, M.V., Roberts, I.N., Gelso, M.A., Barneix, A.J. 2009. Regulation of glutamine synthetase 1 and amino acids transport in the phloem of young wheat plants. – Plant Physiol. Biochem. 47: 335-342.

Carter, G. 1998. Reflectance Wavebands and Indices for Remote Estimation of Photosynthesis and Stomatal Conductance in Pine Canopies. Remote Sensing of Environment. 63: 10.

Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E., & Youngs, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. – Commun. Soil Sci. Plant Anal. 6: 71-80.

Cassman K.G., Bryant D.C., Fulton A.E. & Jackson L.F. 1992. Nitrogen supply effects on partitioning of dry matter and nitrogen to grain of irrigated wheat. Crop Science, 32: 1251-1258.

Chandel, N., Tiwari, P., Singh, K., Jat, D., Gaikwad, B.B., Tripathi, H. & Golhani, K. 2019. Yield prediction in wheat (Triticum aestivum L.) using spectral reflectance indices. Current Science. 116: 272-278.

Chauhan, S., Srivalli, S., Nautiyal, A., Khanna-Chopra, R. 2009. Wheat cultivars differing in heat tolerance show a differential response to monocarpic senescence under high-temperature estrés and the involvement of serine proteases. Photosynthetica 47: 536-547.

Cilia, 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 Sensing. 6, 6549-6565.

Collins, W. 1978. Remote sensing of crop type and maturity. Photogrammetric Engineering and Remote Sensing 44 (1): 43-55.

Crafts-Brandner, S.J., Hölzer, R. & Feller, U. 1998. Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. Physiologia Plantarum, 102: 192-200.

Dalling, M.J., Boland, G. & Wilson, J.H. 1976. Relation between acid proteinase activity and redistribution of nitrogen during grain development in wheat. Aust J Plant Physiol 3: 721-830.

Dalling, M.J. 1985. The physiological basis of nitrogen redistribution during grain filling in cereals. In: Exploitation of physiological and genetic variability to enhance crop productivity. J.D. Harper, L.E. Schrader and R.W. Howell (Eds.) New York: American Society of Plant Physiology: 55-69.

Daughtry, C.S., Walthall, C.L., Kim, M.S., De Colstoun, E.B. & McMurtrey, J.E. 2000. Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance. Remote Sensing. Environment. 74: 229-239.

Demotes-Mainard, S., Jeuffroy, M.H. & Robin, S. 1999. Spike dry matter and nitrogen accumulation before anthesis in wheat as affected by nitrogen fertilizer: relationship with kernel per spike. Field Crop Research. 64: 249-259.

Dreccer, M., Ruiz, R., Maddonni, G., & Satorre, E. 2003. Bases ecofisiológicas de la nutrición en los cultivos de grano. En Producción de cultivos de granos. Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires, Argentina. 481-497.

Duarte, C.M. (coord.), Alonso, S. Benito, G., Dacha, J., Montes, C. Pardo, M., Ríos, A. F., Simó, R. & Valladares, F. 2006. Cambio global. Impacto de la actividad humana sobre el sistema Tierra. Consejo Superior De Investigaciones Científicas. Madrid, España.

Dupont, F.M. & Altenbach, S.B. 2003. Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. J. Cereal Sci. 38: 133-146.

Eagles, H.A., Bedgood, A.G., Panozzo, J.F. & Martin, P.J. 1995. Cultivar and environmental effects on malting quality in barley. Aust. J. Agric. Res. 46: 831-844.

Ehdaie, B. & Waines, J.G. 2001. Sowing date andnitrogen rate effects on dry matter and nitrogen partitioning in bread and durum wheat. Field Crops Research. 73: 47-61.

Eitel, J.U.H., Long, D.S., Gessler, P.E. & Hunt, E.R. 2008. Combined Spectral Index to Improve Ground-Based Estimates of Nitrogen Status in Dryland Wheat. Agronomy Journal 100: 1694-1702.

Eitel, J.U.H., Long, D.S., Gessler, P.E., Hunt, E.R. & Brown, D.J. 2009. Sensitivity of Ground-Based Remote Sensing Estimates of Wheat Chlorophyll Content to Variation in Soil Reflectance. Soil Science Society of America Journal, 73: 1715-1723.

Elía, M., Slafer, G.A. & Savin, R. 2018. Yield and grain weight responses to post-anthesis increases in maximum temperature under field grown wheat as modified by nitrogen supply Field Crops Res, 221: 228-237.

Elsayed, S., Barmeier, G. & Schmidhalter U. 2018. Passive Reflectance Sensing and Digital Image Analysis Allows for Assessing the Biomass and Nitrogen Status of Wheat in Early and Late Tillering Stages. Frontiers in Plant Science 9: 1478.

Ercoli, L., Lulli, L., Mariotti, M., Masoni, A. & Arduini, I. 2008. Post-anthesis dry matter and nitrogen dynamics in durum wheat as affected by nitrogen supply and soil water availability. European Journal of Agronomy 28: 138-147.

Erdle, K., Mistele, B. & Schmidhalter, U. 2011. Comparison of active and passive spectral sensors in discriminating biomass parameters and nitrogen status in wheat cultivars. Field Crops Research. 124: 74-84.

Erdle, K., Mistele, B. & Schmidhalter, U. 2013. Spectral high-throughput assessments of phenotypic differences in biomass and nitrogen partitioning during grain filling of wheat under high yielding Western European conditions. Field Crops Res. 141: 16-26.

FAOSTAT, 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/S, visitado El 13 de marzo de 2019.

Feng, W., Zhu, Y., Tian, Y.C., Cao, W.X., Guo, T.C. & Wang, C.Y. 2008. Prediction of wheat grain protein yield by canopy hyperspectal remote sensing. 27: 903-910.

Ferraris, G., Bergh, R. Loewy, T. Ventimiglia, L. Couretot, L. Gutierrez Boem, F.H. & Prystupa, P. 2008. Fertilización de cebada cervecera cv. scarlett: III. Efecto del nitrógeno en espigazón y su interacción con el nitrógeno inicial. XXI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, San Luis.

Ferraris, G. N., Mousegne, F., López de Sabando, M. & Couretot, L. 2011. Dosis y fuentes de nitrógeno-azufre y zinc en una secuencia trigo-soja en el mediooeste bonaerense. La Trinidad, General Arenales. Informaciones Agronómicas IPNI http://lacs.ipni.net/ipniweb/region/lacs.nsf/

Ferwerda, J. G., Skidmore, A. K. & Mutanga, O. 2005. Nitrogen detection with hyperspectral normalized ratio indices across multiple plant species, International Journal of Remote Sensing, 26: 4083-4095.

Filella I. & Penuelas, J. 1994. The red edge position and shape as indicators of plant chlorophyll content, biomass and hydric status. International Journal of Remote Sensing, 15:7: 1459-1470.

Fischbeck, G. 2001. Contribution of barley to agriculture: a brief overview. En: G.A.Slafer, J.L. Molina-Cano, R. Savin, J.L. Araus & I. Romagosa (eds) Barley Science. Recent advances from molecular biology to agronomy of yield and quality. Food Product Press, New York.

Fischer, R.A. 1993. Irrigated spring wheat and timing and amount of nitrogen fertilizer. II. Physiology of grain yield response. Field Crop Res. 33: 57-80.

Fitzgerald, G., Rodriguez, D. & O'Leary, G. 2010. Measuring and predicting canopy nitrogen nutrition in wheat using a spectral index—the canopy chlorophyll content index (CCCI). Field Crops Res., 116: 318-324.

Fox, R.H. & Walthal, C.L. 2008. Crop Monitoring Technologies to Assess Nitrogen Status. Nitrogen in Agricultural Systems. 647-674.

Freeman, K.W., Raun, W.R. Johson, G.V. Mullen, R.W. Stone, M.L. & Solie, J.B. 2003. Late-season prediction of wheat grain yield and grain protein. Communications in Soil Science and Plant Analysis 34: 1837-1852.

Gaju, O., Allard, V., Martre, P., Le Gouis, J., Moreau, D., Bogard, M., Hubbart, S. & Foulkes, M. 2014. Nitrogen partitioning and remobilization in relation to leaf senescence, grain yield and grain nitrogen concentration in wheat cultivars. Field Crops Res., 155: 213-223.

Gan, S. & Amasino, R.M. 1997. Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. Plant Physiology 113: 313-319.

Gitelson, A.A., & Merzlyak, M.N. 1997. Remote estimation of chlorophyll content in higher plant leaves, International Journal of Remote Sensing, 18:12, 2691-2697.

Gitelson, A.A., Merzlyak, M.N. & Grits, Y. 1998. Remote sensing of chlorophyll concentration in higher plant leaves. Advances in Space Research, 22: 689-692.

Gitelson, A.A., Vinã, A., Arkebauer, T.J., Rundquist, D.C.; Keydan, G. & Leavitt, B. 2003. Remote estimation of leaf area index and green leaf biomass in maize canopies. Geophysical Research Letters, v. 30, 5, :52-56.

Gitelson, A.A., Kaufman, Y.J. & Merzlyak. M.N. 1996. Use of green channel in remote sensing of global vegetation EOS-MODIS. Remote Sens. Environ. 58: 289-298.

Gooding, M.J., Kettlewell, P.S., & Hocking, T.J. 1991. Effects of urea alone or with fungicide on the yield and breadmaking quality of wheat when sprayed at flag leaf and ear emergence. The Journal of Agricultural Science, 117. 02: 149.

Gooding, M.J. & W.P. Davies. 1992. Foliar urea fertilization of cereals. Fertilization Res., 32: 202-222.

Gregersen, P.L., Holm, P.B. & K. Krupinska. 2008. Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. Plant Biology, 10: 37-49.

Gutierrez Cabello (Coord), Pérez Barcia, V. Ciancio, A. & Misirlian, E. 2017. Serie de documentos de economía regional. Análisis de la cadena agroindustrial de la cebada cervecera en argentina. Escuela de Economía y Negocios, U.N. San Martin. Disponible http://www.unsam.edu.ar/escuelas/economia/economia_regional/cebada.pdf.

Habash, D.Z., Bernard, S., Schondelmaier, J., Weyen, J. & Quarrie, S.A. 2007. The genetics of nitrogen use in hexaploid wheat: N utilisation, development and yield, Theor. Appl. Genet., 114: 403-419.

Haboudane, D. 2004. "Hyperspectral Vegetation Indices and Novel Algorithms for Predicting Green LAI of Crop Canopies: Modeling and Validation in the Context of Precision Agriculture." Remote Sensing of Environment 90: 337-352.

Haboudane, D., Miller, J.R., Tremblay, N., Zarco-Tejada, P.J. & Dextrazec, L. 2002. Integrated narrow-band vegetation indices for prediction of cropChlorophyll content for application to precision agriculture. Remote Sens.Environ. 81: 416–426.

Hackl, H., Baresel, J.P., Mistele, B., Hu, Y. & Schmidhalter, U. 2012. A comparison of plant temperatures as measured by thermal imaging and infrared thermometry. J Agron Crop Sci 198: 415-429.

Hansen, P.M., Jørgensen, J.R. & Thomsen, A. 2002. Predicting grain yield and protein content in winter wheat and spring barley using repeated canopy reflectance measurements and partial least squares regression. Journal of Agricultural Science. 139: 307-318.

Hatfield, J.L., Gitelson, A.A., Schepers, J.S. & Walthall, C.L. 2008. Application of Spectral Remote Sensing for Agronomic Decisions. Agronomy Journal 100: 117-131.

Heitholt, J., Croy, L., Maness, N., & Nguyen, H.T. 1990. Nitrogen partitioning in genotypes of winter wheat differing in kernel N concentration. Field Crops Res. 23: 133-144.

Hirel. B., Le Gouis, J., Ney B. & Gallais, A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. Journal of Experimental Botany 58: 2369-2387.

Huete, A., Didan, K., Miura, T., Rodriguez, E.P., Gao, X. & Ferreira L.G. 2002. Overview of the radiometric and biophysical performance of the MODIS vegetation indices, Remote Sensing of Environment, 83, 1–2, 195-213.

Inoue, Y., Sakaiy, E., Zhu, Y. & Takahashi, W. 2012. Diagnostic mapping of canopy nitrogen content in rice based on hyperspectral measurements. Remote Sensing of Environment, 126: 210-221.

Jenner, C. F. 1994. Starch synthesis in the kernel of wheat under high temperature conditions. Australian Journal of Plant Physiology 21: 791- 806.

Jenner, C.F., Ugalde, T. & Aspinall, D. 1991. The physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. Australian Journal of Plant Physiology 18, 211-226.

Jonassen, I.B., Ingversen, J., & Brandt, A. 1981. Synthesis of SPII albumin, b-amylase and chymotrypsin inhibitor CI-1 on polysomes from the endoplasmic reticulum of barley endosperm. Carlsberg Research Comunications 46: 175-181.

Justes, E., Mary, B., Meynard J. Machet, J & Huché-Thélier, L. 1994. Determination of a Critical Nitrogen Dilution Curve for Winter Wheat Crops. Annals of Botany 74. 397-407.

Kanke, Y., Raun, W., John, J., Stone, M. & Taylor, R. 2012. Red edge as a potential index for detecting differences in plant nitrogen status in winter wheat, Journal of Plant Nutrition, 35:10, 1526-1541.

Khan, A. 2017. Nitrogen translocation efficiency in wheat depends on N sources and tillage practices. Proceedings of the 18th Australian Society of Agronomy Conference, 24 – 28 September 2017, Ballarat, Australia 2017.

Kichey, T., Hirel, B., Heumez, E., Dubois, F. & Le Gouis, J. 2007. In winter wheat (Triticum aestivum L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers, Field Crop Research, 102: 22-32.

Kim, M.S., Daughtry, C., Chappelle, E., McMurtrey, J. & Walthall, C. 1994. The use of high spectral resolution bands for estimating absorbed photosynthetically active radiation (APAR). Proceedings of the 6th International Symposium on Physical Measurement and Signatures in Remote Sensing: 299-306.

Kirkman, M.A., Shewry, P.R. & Miflin, B.J. 1982. The effect of nitrogen nutrition on the lysine content and protein composition of barley seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture 33: 115-127.

Kleman, J. & Fagerlund, E. 1987. Influence of different nitrogen and irrigation treatments on the spectral reflectance of Barley, Remote Sensing of Environment, 21, 1: 1-14.

Kohl, S., Hollmann, J., Blattner, F.R., Radchuk, V., Andersch, F., Steuernagel, B., Schmutzer, T., Scholz, U., Krupinska, K., Weber, H., Weschke, W. 2012. A putative role for amino acid permeases in sink-source communication of barley tissues uncovered by RNA-seq. – BMC Plant Biol. 12: 154.

Kumar, L., Schmidt, K., Dury, S. & Skidmore, A. 2006. Imaging spectrometry and vegetation science F.D.v.d. Meer, S.M.D. Jong (Eds.), Imaging Spectrometry: Basic Principles and Prospective applications, Springer, Netherlands, Dordrecht: 111-155.

Lawlor, D.W., Kontturi, M. & Young, A. T. 1989. Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose bisphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. J. Experimental. Botany. 40: 43-52.

Lee, Y., Yang, C., Chang, K., & Shen, Y. 2008. A simple spectral index using reflectance of 735 nm to assess nitrogen status of rice canopy. Agronomy Journal, 100: 205-212.

Lemaire, G., Plénet, D., Grindlay, D.J. 1997. Leaf N content as an indicator of crop N nutrition status G. Lemaire (Ed.), Diagnosis on the Nitrogen Status in Crops, Springer-Verlag, Heidelberg: 189-199.

Lewis. O.A.M., Watson, E.F. & Hewitt. E.J. 1982. Determination of nitrate reductase activity in barley eaves and roots. - Ann. Bot. 49: 31-.37.

Li X, X. Zhao, X. He, G. Zhao, B. Li, D., Liu, X., Zhang, Y.P. Tong, Z. Li, S. & Zhang, A. M. 2011. Haplotype analysis of the genes encoding glutamine synthetase plastic isoforms and their association with nitrogen-use- and yield-related traits in bread wheat. New Phytologist 189: 449-458.

Li, F. Miao, Y. Feng, G. Yuan, F., Shanchao, Y., Yuqing, L., Bin, L. Xinping, C. & Xiaowei. 2014. Improving estimation of summer maize nitrogen status with red edge-based spectral vegetation indices," Field Crops Research. 157: 111–123.

Loewy, T. 2004. Fraccionamiento del nitrógeno y fertilización foliar en trigo. En "Taller 1: Tecnología de fertilización nitrogenada: formas de aplicación y fuentes". XIX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Paraná; 22 al 25 de junio.

Loozen, Y.D., Karssenberg, S., Jong, S., Wang, J., van Dijk, M., Wassen, M. & Rebel, K. 2019. Exploring the use of vegetation indices to sense canopy nitrogen to phosphorous ratio in grasses, International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation, Volume 75, pp 1-14.

Lukina, E.V., Stone, M.L. & Raua, W.R. 1999. Estimating vegetation coverage in wheat using digital images, Journal of Plant Nutrition. 22 (2): 341-350.

Ma, B.L., Subedi K.D. & Dwyer, L.M. 2006. Timing and Method of 15Nitrogen-Labeled Fertilizer Application on Grain Protein and Nitrogen Use Efficiency of Spring Wheat, Journal of Plant Nutrition, 29:3, 469-483.

Magliano, P., Prystupa, P. & Gutiérrez-Boem, F.H. 2014. Protein content of grains of different size fractions in malting barley. Journal of Institute of Brewing 120: 347-352.

MAGyP (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca). 2019. Sistema integrado de información agropecuaria, Series y Estadísticas, Estimaciones Agrícolas. Visitado el 21 de mayo de 2019.

Malhi, S.S., Johnston, A.M., Schoenau, J.J., Wang, Z.H. & Vera, C. L. 2006. Seasonal biomass accumulation and nutrient uptake of wheat, barley and oat on a black chernozern soil in Saskatchewan. Can. J. Plant Science. 86:1005-1014.

Malhi, S.S. & Gill, K.S. 2007. Interactive effects of N and S fertilizers on canola yield and seed quality on S-deficient Gray Luvisol soils in northeastern Saskatchewan. Can. J. Plant Sci. 87: 211-222.

Marbán, L. & Ratto, S. 2005. Nitrógeno del suelo. In: Marbán L & S Ratto (edits). Tecnologías en análisis de suelo. AACS: 117-122.

Martínez, D.E., Costa, M.L. & Guiamet, J.J. 2008. Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. Plant Biology 10: 15-22.

Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F. & Gaufichon, L. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. Ann. Bot. 105:1141-57.

Matthies, W., Serre, M. & Cattáneo, M. 2002. Fertilización nitrogenada en una variedad de cebada cervecera de alto potencial de rendimiento en la Argentina. Anales de la XXII Reunião Anual de Pesquisa de Cevada. Passo Fundo, Brasil.

Michiels, C. & Degenhart, S. 2004. Ensayo de fertilización de cebada cervecera, var. Scarlett. Informaciones agronómicas 22: 18-20.

Miralles, D.J., Katz, S. D. Colloca, A. & Slafer, G.A. 1998. Floret development in near isogenic wheat lines differing in plant height. Field Crops Research. 59: 21-30.

Mistele, B. & Schmidhalter, U. 2008. Estimating the nitrogen nutrition index using spectral canopy reflectance measurements. European Journal of Agronomy 29:184-190.

Moges, S.W., Raun, R., Mullen, R.W., Freeman, K.W., Johnson, G.V. & Solie, J.B. 2005. Evaluation of Green, Red, and Near Infrared Bands for Predicting Winter Wheat Biomass, Nitrogen Uptake, and Final Grain Yield, Journal of Plant Nutrition, 27:8, 1431-1441.

Moller, I., Kichey, T., Ingvordsen, C.H, & Schjoerring, J.K. 2009. Foliar nitrogen application in wheat: the effects on grain N content, recovery of fertilizer and the response of cytosolic glutamine synthetase. UC Davis: Department of Plant Sciences, UC Davis.

Monaghan, J.M., Snape, J.W., Chojecki, A.J.S. & Kettlewell, P.S. 2001. The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high grain protein concentration and yield. Euphytica 122, 309-317.

Nesselhut, T. & Harnischfeger, G. 1981. Characterization of glutamine synthetase from Beta vulgaris. Physiologia Plantarum 51: 329-334.

Nikiforova V.J., Gakie`re, B., Kempa, S., Adamik, M., Willmitzer, L., Hesse, H. & Hoefgen, R. 2004. Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulphur metabolism. Journal of Experimental Botany (Sulphur Metabolism in Plants Special Issue) 55: 1861-1870.

Papakosta, D.K., & Gagianas, A.A. 1991. Nitrogen and dry matter accumulation, remobilization, and losses for Mediterranean wheat during grain filling. Agronomy. Journal. 83: 864-870.

Parrott, D.L., Martin, J.M. & Fischer, A.M. 2010. Analysis of barley (Hordeum vulgare) leaf senescence and protease gene expression: a family C1A cysteine protease is specifically induced under conditions characterized by high carbohydrate, but low to moderate nitrogen levels. New Phytologist 187: 313-331.

Pedersen, C.A., Knudsen, L. & Schnug, E. 1998. Sulphur fertilization. - In: SCHNUG. E. (Ed.), Sulphur in agroecosystems, - Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 115-134.

Pettersson, C.G., Söderström, M. & Eckersten, H. 2006. Canopy reflectance, thermal estrés, and apparent soil electrical conductivity as predictors of within-field variability in grain yield and grain protein of malting barley. Precision Agric.7: 343-359.

Pettersson C.G. & Eckersten, H. 2007. Prediction of grain protein in spring malting barley grown in northern Europe. European Journal of Agronomy, 27: 205-214.

Powlson, D.S., Poulton, P.R & Moller, N.E. 1989. Uptake of foliar-applied urea by winter wheat (Triticum aestivum): The influence of application time and use of a new 15N technique. Journal of the Science of Food and Agriculture 48: 429-440.

Prystupa, P., Savin, R. & Slafer, G.A. 2004. Grain number and its relationship with dry matter, N and P in the spikes at heading in response to NxP fertilization in barley. Field Crops Research. 90: 245-254.

Prystupa, P., Bergh, R., Ferraris, G., Loewy, T., Ventimiglia, L., Gutierrez Boem, F. H. & Couretot, L. 2006. Fertilización nitrogenada y azufrada de cebada cervecera cv Scarlett. Informaciones Agronómicas del Cono Sur. IPNI Cono Sur. Buenos Aires. 38: 5-8.

Prystupa, P., Ferraris, G., Bergh, R., Loewy, T., Ventimiglia, L., Couretot L. & Gutierrez Boem, F.H. 2008. Fertilización de cebada cervecera cv. Scarlett: IV. Estimación de la respuesta del contenido proteico a la fertilización nitrogenada. XXI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, San Luis, Mayo.

Prystupa, P., Ferraris G., Loewy, T., Gutierrez Boem, F.H., Ventimiglia, L., Couretot, L., & R. Bergh. 2012. Fertilización nitrogenada de cebada cervecera cv. Scarlett en la provincia

de Buenos Aires. XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, 16-20 abril, Mar del Plata.

Prystupa, P., Ferraris, G., Ventimiglia, L., Loewy, T., Couretot, L., Bergh, R., Gomez, F. & Gutierrez Boem, F.H. 2018, Environmental control of malting barley response to nitrogen in the Pampas, Argentina International Journal of Plant Production, 12: 127-137.

Przulj, N. & Momcilovic, V. 2003. Dry matter and nitrogen accumulation and use in spring barley. Plant Soil and Environment, Praha. 49: 36-47.

Raun, W.R., Solie, J.B., Johnson, G.V., Stone, M.L., Mullen, R.W. & Freeman, K.W. 2002. Improving nitrogen use efficiency in cereal grain production with optical sensing and variable rate application. Agronomy Journal, 94: 815-820.

Rawluk, C.D., Racz, G.J. & Grant, C. A. 2000. Uptake of foliar or soil application of 15N-labelled urea solution at anthesis and its affect on wheat grain yield and protein. Can. J. Plant Sci. 80: 331-334.

Readman, R.J., Kettlewell, P.S. & Beckwith, C.P. 2002. Effects of spray application of urea fertilizer at stem extension on winter wheat yield. Journal of Agricultural Science, Cambridge.139 (1): 1-10.

Reussi-Calvo, N., Sainz-Rozas, H., Echeverría, H. & Berardo, A. 2013. Contribution of anaerobically incubated nitrogen to the diagnosis of nitrogen status in spring wheat. Agronomy Journal. 105:1-8.

Rimski-Korsakov, H., Rubio, G. & Lavado, R.S. 2004. Potential losses of nitrate by leaching in soils of the Pampas Argentina. Agricultural Water Management 65: 83-94.

Roberts I.N., Caputo C., Criado M.V. & Funk, C. 2012. Senescence-associated proteases in plants. Physiologia Plantarum 145: 130-139.

Rondeaux, G., Steven, M., & Baret, F. 1996. Optimization of soil-adjusted vegetation indices. Remote Sens. Environment. 55: 95-107.

Rouse, J., Haas, R.H., Schell, J.A., Deering, D.W. 1973.Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. In Proceedings of the Third Earth Resources Technology Satellite-1 Symposium, Washington, DC, USA. 10-14.

SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación Argentina). Dirección de Producción Agrícola. 2004. Sistema de Apoyo Metodológico a los Laboratorios de Análisis de Suelos (SAMLA).

Savin, R. & Slafer, G.A. 1991. Shading effects on the yield of an Argentinian wheat cultivar. Journal of Agricultural Science. 116: 1-7.

Savin, R. & Nicolas, M.E. 1996. Effects of Short Periods of Drought and High Temperature on Grain Growth and Starch Accumulation of Two Malting Barley Cultivars. Functional Plant Biology. 23: 201-210.

Savin, R. & Aguinaga, A. 2011. Los requerimientos de la industria: calidad comercial e industrial y sus determinantes. En: Cebada cervecera. D.J. Miralles, R.L. Benech Arnold y L.G. Abeledo (Eds.). Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires: 207-238.

Sawicki, C.R. & Scaringelli, F.P. 1971. Colorimetric determinations of nitrate alter hydrazine reduction to nitrite. Microchem. J. 16: 657.

Serrano, L., Filella, I. & Penuelas, J. 2000. Remote sensing of biomass and yield of winter wheat under different nitrogen supplies. Crop Science, 40: 723-731.

Sexton, P.J., Bohle, M.G., Simmons, R.B., Karow, R.S., Marx, E., Christensen, N.W., Shibley, T. 2006. Effect of nitrogen topdressing at anthesis and the association of flag-leaf nitrogen with grain protein concentration in irrigated spring wheat. Journal of Plant Nutrition. 29: 1035-1046.

Sims, D.A. & Gamon, J.A. 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote Sensing of Environment. 81:337-354.

Slack, P.T., Baxter, E.D. & Wainwright, T. 1979. Inhibition by hordein of starch degradation. J. Inst. Brew. 85: 112-114.

Slafer, G.A. & Miralles, D.J. 1992. Green area duration during the grain filling period of wheat as influenced by sowing date, temperature and sink strength. Journal of Agronomy and Crop Science, 168: 191-200.

Soderstrom, M., Borjesson, T., Pettersson, C.G., Nissen, K. & Hagner, O. 2010. Prediction of protein content in malting barley using proximal and remote sensing. Precision Agriculture 11: 587-599.

Spaner, D., Todd A., Navabi, A., McKenzie, D. & Goonewardene, L. 2005. Can leaf chlorophyll measures at differing growth stages be used as an indicator of winter wheat and spring barley nitrogen requirements eastern Canada J Agron. Crop Sci. 191: 393-399.

Stone, M.L., Solie, J.B., Raun, W.R., Whitney, R.W., Taylor, S.L. & Ringer, J.D. 1996. Use of spectral radiance for correcting in-season fertilizer nitrogen deficiencies in winter wheat. Transactions of the ASAE. 39 (1): 623-631.

Strong, W.M. 1982. Effect of late application of nitrogen on the yield and protein content of wheat. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry, 22:54-61.

Tabuchi, M., Sugiyama, K., Ishiyama, K., Inoue, E., Sato T., Takahashi, H., Yamaya, T. 2005. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1; 1, a cytosolic glutamine synthetase1; 1. Plant Journal 42: 641-651.

Tegeder, M. & Rentsch, D. 2010. Uptake and Partitioning of Amino Acids and Peptide. – Mol. Plant. 3: 997-1011.

Tegeder, M. 2012. Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. – Curr. Opin. Plant Biol. 15: 315-321.

Thenkabail, P.S., Smith, R. & de Pauw, E. 2000. Hyperspectral vegetation indices and their relationships with agricultural crop characteristics. Remote Sensing. Environment. 71: 158-182.

Tosi, J. C. 2013. Alternativas de cultivos de invierno. Area economía, INTA EEA Balcarce, 10p.

Tully, E.R. & Hanson, A. 1979. Amino Acids Translocated from Turgid and Water-estrésed Barley Leaves I. Phloem Exudation Studies. Plant physiology. 64. 460-6. 10.1104. 64.3.460.

Veliz, C.G., Criado, M.V. Roberts, I.N., Echeverria, M., Prystupa, P., Prieto, P., Gutierrez Boem, F.H. & Caputo, C. 2014. Phloem sugars and amino acids as potential regulators of hordein expression in field grown malting barley (Hordeum vulgare L.), Journal of Cereal Science, 60: 433-439.

Veliz, C. 2017. “Efecto de la disponibilidad de azufre sobre los procesos de removilización de asimilados y senescencia foliar en plantas de cebada (Hordeum vulgare L.) y su impacto sobre la calidad de los granos” Tesis doctoral Universidad de Buenos Aires.

Vitousek, P.M., Aber J.D., Howarth R.W., Likens G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W. H. & Tilman, D. G. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. Ecological Applications 7: 737-750.

Walkley, A. & Black, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science. 37: 29-38.

Wang, L., Tian, Y., Yao, X., Zhu, Y. & Cao, W. 2014. Predicting grain yield and protein content in wheat by fusing multi-sensor and multi-temporal remote-sensing images Field Crops Research. 164: 178-188.

Wardlaw, I. F., Dawson, I.A., Munibi, P. & Fewster, R. 1989. The tolerance of wheat to high temperatures during reproductive growth. I. Survey procedures and general response patterns. Australian Journal of Agricultural Research 40: 1-13.

Wingler, A., Purdy, S., MacLean, J. & Pourtau, N. 2006. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. Journal of experimental botany. 57: 391-9.

Woolfolk, C.W., Raun, W.R. Johnson, G.V. Thompson, W.E. Mullen, R.W. Wynn K.J. & Freeman, K.W. 2002. Influence of late-season foliar nitrogen applications on yield and grain nitrogen in wheat. Agronomy Journal 94: 429-434.

Wright, D.L., Rasmussen, P.V.R., Ramsey, R.D., Baker, D.J., Jason, W. & Ellsworth J.W. 2004. Canopy Reflectance Estimation of Wheat Nitrogen Content for Grain Protein Management, GIScience & Remote Sensing, 41(4): 287-300.

Wuest, B.S. & Cassman, K. 1992. Fertilizer-Nitrogen Use Efficiency of Irrigated Wheat: I. Uptake Efficiency of Preplant versus Late-Season Application. Agronomy Journal - AGRON J. 84: 10-21.

Xu, X., Zhao, C., Wang, J., Zhang, J. & Song, X. 2014. Using optimal combination method and in situ hyperspectral measurements to estimate leaf nitrogen concentration in barley Precision Agric 15: 227.

Xue, L. H., Zao, W. X. & Yang, L. Z. 2007. Predicting grain yield and protein content in winter wheat at different N supply levels using canopy reflectance spectra. Pedosphere 17: 646-53.

Yemm, E.W., Cocking, E.C. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. – Analyst. 80: 209-214.

Zarco-Tejada, P.J., Ustin, S.L. & Whiting M.L. 2005. Temporal and spatial relationships between within-field yield variability in cotton and high-spatial hyperspectral remote sensing imagery, Agronomy Journal, 97: 641-653.

Zhang, Z., Xiong, S., Wei, Y., Meng, X.; Wang, X. & Ma, X. 2017. The role of glutamine synthetase isozymes in enhancing nitrogen use efficiency of n-efficient winter wheat. Sci. Rep. 7, 1000.

Zhao, F.J., Fortune, S., Barbosa, V.L., McGrath, S.P., Stobart, R., Bilsborrow, P.E., Booth, E.J., Brown, A. & Robson, P. 2006. Effects of sulphur on yield and malting quality of barley. Journal of Cereal Science 43: 369-377.

Zhao, B. 2014. Determining of a critical dilution curve for plant nitrogen concentration in winter barley. Field Crops Research, 96 224-234.