

**Determinación de ventanas de sensibilidad a la temperatura durante el llenado de los granos, para la definición de la calidad maltera en cebada cervecera**

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

**Enrique Ariel Otero**

Ingeniero Agrónomo - Universidad de Buenos Aires - 2015

Lugar de trabajo: Cátedra de Cultivos Industriales e Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la Agricultura - Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires



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



## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

**Roberto Luis Benech-Arnold**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Doctor of Philosophy (University of Southampton, United Kingdom)

Co-director

**Daniel Julio Miralles**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

## JURADO DE TESIS

JURADO

**Carla Caputo Suárez**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Doctora en Biología (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

JURADO

**Flavio Gutiérrez Boem**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Magister Scientiae en Ciencias del Suelo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Doctor of Philosophy (University of Kentucky, Estados Unidos)

JURADO

**Ernesto Igartua Arregui**

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad del País Vasco)  
Doctor of Philosophy (Universidad del País Vasco)

Fecha de defensa de la tesis: 25 de noviembre de 2022

## 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 identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.*

*Enrique Ariel Otero*





## DEDICATORIA

*A los que aceptan el hecho de que el acto más noble que existe es el de la mente en el proceso de comprender que dos más dos son cuatro*



## AGRADECIMIENTOS

Considero que el orgullo es la consecuencia de poner en valor logros propios. En lo que respecta a esta tesis doctoral, no hay para mí logro mayor que el haberme sabido rodear de gente inmensamente capaz. La contribución de todos ellos hizo posible la realización de este doctorado, y por ello les estoy infinitamente agradecido.

Gracias a mi comité consejero, conformado por Roberto Benech-Arnold y Daniel Miralles. Roberto, gracias por tu confianza, por tu paciencia, por enseñarme a pensar y por tu implacable optimismo. Daniel, gracias por tus aportes únicos, por tu constante predisposición y por tu buena onda.

A la UBA, que financió esta tesis, al CONICET, que me otorgó una beca doctoral, y a todos los que colaboran con dichas instituciones.

A los integrantes de la cátedra de cultivos industriales. A Coni, Rocío, Honduras, Nati, Luciana, Chalo, Cris R., Kelly, Marianne, Magui, Toni y Fer. Su compañía fue lo que más disfruté en estos años. A Edy, Mónica, Nora, Elba, Dani, Adri K., Adri L. y Diego, por permitirme aprender y enseñar a su lado. A Mirta, por la predisposición y la ayuda en todo momento.

A los integrantes de las cátedras de Cerealicultura y Producción Vegetal, en especial a Román Serrago y Juan Fuentes, por su ayuda con los ensayos en el campo experimental.

A Maxi Ortiz, por su gran ayuda en el campo experimental y en el laboratorio, y por continuar con esta línea de investigación.

A Andrés Peton, por su ayuda en el laboratorio y por compartir su conocimiento.

A Antonio Aguinaga por su guía, sus consejos y sus acertados comentarios, que dispararon muchas ideas y nos orientaron en el mundo de la calidad en cebada cervecera.

A Cervecería y Maltería Quilmes S.A.I.C.A. y G., y al grupo de Mejoramiento y Calidad Vegetal del INTA EEA Bordenave (en especial a Verónica Conti), por llevar a cabo los análisis de calidad maltera.

A los integrantes del IFEVA, en especial a Vero Rodríguez, por su predisposición y buena onda en todo momento.

A Luis Pedace, por la ayuda en el campito. En lo que a mí respecta: ¡Descansá, Sebastián!

A Cufa, Lukitas, Billi, Rama, El Tirri, Bonzo, El Lince, El Presi, Otto, Ganzo, Lucho, Fabri, Dela, Lio, Robertito, El Ruso y Sati, por bancarme en todas y hacer que todo sea más fácil.

A Beatriz, mi mamá, por ser una demostración constante de que el trabajo es un requisito indispensable para cualquier meta que uno se proponga alcanzar, y por criarme con el amor más inmenso que existe.

A Enrique, mi papá, por enseñarme a aprender de cada cosa de la vida, por recordarme lo afortunado que soy y por ayudarme a ser consciente de lo que dice la dedicatoria.

A Laura, mi hermana, por su amor incondicional y por ser un ejemplo de valentía y aguante.

A Daniela, mi esposa, por confiar en mí cuando ni siquiera yo mismo me tenía fe. Tu compañía no es para mí un logro, sino la prueba de que soy, muy probablemente, la persona más afortunada del mundo.

## PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

**Otero, EA;** Miralles, DJ; Benech-Arnold, RL. 2021. Development of a precise thermal time model for grain filling in barley: A critical assessment of base temperature estimation methods from field-collected data. *Field Crops Research*. 260.

**Otero, EA;** Miralles, DJ; Peton, A; Conti, VA; Giménez, FJ; Benech-Arnold, RL. 2021. On-field assessment of the environmental modulation of malting quality in barley crops. *Field Crops Research*. 271.



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	xi
ÍNDICE DE CUADROS.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xix
ABREVIATURAS.....	xxiii
RESUMEN.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvii
Capítulo 1: Introducción general.....	1
1.1 Marco Teórico.....	3
1.1.1 El cultivo de cebada.....	3
1.1.2 Procesamiento industrial.....	3
1.1.3 Calidad industrial.....	5
1.1.4 Regulación ambiental de la calidad.....	9
1.2 Objetivos.....	12
1.2.1 Objetivo general.....	12
1.2.2 Objetivos específicos.....	12
1.3 Hipótesis.....	13
Capítulo 2: Desarrollo de un modelo de tiempo térmico preciso para el llenado de los granos.....	15
Resumen.....	17
2.1 Introducción.....	19
2.2 Materiales y métodos.....	24
2.2.1 Materiales y métodos comunes a todas los capítulos.....	24
2.2.1.1 Generalidades.....	24
2.2.1.2 Material vegetal.....	24
2.2.1.3 Diseño experimental y manejo del cultivo.....	26
2.2.1.4 Ambiente térmico y mediciones de fenología.....	26
2.2.2 Materiales y métodos específicos para el Capítulo 2.....	27
2.2.2.1 Tratamientos.....	27
2.2.2.2 Muestreos y mediciones.....	28
2.2.2.3 Cálculo de grados-día.....	28
2.2.2.4 Estimación de la temperatura base para el desarrollo.....	29
2.2.2.5 Estimación de la temperatura base tratando el llenado de granos como un proceso de crecimiento.....	31
2.2.2.6 Evaluación y validación de los modelos.....	31

2.2.2.7	Análisis estadístico .....	33
2.3	Resultados .....	33
2.3.1	Efecto de la fecha de siembra, el cultivar y la disponibilidad de nitrógeno sobre la tasa de crecimiento de los granos y la duración del llenado de granos .....	33
2.3.2	Estimaciones de temperatura base .....	36
2.3.3	Desempeño de los modelos y validación .....	41
2.4	Discusión.....	45
2.5	Conclusión .....	52
Capítulo 3: Determinación de ventanas de sensibilidad a la temperatura durante el llenado de los granos, para la definición de la susceptibilidad al brotado precosecha en cebada cervecera .....		
	Resumen.....	53
3.1	Introducción .....	57
3.2	Materiales y métodos .....	60
3.2.1	Generalidades y tratamientos .....	60
3.2.2	Muestreos y mediciones.....	60
3.2.2.1	Fenología y modelo de tiempo térmico .....	60
3.2.2.2	Dinámica de salida de la dormición y estimación de la susceptibilidad al brotado precosecha.....	61
3.2.2.3	Determinación de ventanas de sensibilidad a la temperatura y efecto del nitrógeno .....	63
3.3	Resultados .....	64
3.3.1	Análisis exploratorio de la dinámica de salida de la dormición .....	64
3.3.2	Ubicación de ventanas de sensibilidad a la temperatura.....	66
3.3.3	Relación entre la temperatura media en la ventana de sensibilidad, la disponibilidad de nitrógeno y la susceptibilidad al brotado precosecha.....	70
3.4	Discusión.....	71
3.5	Conclusión .....	78
Capítulo 4: Determinación de ventanas de sensibilidad a la temperatura durante el llenado de los granos, para la definición del extracto de malta en cebada cervecera .....		
	Resumen.....	81
4.1	Introducción .....	83
4.2	Materiales y métodos .....	87
4.2.1	Generalidades y tratamientos .....	87
4.2.2	Muestreos y mediciones.....	88
4.2.2.1	Modelo de tiempo térmico.....	88
4.2.2.2	Cosecha y almacenamiento de muestras.....	88



4.2.2.3	Contenido de proteína y tamaño de grano .....	89
4.2.2.4	Cuantificación de hordeínas.....	89
4.2.2.5	Propiedades de pastificación.....	90
4.2.2.6	Micromalteo y análisis de malta .....	91
4.2.3	Análisis estadístico.....	91
4.3	Resultados .....	94
4.3.1	Análisis exploratorio de los atributos del grano que determinan el extracto de malta.....	94
4.3.2	Atributos del grano que afectan al extracto de malta.....	100
4.3.3	Ventanas de sensibilidad para la modulación ambiental de los atributos del grano que afectan el extracto de malta .....	103
4.3.4	Análisis de sendero .....	109
4.4	Discusión.....	110
4.5	Conclusión .....	120
Capítulo 5:	Discusión general .....	121
5.1	Introducción .....	123
5.2	Implicancias de los aportes derivados de esta tesis y consideraciones para investigaciones futuras: la importancia de identificar ventanas de sensibilidad a la temperatura.....	124
5.3	Consideraciones finales.....	133
REFERENCIAS	.....	135
ANEXO	.....	153



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Fechas de siembra y tratamientos de nitrógeno utilizados en cada capítulo de la presente tesis, para cada cultivar. Se indica con una “X” las fechas de siembra y tratamientos de nitrógeno utilizados en cada caso. FS: Fecha de siembra; C: Cultivar; N: Tratamiento de nitrógeno; N1: 85 kg N ha <sup>-1</sup> ; N2: 170 kg N ha <sup>-1</sup> ; N3: 200 kg N ha <sup>-1</sup> .....	25
Cuadro 2.2. Temperatura media, media mínima y media máxima para la fase de llenado de grano de cada siembra, promediando los cultivares y los tratamientos de nitrógeno. FS: Fecha de siembra; Tm: Temperatura media; Tmin: Temperatura media mínima; Tmax: Temperatura media diaria máxima.....	27
Cuadro 2.3. Fecha de siembra, temperatura media, media mínima y media máxima para la fase de llenado de granos promediando los cultivares y los tratamientos de nitrógeno, correspondiente a los datos utilizados para validar los modelos cuantitativos. FS: Fecha de siembra; Tm: Temperatura media; Tmin: Temperatura media mínima; Tmax: Temperatura media diaria máxima.....	32
Cuadro 2.4. Tasa de crecimiento del grano y la duración de la fase de llenado de granos para cada fecha siembra, promediando los cultivares y tratamientos de nitrógeno. Letras diferentes indican diferencias significativas a través de la prueba de Tukey (p<0.05). FS: Fecha de siembra; TCG: Tasa de crecimiento del grano; DG: duración de llenado de granos.....	34
Cuadro 2.5. Tiempo desde la siembra hasta la polinización (S-P), tasa de crecimiento del grano (TCG) y duración de llenado de granos (DG) para cada fecha de siembra (FS) y cultivar (C) bajo dos tratamientos de disponibilidad de nitrógeno (N). La significancia estadística de cada factor se indica al final de cada columna. Las letras comparan combinaciones de genotipos por nitrógeno dentro de cada fecha de siembra usando la prueba de Tukey.....	35
Cuadro 2.6. Estimaciones de temperatura base obtenidas a través de diferentes métodos para los cuatro cultivares de cebada, individualmente y agrupados. Entre paréntesis se muestra el requerimiento de tiempo térmico para el llenado de granos. P0: Pendiente cero; MCV: Menor coeficiente de variación; MCV <sub>op</sub> : Menor coeficiente de variación considerando una temperatura óptima; X-int <sub>d</sub> : Intercepción del eje x de la tasa de desarrollo.....	36
Cuadro 2.7. Raíz del error cuadrático medio (RECM) e índice de concordancia de Willmott (d <sub>r</sub> ) para modelos de tiempo térmico de desarrollo ajustados a través de diferentes métodos, para todos los cultivares, individualmente y agrupados. P0: Pendiente cero, MCV: Menor coeficiente de variación, MCV <sub>op</sub> : Menor coeficiente de variación considerando una temperatura óptima, X-int <sub>d</sub> : Intercepción del eje x de la tasa de desarrollo.....	42
Cuadro 3.1. Tiempo térmico requerido para completar el llenado de granos, junto con la temperatura base y óptima para su cálculo, y el método utilizado para su estimación, para cada uno de los cultivares empleados en el presente trabajo. DG: duración de llenado de granos; Tb: temperatura base; To: Temperatura óptima; P0: Pendiente cero; MCV <sub>op</sub> : Menor coeficiente de variación considerando una temperatura óptima (ver capítulo 2). .....	61

- Cuadro 3.2. Intervalo de tiempo térmico que presentó la mayor correlación entre el índice de germinación cercano a madurez comercial y la temperatura media para cada disponibilidad de nitrógeno por separado o agrupadas, junto con la ubicación relativa dentro del llenado de granos y el coeficiente de correlación correspondiente a dicho período, además del calculado considerando la temperatura media del período completo de llenado de granos..... 68
- Cuadro 4.1. Extracto de malta para cultivares (C) de cebada sembrados en diferentes fechas (FS) y cultivadas bajo disponibilidades de nitrógeno (N) contrastantes. El resultado del análisis de varianza realizado para cada fecha de siembra por separado se muestra en la parte inferior de la tabla. Las letras, obtenidas mediante la prueba de Tukey, indican la comparación de medias de la combinación de cultivar por disponibilidad de nitrógeno para cada fecha de siembra. .... 97
- Cuadro 4.2. Efecto del cultivar (C) y la disponibilidad de nitrógeno (N) sobre el contenido de proteína (P), el calibre (CA) y la cantidad de cada fracción de hordeína, expresada en término absolutos (UA g<sup>-1</sup>) y relativos (%). Las letras, obtenidas mediante la prueba de Tukey, indican la comparación de medias de la combinación de cultivar por disponibilidad de nitrógeno. Se omitió el nivel de disponibilidad de nitrógeno N3 por no incluirse junto con los otros dos niveles en la siembra correspondiente. HB a HG: contenido de hordeína B, C, D y  $\gamma$  medido en unidades arbitrarias, respectivamente; PB a PG: contenido de hordeína B, C, D y  $\gamma$  medido en unidades porcentuales, respectivamente; BC: relación de hordeínas B/C; DB: relación de hordeínas D/B..... 98
- Cuadro 4.3. Efecto del cultivar (C) y la disponibilidad de nitrógeno (N) sobre los parámetros obtenidos del análisis de RVA. Las letras, obtenidas mediante la prueba de Tukey, indican la comparación de medias de la combinación de cultivar por disponibilidad de nitrógeno. Se omitió el nivel de disponibilidad de nitrógeno N3 por no incluirse junto con los otros dos niveles en la siembra correspondiente. VM: Viscosidad máxima; VC: Viscosidad de caída; VF: Viscosidad final; ES: Estabilidad; RE: Retrogradación; TVM: Tiempo hasta alcanzar la viscosidad máxima; TP: Temperatura de pastificación. .... 99
- Cuadro 4.4. Matriz de correlación entre el contenido de proteína, el contenido total de hordeínas, el contenido de fracciones de hordeínas expresado en términos absolutos (AU g<sup>-1</sup>) y relativos (%), y proporciones entre hordeínas. P: contenido de proteína; HT: contenido total de hordeína; HB a HG: contenido de hordeína B, C, D y  $\gamma$  medido en unidades arbitrarias, respectivamente; PB a PG: contenido de hordeína B, C, D y  $\gamma$  medido en unidades porcentuales, respectivamente; BC: relación de hordeínas B/C; DB: relación de hordeínas D/B..... 99
- Cuadro 4.5. Matriz de correlación entre los parámetros obtenidos del análisis de RVA. VM: Viscosidad máxima; VC: Viscosidad de caída; VF: Viscosidad final; ES: Estabilidad; RE: Retrogradación; TVM: Tiempo hasta alcanzar la viscosidad máxima; TP: Temperatura de pastificación. .... 100

Cuadro 4.6. Intervalo de tiempo térmico desde polinización que presentó la mayor correlación entre cada atributo del grano y la temperatura media, junto con la ubicación relativa y el coeficiente de correlación para dicho intervalo, y considerando la temperatura media del período completo de llenado de granos. CA: Calibre; HD: Hordeína D; HG: Hordeína  $\gamma$ ; TP: Temperatura de pastificación..... 107

Cuadro 5.1. Ecuaciones correspondientes a los modelos de tiempo térmico para el llenado de granos, para los cuatro cultivares evaluados. Los parámetros fueron estimados en el capítulo 2 de la presente tesis. Se incluye también un modelo de aplicación general en cebada cervecera, formulado a partir de los cuatro cultivares evaluados. GD: Grados-día diarios;  $t_m$ : Temperatura media diaria; GDA: Grados-día acumulados; DG: Duración de llenado de granos; c: duración del llenado en días..... 126

Cuadro 5.2. Ecuaciones para el cálculo de la temperatura de pastificación, el calibre y, a partir de ellos, el extracto, para los cuatro cultivares evaluados. Se incluye también un modelo de aplicación general en cebada cervecera. Los parámetros de los modelos, que están estandarizados, se estimaron en el capítulo 4. TP: Temperatura de pastificación; CA: Calibre; E: Extracto; P: Contenido de proteína; HG: Cantidad de hordeína Gamma. HD: Cantidad de hordeína D.  $T_m$ : Temperatura media para el intervalo de tiempo térmico indicado (salvo en el modelo general, que se expresa en porcentaje de avance de llenado de granos desde polinización hacia madurez fisiológica). ..... 127

Cuadro 5.3. Ecuaciones para el cálculo del índice de germinación cercano a madurez comercial (indicador del nivel de susceptibilidad a sufrir brotado pre-cosecha) para los cuatro cultivares evaluados. Los parámetros se estimaron el capítulo 3. Nótese que ABI Balster es el único cultivar cuyo índice de germinación es independiente de la temperatura, ya que no se halló una ventana de sensibilidad para dicho atributo en ese cultivar.  $IG_{cmc}$ : Índice de germinación cercano a madurez fisiológica;  $T_m$ : Temperatura media para el intervalo de tiempo térmico indicado. N: Nivel de disponibilidad nitrogenada ( $N=0$  cuando la disponibilidad es de 85 kg N ha<sup>-1</sup>,  $N=1$  cuando la disponibilidad es de 170 kg N ha<sup>-1</sup>). ..... 127



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principales etapas del procesamiento industrial de la cebada cervecera. ....	5
Figura 2.1. Coeficiente de determinación del ajuste bilineal entre el peso seco relativo del grano y el tiempo térmico (A), pendiente de la relación entre la duración del llenado del grano en grados-día y la temperatura media (B), y coeficiente de variación de la duración del llenado del grano en grados-día (C) en función de la temperatura base empleada en el cálculo de los grados-día, para cada cultivar individualmente y todos ellos agrupados. Las flechas indican en el eje correspondiente la mejor temperatura base de acuerdo con cada método. ....	37
Figura 2.2. Coeficiente de variación de la duración del llenado de granos en tiempo térmico en función de la temperatura base (0 a 12 °C) y la temperatura óptima (20 a 30 °C) empleadas para el cálculo de los grados-día, para cada cultivar individualmente, y su promedio. ....	39
Figura 2.3. A: Regresión lineal entre la tasa de desarrollo y la temperatura media de la fase de llenado de granos. Las líneas de regresión punteadas y sólidas corresponden a los tratamientos de disponibilidad de nitrógeno baja (N1) y alta (N2), respectivamente. Las barras de color gris claro y gris oscuro muestran los intervalos de confianza (95%) de las estimaciones de temperatura base correspondientes a los tratamientos con baja y alta disponibilidad de nitrógeno, respectivamente. B: Regresión lineal entre la tasa de crecimiento y la temperatura media de la fase de llenado del grano. La barra gris muestra el intervalo de confianza (95%) de la estimación de la temperatura base. ....	40
Figura 2.4. Peso seco relativo del grano en función del tiempo (izquierda) y del tiempo térmico (derecha) desde la polinización para cada uno de los cuatro cultivares empleados en el presente estudio. La línea horizontal discontinua indica el peso relativo máximo. Las líneas continuas muestran ajustes bilineales para cada una de las fechas de siembra. La temperatura base se estimó mediante el método del pendiente cero para Andreia, Scrabble y Q. Carisma, y mediante el método de menor variabilidad considerando una temperatura óptima para ABI Balster. ....	44
Figura 2.5. Relación entre la duración de llenado de grano predicha y observada para el modelo de aplicación amplia de cebada (A) y los modelos específicos para los cultivares Andreia (B) y Scrabble (C). La línea continua muestra la relación 1:1 y las líneas discontinuas indican un desvío de 3 días. ....	45
Figura 2.6 Relación entre el peso de grano predicho y observado. La línea continua muestra la relación 1:1 y las líneas discontinuas indican un desvío de 10 mg grano <sup>-1</sup> ...	45
Figura 3.1. Índice de germinación en función del contenido de humedad de los granos según la fecha de siembra y la disponibilidad de nitrógeno, para los cuatro cultivares evaluados en el presente estudio. Cada punto es el promedio de tres repeticiones. La línea vertical intermitente indica la tolerancia de contenido de humedad de recibo luego de la cosecha (12.5%). ....	66
Figura 3.2. Coeficiente de correlación de Pearson para la asociación entre el índice de germinación cercano a madurez comercial y la temperatura media de todo el llenado de granos (izquierda) o de distintos períodos dentro del llenado de granos (derecha), para los cuatro cultivares utilizados en el presente estudio, y los dos tratamientos de disponibilidad	

de nitrógeno por separado y combinados. Un 0% de estado de avance corresponde a la polinización, mientras que un 100% de estado de avance corresponde a madurez fisiológica. La línea entrecortada verde y amarilla indica el coeficiente mínimo necesario para alcanzar la significancia estadística ( $p < 0.0001$ ) para los tratamientos de nitrógeno por separado. La línea entrecortada negra indica el coeficiente mínimo necesario para alcanzar la significancia estadística ( $p < 0.0001$ ) para los tratamientos de nitrógeno combinados. .... 69

Figura 3.3. Regresión múltiple para el índice de germinación cercano a madurez comercial en función de la temperatura media de la ventana de tiempo térmico durante el llenado de granos con mayor correlación, de la disponibilidad de nitrógeno, y del cultivar. Las líneas sólidas indican un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de la temperatura media durante el intervalo de tiempo térmico correspondiente. La función que describe la relación entre las variables para cada cultivar se presenta en el área del gráfico correspondiente. .... 71

Figura 4.1. Extracto de malta en función del contenido de proteína de los granos para los cuatro cultivares evaluados en el presente estudio. Se ajustó una función bilineal con un punto de quiebre diferente para cada cultivar. Cada punto es el promedio de tres subparcelas. Las barras de error muestran las desviaciones estándar. .... 95

Figura 4.2. Extracto de malta promedio para cada uno de los cultivares evaluados en el presente estudio. Las barras de error muestran el intervalo de confianza (95%). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey. .... 100

Figura 4.3. Pendientes estandarizadas del análisis de regresión múltiple que describe el extracto de malta en función de una serie de atributos del grano, por debajo (A) y por encima (B) del valor umbral de contenido de proteína. Las barras muestran el intervalo de confianza (95%) de cada estimación. La línea de puntos vertical indica el cero (*i.e.* no estadísticamente significativo). P: Contenido de proteína; TP: Temperatura de pastificación; CA: Calibre; HD: Hordeína D; HG: Hordeína  $\gamma$ . .... 102

Figura 4.4. Coeficiente de correlación de Pearson del análisis de correlación entre los atributos del grano y la temperatura media explorada por los cuatro cultivares durante el llenado de granos completo (izquierda) y breves intervalos de tiempo térmico ubicados a lo largo del llenado de granos (derecha). Con el objetivo de realizar comparaciones entre cultivares, se muestra el estado de desarrollo del grano en una escala relativa, donde 0% es polinización y 100% es madurez fisiológica. Las líneas horizontales discontinuas muestran el coeficiente mínimo para que la asociación sea significativa ( $p < 0.0001$ ). . 106

Figura 4.5. Temperatura de pastificación (izquierda) y calibre del grano (derecha) en función de la temperatura media explorada por los cuatro cultivares durante las ventanas de sensibilidad de cada atributo, respectivamente. Las líneas sólidas y la línea entrecortada indican la regresión para cada cultivar y para la respuesta promedio, respectivamente. El área sombreada muestra el intervalo de confianza (95%) para la respuesta promedio. .... 107

Figura 4.6. Extracto de malta en función del contenido de proteína y la temperatura de pastificación para el promedio de los cuatro cultivares evaluados en el presente estudio. Los valores del extracto de malta se obtuvieron fijando todas las variables que se muestran



- en la Figura 4.3 en sus valores medios y permitiendo que solo varíen el contenido de proteína y la temperatura de pastificación. .... 108
- Figura 4.7. Relación entre el extracto de malta y el calibre del grano para los cuatro cultivares evaluados en el presente estudio y para el valor promedio. Las líneas sólidas y la línea entrecortada indican la regresión para cada cultivar y para la respuesta promedio, respectivamente. El área sombreada muestra el intervalo de confianza (95%) para la respuesta promedio..... 109
- Figura 4.8. Esquema de análisis de sendero con los correspondientes coeficientes de sendero. Las flechas entrecortadas con guiones cortos y largos indican asociaciones por debajo y por encima del umbral proteico, respectivamente. Las flechas sólidas indican asociaciones con un único efecto independiente del rango de contenido de proteína. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  ..... 110
- Figura 5.1. Temperatura media en función de la fecha para la campaña 2012 y promedio histórico, en Coronel Suarez, Provincia de Buenos Aires. El esquema superior indica la ubicación aproximada del llenado de granos. Los recuadros indican la ubicación relativa de las ventanas de sensibilidad encontradas en la presente tesis. A: Antesis; MF: Madurez fisiológica. BPC: Brotado precosecha..... 129



## ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
°C	Grados centígrados
°Cd	Grados-día
µm	Micrómetros
µl	Microlitros
%	Porcentaje
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de plata
AIC	Criterio de Información de Akaike
cm	Centímetros
cP	Centipoise
d <sub>r</sub>	Índice de Concordancia de Willmott
DTT	Ditiotreitól
g	Gramos
G	Fuerza g
h	Horas
ha	Hectáreas
kg	Kilogramos
m	Metros
min	Minutos
mm	Milímetros
mg	Miligramos
m	Milimolar
N	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
p	Valor p (estadístico)
p/v	Relación peso-volumen
r	Coefficiente de correlación de Pearson (estadístico)
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación (estadístico)
RMSE	Raíz del Error Cuadrático Medio
rpm	Revoluciones por minuto
RVU	Unidades de Rapid-Visco Analyser
TA	Temperatura ambiente
ua	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
VIF	Factor de Inflación de Varianza



## RESUMEN

Determinación de ventanas de sensibilidad a la temperatura durante el llenado de los granos, para la definición de la calidad maltera en cebada cervecera

Los requerimientos de cebada cervecera por parte de la industria son altamente específicos en lo que a parámetros de calidad respecta. Algunas de las características del grano asociadas a la calidad están claramente identificadas en la literatura. Sin embargo, la variabilidad observada en la calidad maltera de lotes de grano aparentemente similares, pero provenientes de ambientes distintos, sugiere que existen otros atributos del grano asociados a la calidad, y, a su vez, que los mismos son de alguna forma modulados por el ambiente explorado por el cultivo, presumiblemente durante el periodo de formación de los granos. Las ventanas de sensibilidad, definidas como intervalos acotados de tiempo térmico durante los cuales la temperatura tiene un efecto específico sobre algún atributo de interés, representan una oportunidad de entender de qué manera la calidad maltera se construye bajo condiciones de campo. Cuatro cultivares comerciales de cebada cervecera fueron sembrados en distintas fechas a lo largo de cuatro campañas, y bajo disponibilidades de nitrógeno contrastantes. Un modelo de tiempo térmico que permite describir con precisión el desarrollo de los granos fue ajustado y validado específicamente para cada cultivar evaluado. Tres de los cuatro cultivares presentaron una ventana de sensibilidad para la definición de la susceptibilidad a brotado precosecha, una adversidad asociada a la pérdida de viabilidad de los granos. El contenido de proteína, el tamaño de grano, la temperatura de pastificación y la proporción de hordeínas D y  $\gamma$  (proteínas de reserva) mostraron un efecto significativo sobre el extracto de malta, principal indicador de la calidad maltera. A su vez, se encontraron ventanas de sensibilidad para la definición de la temperatura de pastificación y el tamaño de grano, para los cuatro cultivares. Los modelos cuantitativos presentados (*i.e.* el modelo de tiempo térmico para el llenado de

granos, el modelo para predecir la susceptibilidad a brotado precosecha, y el modelo que describe la determinación del extracto de malta) representan una oportunidad de mejora de la calidad maltera mediante prácticas de manejo del cultivo.

**Palabras clave:** Cebada cervecera, calidad maltera, temperatura, llenado de granos, hordeínas, temperatura de pastificación, calibre, contenido de proteína.

## ABSTRACT

Identification of sensitivity windows to temperature within grain filling, for the formation of malting quality in barley

Malting barley quality requirements by the industry are highly specific. A few grain attributes related to malting quality are clearly identified in the literature. However, the observed variation in malting quality between batches of grain that appear to be similar, but come from contrasting environments, indicates that there are other, unidentified, attributes related to malting quality, and that such attributes are being somehow modulated by the environment explored by the crop, presumably during the grain formation period. Sensitivity windows, defined as thermal time intervals during which temperature has a specific effect over a relevant attribute, represent an opportunity to understand how malting quality is formed on the field. Four commercial malting barley cultivars were sown on different dates across four growing seasons, and under contrasting nitrogen availabilities. A thermal time model that allows to describe with precision the development of the grains, was fitted and validated specifically for each cultivar. Three of the four cultivars showed a sensitivity window for the definition of preharvest sprouting susceptibility, an adversity related to the immediate loss of grain viability. Moreover, protein content, grain size, pasting temperature and proportion of D- and  $\gamma$ -hordeins (storage proteins) showed a significant effect on malt extract, the most important indicator of malting quality. Sensitivity windows for pasting temperature and grain size determination were found consistently for the four cultivars. The models reported in this thesis (*i.e.* the thermal time model for grain filling, the model for the prediction of preharvest sprouting susceptibility, and the model describing the formation of malt extract) offer an opportunity for the improvement of the malting quality through agronomic practices.

**Keywords:** Malting barley, malting quality, temperature, grain filling, hordeins, pasting temperature, grain size, protein content.



# Capítulo 1: **Introducción general**



## 1.1 Marco Teórico

### 1.1.1 El cultivo de cebada

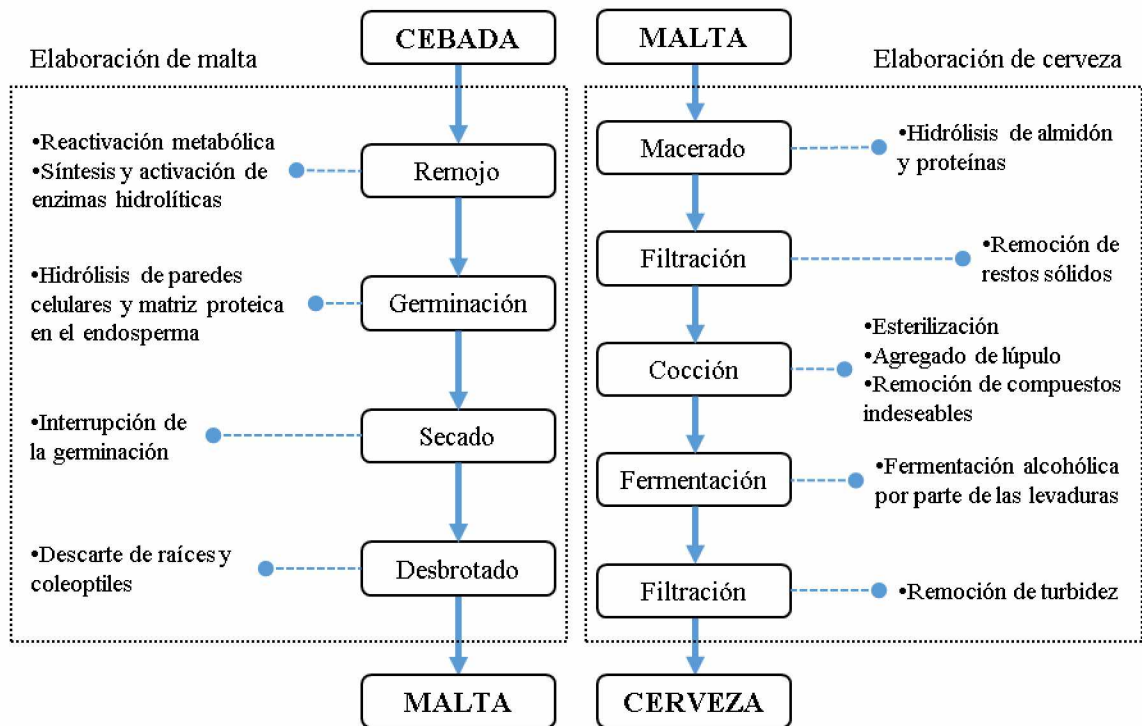
Dentro de los cultivos de grano, la cebada ocupa el quinto lugar en volumen producido en el mundo, con una producción anual promedio de aproximadamente 140 millones de toneladas considerando el período 1997-2017 (FAOSTAT, 2018). El principal destino de la producción está asociado a la alimentación animal (75%), siguiendo la elaboración de malta para la industria cervecera (20%) y, en menor grado, el consumo humano directo y otros usos industriales (5%) (Cattáneo, 2011). En Sudamérica, Argentina se posiciona como el principal productor de cebada y el exportador más grande de la región, teniendo como principal destinatario de la producción al resto de Latinoamérica (FAOSTAT, 2018; MAGyP, 2019). En Argentina, a diferencia de lo que ocurre en el resto del mundo, la producción de cebada tiene como principal destino la elaboración de malta para la industria cervecera (MAGyP, 2019). El aumento de la demanda mundial de este cereal, junto con la ampliación de la capacidad maltera del país, así como las ventajas agronómicas que ofrece la incorporación de este cultivo a las rotaciones agrícolas, determinaron que la cebada aparezca como una alternativa cada vez más atractiva para los productores argentinos (Álvarez Prado *et al.*, 2013; Cattáneo, 2011). Esto se evidencia en el aumento sostenido de la producción de cebada desde fines de la década de 1980 hasta la actualidad. Dicho aumento se vio particularmente intensificado en los últimos años, alcanzándose en la campaña 2012/2013 una producción récord de más de 5 millones de toneladas (MAGyP, 2019).

### 1.1.2 Procesamiento industrial

El procesamiento industrial de la cebada cervecera puede dividirse en dos etapas: la elaboración de malta y la producción de cerveza (**Figura 1.1**). Brevemente, la primera etapa consiste en desencadenar la germinación de los granos en condiciones sumamente

controladas de temperatura y humedad. Para ello, la elaboración de malta comienza con una etapa de remojo, en la que se busca elevar de manera uniforme el contenido hídrico de los granos hasta valores de humedad cercanos al 45% (Brookes *et al.*, 1976). En el grano maduro de cebada, el embrión y el endosperma están rodeados por la testa, el pericarpio y las glumelas. El embrión, a su vez, está conformado por el eje embrionario, a partir del cual se desarrolla la plántula luego de la germinación, y un único cotiledón, denominado escutelo. Por su parte, el endosperma consta de células muertas que contienen depósitos de gránulos de almidón asociados a una matriz proteica, encontrándose todo este conjunto rodeado por una capa de dos o tres células de espesor, denominada aleurona (Briggs, 1998). La imbibición de los granos durante el remojo reactiva el metabolismo del embrión, promoviendo la generación de giberelinas en el escutelo y su posterior difusión hacia la aleurona (Briggs, 1972; Radley, 1967). Ante la presencia de giberelinas se activa en estos tejidos la síntesis y liberación de enzimas hidrolíticas (Gibbons, 1981; Jones, 2005), que difunden hacia el endosperma y degradan las paredes celulares y la matriz proteica, dejando expuestos los gránulos de almidón (proceso al que se denomina “modificación del endosperma”). Una vez que se degradan estas estructuras, la germinación se detiene mediante el secado de los granos, evitando el consumo de reservas por parte de la plántula, y dando como resultado la malta. La producción de cerveza utiliza como sustrato dicha malta, que inicialmente se muele y se macera en agua a temperaturas controladas. Durante el macerado las enzimas presentes en la malta degradan el almidón y las proteínas en azúcares fermentables y aminoácidos solubles, respectivamente (Bamforth, 2009). La solución obtenida como producto de la maceración, denominada mosto cervecero, es filtrada y hervida junto con lúpulo, para luego agregársele levaduras. Dichas levaduras realizan una fermentación alcohólica a

partir de los azúcares simples y aminoácidos, dando como resultado la cerveza, que finalmente es filtrada y envasada.



**Figura 1.1.** Principales etapas del procesamiento industrial de la cebada cervecera.

### 1.1.3 Calidad industrial

La calidad industrial, o lo que es igual, la calidad maltera, es un atributo complejo que se aborda a través de distintos indicadores. El extracto, definido como el porcentaje de sustancias solubles en el mosto, es la determinación más importante a la hora de caracterizar la calidad maltera de un lote de granos de cebada (Briggs, 1998). Valores elevados de extracto de malta son la consecuencia de: (i) Una correcta degradación de las paredes celulares y la matriz proteica, (ii) una adecuada provisión de enzimas amilolíticas, y (iii) un consumo de reservas mínimo por parte del embrión. El cumplimiento satisfactorio de estos procesos depende fundamentalmente de las condiciones del malteado y las características del grano, lo cual determina que la demanda de este cereal sea altamente específica en lo que a parámetros de calidad respecta. Calidad en el cultivo cebada cervecera se refiere, en definitiva, al conjunto de características químicas,

estructurales e incluso fisiológicas (*i.e.* capacidad y energía germinativa) del grano que permitirán, junto con un proceso industrial adecuado, la obtención de malta con determinaciones analíticas de calidad óptimas para la elaboración de cerveza.

El contenido proteico, el calibre y la capacidad germinativa son las principales características tenidas en cuenta a la hora de definir la calidad maltera de un lote de granos de cebada cervecera. Es por ello que estos atributos están contemplados en las bases de comercialización del cultivo (SENASA, 2013).

La proteína afecta negativamente la calidad maltera tanto por exceso como por defecto, motivo por el cual el requerimiento se fija comercialmente en un rango comprendido entre 9.5% y 13%. Valores bajos de proteína se asocian a caídas en la capacidad amilolítica (Arends *et al.*, 1995; Hayter y Riggs, 1973; Zhang *et al.*, 2006), limitaciones en la provisión de aminoácidos para la nutrición de las levaduras durante la fermentación (O'Connor-Cox y Ingledew, 1989), y fallas en la formación y retención de espuma en la cerveza (Bamforth, 1985). Asimismo, niveles elevados de proteína resultan en caídas en el extracto (Bishop, 1930a) y aumentos en la turbidez de la cerveza (Bamforth, 1999).

El calibre se define como la proporción de granos que quedan retenidos por zarandas con orificios de un tamaño determinado. La base de comercialización establece una tolerancia de recibo de al menos 80% de material retenido sobre una zaranda de 2.5mm, y hasta 4% por debajo de una zaranda de 2.2mm. Por un lado, los granos de mayor tamaño suelen asociarse a mayores valores de extracto por contener mayor proporción de almidón (Burger y LaBerge, 1985; Li *et al.*, 2008). Sumado a esto, el calibre es también un indicador de homogeneidad, característica deseable para lograr una humectación y modificación del endosperma uniforme durante el malteado.

A diferencia de otros tratamientos industriales que requieren medios físicos o químicos, la elaboración de malta se centra en un proceso netamente biológico: la germinación. Consecuentemente, la norma establece un mínimo de 98% de capacidad germinativa, con una tolerancia de recibo de hasta 95%. Aquellos lotes que presenten una alta proporción de granos que hayan perdido su capacidad germinativa resultarán en maltas pobremente modificadas, con baja capacidad amilolítica y exceso de proteínas e hidratos de carbono insolubles, no siendo las mismas aptas para la producción de cerveza.

Los lotes de cebada que no cumplen estos requisitos mínimos de calidad se comercializan como grano forrajero destinado a la alimentación animal a un precio menor reduciendo los márgenes brutos y en muchos casos dificultando cubrir los costos de producción (MAGyP, 2019). De aquí surge la necesidad de contar con herramientas agronómicas que le permitan al productor lograr una calidad comercial adecuada mediante prácticas comunes de manejo.

Los atributos del grano contemplados en la base de comercialización de cebada cervecera permiten explicar parte de la variabilidad observada en la calidad maltera. Sin embargo, hoy se sabe que existen otras características intrínsecas del grano que presentan una correlación directa con su posterior comportamiento en maltería, y por lo tanto son de gran interés para la industria maltera y cervecera. Dichas características explican la variabilidad que se observa en la calidad maltera de lotes de granos con el mismo tenor proteico, calibre y capacidad germinativa, pero provenientes de distintas zonas de producción y/o campañas distintas (Aguinaga, 2004; Eagles *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 1996; Molina-Cano *et al.*, 2000; Molina-Cano *et al.*, 1995).

Muchos trabajos han presentado evidencia que sugiere que la cantidad, proporción y/o distribución de los distintos grupos de hordeínas (proteínas de reserva de la cebada) se asocian en alguna medida a la calidad maltera (Baxter y Wainwright, 1979; Ferrari *et*

*al.*, 2010; Howard *et al.*, 1996; Molina-Cano *et al.*, 2002, 2000a; Molina-Cano *et al.*, 1995; Peltonen *et al.*, 1994; Qi *et al.*, 2005; Šimić *et al.*, 2007). Las hordeínas son las proteínas más abundantes en el endosperma del grano de cebada, y son responsables de la correlación negativa entre la proteína total y el extracto. El aumento en el contenido de nitrógeno del grano, y por ende en la cantidad de hordeínas, determina la caída del extracto debido a: (i) una menor proporción de almidón en el grano, con la consecuente disminución del sustrato degradable en azúcares fermentables, y (ii) una menor exposición de los gránulos de almidón a la acción enzimática como consecuencia de un aumento en la matriz proteica, que no llega a degradarse totalmente durante el malteado (*i.e.* modificación insuficiente del endosperma) (Molina-Cano *et al.*, 2001). Sin embargo, la bibliografía es poco concluyente respecto al grupo de hordeínas (o relación entre distintos grupos) que podría reemplazar o complementar el porcentaje de proteína total como determinante de la calidad maltera (Savin, 2004; Shewry y Darlington, 2002).

Siendo el almidón el mayor componente del grano de cebada (*ca.* 70%) y la principal fuente de azúcares fermentables durante el macerado, sus características y propiedades físico-químicas afectan directa o indirectamente la calidad industrial de la cebada (Cozzolino *et al.*, 2014). De manera similar a lo que ocurre en otros cereales, la cebada presenta dos tipos de gránulos de almidón, A y B, que se diferencian en su tamaño, forma, composición y propiedades físico-químicas (Bathgate y Palmer, 1972; Mäkelä *et al.*, 1982; Palmer, 1972). Los gránulos tipo B presentan mayor temperatura de gelatinización (*i.e.* temperatura a la cual se solubilizan en agua) respecto a los gránulos tipo A (Kang *et al.*, 1985), lo cual resulta en una menor acción enzimática durante la maceración en cervecería (Palmer, 1972). Sumado a la proporción relativa de cada tipo de gránulo, el almidón presenta otras características que pueden asociarse a la performance industrial de los granos. Muchos autores sugieren que las variaciones en la



viscosidad que se dan al elevar la temperatura de una mezcla de almidón y agua, pueden ser indicadores indirectos de determinadas características del grano asociadas a la calidad maltera (Balet *et al.*, 2019; Cozzolino *et al.*, 2016).

Como se mencionó, la capacidad germinativa del grano es otro de los aspectos que conforman la calidad, ya que el proceso industrial de malteado involucra la germinación. Sin embargo, cuando esta capacidad germinativa se adquiere demasiado temprano durante el llenado de los granos, predispone al cultivo a sufrir daño por brotado o pre-germinado, inutilizando (inmediatamente o en el corto plazo) al grano desde el punto de vista industrial por pérdida de viabilidad (Gualano *et al.*, 2014).

#### **1.1.4 Regulación ambiental de la calidad**

Si bien algunos atributos de la calidad presentan menor influencia ambiental y por lo tanto mayor estabilidad, hay otros que dependen fuertemente de las condiciones ambientales exploradas por el cultivo. Es por ello que esos atributos son susceptibles de ser modificados directa o indirectamente mediante prácticas comunes de manejo. Dos de los factores ambientales que pueden alterar la calidad industrial de la cebada de modo más notorio son la temperatura y la disponibilidad de nitrógeno, particularmente durante la etapa de llenado de los granos (Savin y Aguinaga, 2011). De aquí surge la necesidad de estudiar las relaciones existentes entre dichos factores ambientales durante este período y las características del grano que modelan la calidad comercial e industrial.

Wallwork *et al.* (1998) evaluaron los efectos de la temperatura sobre la estructura del grano en desarrollo y malteado. Encontraron que la exposición a altas temperaturas resultó en granos con mayor crecimiento del embrión y estructura del endosperma más friable, lo que provoca una sobre-modificación durante el malteado caracterizada por una degradación considerable de los gránulos de almidón tipo A. Savin *et al.* (1996) y Passarella *et al.* (2002) encontraron que las altas temperaturas durante el llenado de

granos generan un aumento en el porcentaje de nitrógeno (y en algunos casos en el contenido de  $\beta$ -glucanos) en demérito del peso y del calibre del grano, con la consecuente caída en el extracto. La caída en el peso del grano como consecuencia de una reducción en la acumulación de almidón (y consecuentemente el aumento en el porcentaje de proteína) es mayor cuando el estrés térmico se combina con situaciones de baja disponibilidad hídrica (Savin y Nicolas, 1996) o nitrogenada (Passarella *et al.*, 2008).

Qi *et al.* (2006) y Wei *et al.* (2009) realizaron experimentos *in vitro* para evaluar el efecto de la disponibilidad de nitrógeno y las altas temperaturas sobre la actividad de  $\beta$ -amilasa, una enzima que participa en la hidrólisis del almidón durante el macerado. Encontraron que tanto el incremento en el nivel de nitrógeno como el aumento de la temperatura durante el llenado resultaron en un mayor porcentaje de proteína y un incremento en la actividad de  $\beta$ -amilasa respecto al control. Adicionalmente, los granos expuestos a temperaturas elevadas durante su formación presentaron cambios en la morfología de los gránulos de almidón tipo A, y una reducción en el número de gránulos tipo B. Estos resultados se condicen con los hallados por Tester *et al.* (1991), que observaron variaciones en la composición y propiedades del almidón de granos de cebada expuestos a distintas temperaturas durante su formación.

Respecto a la composición proteica, se sabe que la proporción de los distintos grupos de hordeínas depende tanto del genotipo como del ambiente (Griffiths, 1987; Molina-Cano *et al.*, 2001). Parte de la variabilidad en este atributo puede explicarse por cambios en el contenido de nitrógeno de los granos, y por ende por la disponibilidad de nitrógeno durante su desarrollo (Griffiths, 1987; Savin *et al.*, 2006). Sin embargo, aun considerando granos de un mismo genotipo y con porcentajes de nitrógeno similares, la proporción de los distintos grupos de hordeínas puede variar, sugiriendo que existen otros

factores ambientales que afectan los contenidos relativos de este tipo de proteínas (Passarella *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2005).

Si bien existen varios trabajos publicados que describen el comportamiento de ciertos componentes del grano determinantes de la calidad maltera frente a variaciones en elementos puntuales del ambiente, aún se desconoce parcialmente de qué manera el ambiente afecta otras características relevantes para la determinación de la calidad. Más aún, no hay casos en los que el estudio esté orientado a determinar con suficiente precisión en qué momento del llenado tienen lugar las interacciones entre dichos factores del ambiente y aquellos procesos fisiológicos determinantes de los distintos aspectos que hacen a la calidad. En otras palabras, no es conocido en qué momento del llenado existe sensibilidad al efecto de los factores ambientales que son relevantes en la determinación de los diferentes atributos que hacen a la calidad final obtenida.

Rodríguez *et al.* (2001) y Gualano y Benech-Arnold (2009a) identificaron “ventanas” de sensibilidad a la temperatura durante el llenado de los granos para la determinación de la tasa de adquisición de la capacidad germinativa después de madurez fisiológica y por lo tanto del riesgo al que está expuesto el cultivo de sufrir daño por brotado. Siguiendo una metodología similar a la propuesta por estos autores, sería posible generar modelos cuantitativos análogos que permitan dilucidar con precisión en qué momento del llenado se definen otras características de importancia que determinan la calidad maltera de los granos al momento de cosecha. Para ello es necesario en primer lugar generar un modelo de tiempo térmico que describa de manera precisa el desarrollo del llenado de granos, y que sea aplicable al amplio rango de condiciones ambientales a las que se ve expuesto el cultivo durante este período. A partir de este modelo fenológico se podrían definir, considerando diferentes factores ambientales, ventanas de sensibilidad para la determinación de los distintos atributos que hacen a la calidad del grano.

Conociendo estas ventanas de sensibilidad y las condiciones ambientales a las que se expone el cultivo en dichos intervalos de tiempo, sería posible tomar decisiones de manejo (*e.g.* fecha de siembra, manejo de la fertilización nitrogenada, etc.) con el objetivo de regular su impacto sobre la calidad final de manera favorable. Adicionalmente, este análisis permitiría caracterizar de manera completa las relaciones que existen entre los atributos que no están contemplados en las bases de comercialización y las variaciones de calidad observadas en lotes de cebada que cuentan con similar tenor proteico, calibre o capacidad germinativa.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

Estudiar y caracterizar las relaciones existentes entre las diferentes condiciones ambientales a las que se ve expuesto el cultivo de cebada cervecera durante la etapa de llenado de granos, y la calidad maltera obtenida, con el fin de generar herramientas que permitan optar por decisiones de manejo que resulten en un producto final con una calidad superior.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- 1) Generar un modelo basado en tiempo térmico que permita describir con precisión el desarrollo del llenado de granos de distintos cultivares de cebada creciendo en ambientes térmicos variables.
- 2) Estudiar algunos de los atributos del grano que se corresponden con variaciones en el extracto de malta en distintos cultivares de cebada cervecera.
- 3) Dilucidar en qué momento del llenado de granos, de acuerdo al modelo de tiempo térmico generado, ocurren períodos de sensibilidad a la temperatura en procesos fisiológicos determinantes de aquellos aspectos que hacen a la calidad (*i.e.* ventanas de sensibilidad) en distintos cultivares de cebada cervecera.

- 4) Sobre la base de esta dilucidación, desarrollar modelos cuantitativos que permitan mejorar la calidad maltera de los granos a partir de prácticas comunes de manejo en distintos cultivares de cebada cervecera.

### **1.3 Hipótesis**

“El efecto de la temperatura sobre las características determinantes de la calidad maltera de los granos no es continuo a lo largo del llenado de los granos, sino que ocurre en períodos acotados durante dicha etapa (*i.e.* ventanas de sensibilidad)”



## **Capítulo 2: Desarrollo de un modelo de tiempo térmico preciso para el llenado de los granos**





## CAPÍTULO 2

### **Desarrollo de un modelo de tiempo térmico preciso para el llenado de los granos**

#### **Resumen**

El modelado preciso del llenado de granos es esencial para comprender cómo el ambiente explorado por los cultivos de cebada en el campo afecta la calidad maltera. La duración de esta etapa está fuertemente controlada por la temperatura, por lo que los modelos de tiempo térmico son ampliamente usados para describir el desarrollo del grano. Aunque la determinación correcta de una temperatura base es crucial para la precisión de los modelos de tiempo térmico, las estimaciones de este parámetro para el llenado de granos de cebada son escasas en la literatura; sumado a esto, el cálculo de la suma térmica rara vez establece claramente si el llenado de granos se trata como un fenómeno de desarrollo o de crecimiento. Peor aún, la temperatura base durante el llenado de granos generalmente se establece arbitrariamente en cero. En este capítulo se evaluaron cinco métodos diferentes para estimar el tiempo térmico requerido para completar el llenado de granos en cuatro cultivares comerciales de cebada, y la temperatura base por encima de la cual se debe acumular la temperatura para su cálculo. Los cultivos se sembraron en un amplio rango de fechas durante tres años consecutivos, y crecieron bajo dos disponibilidades contrastantes de nitrógeno. La temperatura base para el desarrollo fue cercana a 8 °C para todos los cultivares, aunque se observaron diferencias genotípicas. Se estimó una temperatura óptima del llenado de granos de alrededor de 25 °C para tres de los cuatro cultivares; sin embargo, incluir este parámetro en los modelos solo mejoró las predicciones en uno de los cultivares. El efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre la dinámica del llenado de granos fue insignificante e inconsistente entre cultivares y ambientes, lo que indica que los modelos desarrollados pueden aplicarse en condiciones contrastantes de nutrición nitrogenada similares a las evaluadas en el presente trabajo. Se

propone un modelo de aplicación amplia, con una temperatura base para el llenado de granos de 8.4 °C y un requisito de tiempo térmico para completar el llenado de granos de 352 °Cd. Todos los modelos fueron validados contra datos independientes. Estos modelos pueden ser utilizados por investigadores con el objetivo de descifrar los efectos del ambiente explorado por la planta madre sobre la calidad maltera del grano. Otras aplicaciones incluyen predecir el momento de la madurez fisiológica, y por lo tanto estimar el momento de la cosecha.

## 2.1 Introducción

El llenado de granos se define como la fase que tiene lugar entre antesis y madurez fisiológica (i.e. cuando se alcanza el peso seco máximo del grano; Shaw y Loomis, 1950). En los cultivos de cebada destinados a la producción de malta para la elaboración de cerveza, este período es crítico, ya que se están definiendo los atributos químicos, estructurales y fisiológicos del grano que afectan la calidad maltera (Savin y Aguinaga, 2011; Savin y Molina-Cano, 2002). Cada uno de estos atributos se establece durante un período específico del llenado de granos (Savin y Molina-Cano, 2002). Por lo tanto, la forma en que el ambiente explorado por la planta madre afecta la calidad final del grano depende de la etapa del desarrollo del grano considerada. Savin y Nicolas (1999) encontraron que el impacto de las altas temperaturas durante el llenado de granos en la composición del almidón del grano y, en consecuencia, en la calidad de la malta, depende de su momento de ocurrencia. Passarella *et al.* (2002) concluyeron que el efecto de un breve período de aumento de la temperatura durante el llenado de granos sobre el peso del grano y el contenido de proteína depende en gran medida de cuándo sucede dicho estrés térmico y del cultivar considerado. El período de sensibilidad a los factores ambientales está delimitado con precisión para algunos rasgos del grano relacionados con la calidad. Por ejemplo, la tasa de salida de la dormición del grano (y, concomitantemente, la susceptibilidad al brotado pre-cosecha y el momento en que se puede iniciar el proceso de malteado después de la cosecha) depende para varios cultivares de cebada, de la temperatura media del aire explorada por la planta madre inmediatamente antes de la madurez fisiológica y dentro de una “ventana” de tiempo térmico precisa y acotada. De esta manera, la identificación de períodos durante los cuales los factores ambientales tienen efectos específicos sobre los rasgos del grano que afectan la calidad maltera proporcionaría una mejor comprensión de cómo se forma la calidad en el campo. Para

hacerlo, es esencial una descripción precisa del desarrollo de granos a través de modelos fenológicos adecuados.

Sobre la base de que en el cultivo de cebada el fotoperíodo y la vernalización dejan de influir en la fenología del cultivo desde la espigazón, es ampliamente aceptado que, en ausencia de un estrés terminal, la duración del llenado de granos para un cultivar de cebada determinado está controlada casi exclusivamente por la temperatura (Miralles y Slafer, 1999). Si bien algunos estudios encontraron que el tiempo a floración se ve afectado por la disponibilidad de nitrógeno (Arisnabarreta y Miralles, 2004), el efecto del nitrógeno en la fenología es agrónomicamente insignificante cuando se consideran las fases previas a la espigazón (Hall *et al.*, 2014). Por otro lado, su efecto sobre la duración de las fases posteriores a espigazón ha sido mucho menos estudiado, aunque hay algunas evidencias de que la disponibilidad de nitrógeno podría afectar la duración del llenado de granos en cebada (Manderscheid *et al.*, 2009). Sin embargo, debido a la relevancia de la temperatura en el control de la duración del llenado de granos, el enfoque del tiempo térmico se usa ampliamente para describir el desarrollo del grano (Slafer y Rawson, 1994). Los modelos más comunes consideran que la tasa de desarrollo (*i.e.*, la inversa de la duración de la fase) aumenta con la temperatura media del aire cuando esta última está por encima de un valor umbral (generalmente conocido como temperatura base), por debajo del cual la tasa de desarrollo es nula (Monteith, 1984). Por lo tanto, la tasa de desarrollo se incrementa desde la temperatura base hasta la óptima, temperatura en la cual la tasa de desarrollo es máxima y por ende la duración de la fase en días es mínima. Por encima de la temperatura óptima, la tasa de desarrollo disminuye hasta que se alcanza la temperatura crítica, más allá de lo cual cesa el desarrollo (García-Huidobro *et al.*, 1982). Si la relación entre la tasa de desarrollo y la temperatura es lineal, como sucede con el período de llenado de granos de cebada entre la temperatura base y la óptima (Gallagher

*et al.*, 1983), las unidades de tiempo térmico acumulado (grados-día, °Cd) para la fase puede calcularse como la suma diaria de la temperatura media del aire por encima de la temperatura base (Bonhomme, 2000).

El uso de una temperatura base apropiada es crucial para los modelos de tiempo térmico (Del Pozo *et al.*, 1987; Morrison *et al.*, 1989). Se sabe que la temperatura base puede variar entre especies (Brown, 1960; Morrison *et al.*, 1989; Ruml *et al.*, 2010; Zapata *et al.*, 2015), cultivares (Gualano y Benech-Arnold, 2009a; Porter y Gawith, 1999; Slafer y Rawson, 1995a) e incluso a lo largo de las fases fenológicas (Angus *et al.*, 1981; Del Pozo *et al.*, 1987; Slafer y Rawson, 1995a; Slafer y Savin, 1991). Sin embargo, el valor estimado también depende del método utilizado para su determinación (Snyder *et al.*, 1999). Los métodos de estimación de la temperatura base tienen un fundamento estadístico más que fisiológico; por lo tanto, algunos autores lo consideran un parámetro matemático sin interpretación fisiológica (Bonhomme, 2000; Yang *et al.*, 1995). Los métodos más comunes empleados para la estimación de la temperatura base en la literatura son:

- Menor variabilidad (medida como desvío estándar o coeficiente de variación) de la duración de la fase (Molitor *et al.*, 2014; Ruml *et al.*, 2010).

- Intercepción del eje X de una regresión lineal entre la tasa de desarrollo y la temperatura media del aire de la fase (Del Pozo *et al.*, 1987; Gallagher *et al.*, 1983; Garcia-Huidobro *et al.*, 1982; Hunt *et al.*, 1991; Slafer y Savin, 1991; Vos, 1981).

- Independencia entre la duración de la fase (medida en tiempo térmico) y la temperatura media del aire (es decir, la pendiente de una regresión lineal entre las dos variables es cero; (Hoover, 1955; Zapata *et al.*, 2015).

- Máximo ajuste (medido como el coeficiente de determinación,  $r^2$ ) de una regresión lineal-*plateau* describiendo la acumulación de materia seca del grano en función del tiempo térmico (Gualano y Benech-Arnold, 2009a; Rodríguez *et al.*, 2001).

A pesar de la importancia de seleccionar una temperatura base adecuada cuando se utiliza el tiempo térmico, muchos modelos fenológicos de cebada (Alzueta *et al.*, 2014; Holzworth *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2003) y estudios (Dofing, 1997; Frank y Bauer, 1995; Kennedy *et al.*, 2017; Lyu *et al.*, 2018; Swanston *et al.*, 1997; Voltas *et al.*, 1999) asumen que la temperatura base del llenado de granos es cero o utilizan estimaciones realizadas en el cultivo de trigo. Esto podría conducir a un modelado sesgado de la fenología, con consecuencias en nuestros intentos de comprender cómo el ambiente en el campo construye y modula la calidad maltera en cebada. Las estimaciones de temperatura base para cebada en la literatura son pocas en comparación con otros cultivos (Sadras y Dreccer, 2015), y aún menos cuando se considera la fase de llenado de granos. Vos (1981) calculó una temperatura base de 2.25 °C para el desarrollo del grano de cebada mediante el método de intercepción del eje x, pero la regresión se realizó con pocos datos ( $n = 3$ ) y no se informó el error de la estimación. Gallagher *et al.* (1983) incorporaron datos de otros dos estudios a este análisis y encontraron una temperatura base de 3.4 °C (error estándar 1.7 °C) para el mismo período. Goyne *et al.* (1996) encontraron que 7.1 °C era la temperatura base que maximizaba la bondad del ajuste de una regresión lineal entre el índice de cosecha y el tiempo térmico desde antesis en un cultivar de cebada. De manera similar, Gualano y Benech-Arnold (2009a) y Rodríguez *et al.* (2001) estimaron la temperatura base del llenado de granos para varios cultivares de cebada utilizando el método lineal-*plateau* mencionado anteriormente, y encontraron valores que la misma varía entre 5.5 y 7 °C, dependiendo del cultivar considerado.

Los métodos de estimación utilizados por Goyne *et al.* (1996), Gualano y Benech-Arnold (2009a) y Rodríguez *et al.* (2001), a diferencia de los otros descritos anteriormente, tienen en cuenta el crecimiento del grano para la estimación de la temperatura base. Es importante resaltar que cuando se utilizan modelos de tiempo térmico es aconsejable establecer si el llenado de granos se considera un fenómeno de desarrollo o de crecimiento, ya que estos dos procesos están controlados por diferentes factores ambientales e involucran diferentes mecanismos fisiológicos (Álvarez Prado *et al.*, 2017; Bonhomme, 2000; Ritchie y NeSmith, 1991). La tasa de desarrollo describe el momento de las etapas ontogénicas, mientras que la tasa de crecimiento describe los cambios en la materia seca o el tamaño de una planta o sus órganos a lo largo del tiempo. El llenado de granos está estrechamente relacionado tanto con la acumulación de materia seca como con cambios cualitativos en la estructura de la planta. Por lo tanto, discriminar desarrollo de crecimiento podría ser particularmente arbitrario al considerar esta fase. Sin embargo, identificar los períodos dentro del llenado de granos durante los cuales se determinan los atributos que afectan la calidad maltera, implica modelar el tiempo y la duración de tales procesos y, por lo tanto, el desarrollo parece más adecuado y debe tenerse en cuenta por sobre los fenómenos de crecimiento para la formulación de dicho modelo. Sin embargo, determinar si la misma temperatura base se aplica tanto al crecimiento como al desarrollo del grano durante el período de llenado de granos podría darnos una idea más clara de la naturaleza del proceso.

Hasta donde sabemos, no hay estudios publicados que comparen las temperaturas base de desarrollo y crecimiento para el llenado de granos estimadas a través de diferentes métodos y para diferentes cultivares de cebada cervecera. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es estimar la temperatura base y formular modelos de tiempo térmico precisos para el desarrollo del grano de cebada mediante la comparación de diferentes métodos de

estimación y, alternativamente, evaluar dichos parámetros considerando el llenado de granos como un proceso crecimiento.

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Materiales y métodos comunes a todas los capítulos**

#### **2.2.1.1 Generalidades**

Para alcanzar todos los objetivos planteados en la presente tesis se realizó un único experimento a campo con cuatro cultivares de cebada cervecera (*Hordeum vulgare* L.), once fechas de siembra (de óptimas a subóptimas) distribuidas entre 2015 y 2018, y distintas disponibilidades de nitrógeno. La combinación de fechas de siembra y campañas se utilizó como método para generar variabilidad térmica durante el período de llenado de granos. La mayoría de las siembras y tratamientos de nitrógeno fueron utilizados para alcanzar más de uno de los objetivos planteados, aunque hay excepciones que se indican claramente en los materiales y métodos propios de cada capítulo, así como en el **Cuadro 2.1**. Todas las siembras se llevaron a cabo en el campo experimental del Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Buenos Aires, Argentina (34° 35' S, 58° 29' O).

#### **2.2.1.2 Material vegetal**

En todas las siembras y para todos los capítulos, los cultivares empleados fueron Andreaia, Scrabble, Quilmes Carisma y ABI Balster. Estos cultivares comerciales, de dos hileras, fueron seleccionados por su relevancia en la industria cervecera argentina y/o por su respuesta contrastante en términos de calidad maltera a las condiciones ambientales exploradas por la planta madre (comunicación personal Antonio Aguinaga).



**Cuadro 2.1.** Fechas de siembra y tratamientos de nitrógeno utilizados en cada capítulo de la presente tesis, para cada cultivar. Se indica con una “X” las fechas de siembra y tratamientos de nitrógeno utilizados en cada caso. FS: Fecha de siembra; C: Cultivar; N: Tratamiento de nitrógeno; N1: 85 kg N ha<sup>-1</sup>; N2: 170 kg N ha<sup>-1</sup>; N3: 200 kg N ha<sup>-1</sup>.

FS	C	N	Capítulo			FS	C	N	Capítulo		
			2	3	4				2	3	4
02/06/2015	ABI Balster	N1	X	X		24/06/2016	ABI Balster	N1	X	X	X
		N2	X	X				N2	X	X	X
	Andreia	N1	X	X			Andreia	N1	X	X	X
		N2	X	X				N2	X	X	X
	Q. Carisma	N1	X	X	X		Q. Carisma	N1	X	X	X
		N2	X	X	X			N2	X	X	X
	Scrabble	N1	X		X		Scrabble	N1	X	X	X
		N2	X		X			N2	X	X	X
24/06/2015	ABI Balster	N1	X	X		16/08/2016	ABI Balster	N1	X	X	X
		N2	X	X				N2	X	X	X
	Andreia	N1	X	X	X		Andreia	N1	X	X	X
		N2	X	X	X			N2	X	X	X
	Q. Carisma	N1	X	X	X		Q. Carisma	N1	X	X	X
		N2	X	X	X			N2	X	X	X
	Scrabble	N1	X	X	X		Scrabble	N1	X	X	X
		N2	X	X	X			N2	X	X	X
17/07/2015	ABI Balster	N1	X	X		22/09/2016	ABI Balster	N1		X	X
		N2	X	X	X			N2		X	X
	Andreia	N1	X	X	X		Andreia	N1		X	X
		N2	X	X	X			N2		X	X
	Q. Carisma	N1	X	X	X		Q. Carisma	N1		X	X
		N2	X	X	X			N2		X	X
	Scrabble	N1	X	X	X		Scrabble	N1		X	X
		N2	X	X	X			N2		X	X
02/09/2015	ABI Balster	N1	X	X	X	04/07/2017	ABI Balster	N1	X	X	X
		N2	X	X	X			N2	X	X	X
	Andreia	N1	X	X	X		Andreia	N1	X	X	X
		N2	X	X	X			N2	X	X	X
	Q. Carisma	N1	X	X	X		Q. Carisma	N1	X	X	X
		N2	X	X	X			N2	X	X	X
	Scrabble	N1	X	X	X		Scrabble	N1	X	X	X
		N2	X	X	X			N2	X	X	X
16/09/2015	ABI Balster	N1				18/08/2017	ABI Balster	N1	X	X	X
		N2			X			N2	X	X	X
	Andreia	N1			X		Andreia	N1	X	X	
		N2			X			N2	X	X	X
	Q. Carisma	N1			X		Q. Carisma	N1	X	X	X
		N2			X			N2	X	X	X
	Scrabble	N1			X		Scrabble	N1	X	X	X
		N2			X			N2	X	X	X
12/09/2018	ABI Balster	N3			X	ABI Balster	N3			X	
	Andreia	N3			X	Andreia	N3			X	
	Q. Carisma	N3			X	Q. Carisma	N3			X	
	Scrabble	N3			X	Scrabble	N3			X	

### 2.2.1.3 Diseño experimental y manejo del cultivo

El experimento se realizó siguiendo un diseño de parcelas divididas, con la fecha de siembra asignada a las parcelas principales y las combinaciones de genotipo y nitrógeno a las subparcelas. Todas las parcelas principales se organizaron en tres bloques aleatorios. Cada subparcela constó de 7 surcos a 0.175 m de distancia y 3.6 m de largo. La densidad de siembra fue de *ca.* 275 semillas m<sup>-2</sup>. Para evitar el déficit hídrico, la lluvia natural se complementó con riego durante todo el ciclo del cultivo. Cuando fue necesario, se aplicaron los tratamientos químicos recomendados para evitar plagas y enfermedades. Se tomaron muestras de suelo correspondientes a la capa de suelo de 0.4 m de profundidad en cada parcela principal en el día de la siembra para determinar la disponibilidad inicial de nitrógeno y fósforo. Se aplicó urea en macollaje para alcanzar la disponibilidad de nitrógeno objetivo, dependiendo del tratamiento asignado a cada subparcela. En todos los casos, la disponibilidad objetivo fue resultante de la suma de N-NO<sub>3</sub> en la capa de suelo de 0.4 m de profundidad a la siembra más el nitrógeno agregado como fertilizante. La disponibilidad inicial de fósforo siempre fue de al menos 70 mg kg<sup>-1</sup> (Bray y Kurtz, 1945) en cada parcela principal, por lo que no fue necesaria la fertilización fosforada.

### 2.2.1.4 Ambiente térmico y mediciones de fenología

Las temperaturas mínimas y máximas diarias se obtuvieron de una estación meteorológica ubicada a 350 m del sitio experimental. La temperatura media diaria se calculó como la media aritmética de la máxima y mínima diarias. La temperatura media para un período dado se calculó como la suma de la temperatura media diaria dividida por la duración del período en días. Promediando todos los cultivares y disponibilidades de nitrógeno, y considerando todas las siembras, la temperatura media para la fase de llenado de granos varió entre 16.8 y 24.2 °C, mientras que las temperaturas mínimas y máximas diarias alcanzaron los 10.5 y 28.7 °C, respectivamente (**Cuadro 2.2**). La

fenología del cultivo se evaluó periódicamente (al menos dos veces por semana). Para determinar la fecha de polinización, las flores de la parte central de aproximadamente 10 espigas se inspeccionaron manualmente después de la aparición de la hoja de la bandera. La fecha de polinización se registró cuando el 50% de las espigas presentaron flores fértiles (Waddington *et al.*, 1983), coincidiendo generalmente con aristas visibles sobre la vaina de la hoja de la bandera.

**Cuadro 2.2.** Temperatura media, media mínima y media máxima para la fase de llenado de grano de cada siembra, promediando los cultivares y los tratamientos de nitrógeno. FS: Fecha de siembra; Tm: Temperatura media; Tmin: Temperatura media mínima; Tmax: Temperatura media diaria máxima.

Año	FS	Tm [°C]	Tmin [°C]	Tmax [°C]
2015	02-jun	16.8	10.5	22.9
	24-jun	18.9	12.4	25.2
	17-jul	19.7	14.4	25.2
	02-sep	21.4	15.4	26.9
	16-sep	22.7	16.6	28.7
2016	24-jun	19.1	12.3	26.7
	16-ago	21.6	14.7	26.6
	22-sep	24.2	18.8	28.3
2017	04-jul	20.1	13.0	26.0
	18-ago	20.6	13.9	26.0
2018	12-sep	21.2	15.4	28.0

## 2.2.2 Materiales y métodos específicos para el Capítulo 2.

### 2.2.2.1 Tratamientos

Las fechas de siembra utilizadas para el Capítulo 2 fueron 2 de junio, 24 de junio, 17 de julio y 2 de septiembre en 2015, 24 de junio y 16 de agosto en 2016, y 4 de julio y 18 de agosto en 2017 (**Cuadro 2.1**). Para evaluar el rango de aplicación del modelo y probar posibles efectos de nitrógeno en el crecimiento y desarrollo de los granos, se utilizaron dos disponibilidades de nitrógeno contrastantes: 85 (N1) y 170 (N2) kg N ha<sup>-1</sup> (**Cuadro 2.1**).

### 2.2.2.2 Muestras y mediciones

Desde el momento de polinización y hasta la cosecha, se tomaron muestras de 7-8 espigas por subparcela cada 2-4 días. Los granos del tercio central de las espigas se trillaron a mano y se secaron a 80 °C durante 72 h, después de lo cual se determinó el peso seco por grano con una balanza de precisión. Para estimar la tasa de crecimiento de grano y la duración del llenado, se ajustó un modelo bilineal descrito por dos ecuaciones con un límite, para cada subparcela (Miralles *et al.*, 1996):

$$PS = \begin{cases} a + b x & \text{si } x < c \\ a + b c & \text{si } x \geq c \end{cases} \quad \text{Ec. 2.1}$$

Donde  $PS$  es el peso seco del grano,  $a$  es la ordenada al origen,  $b$  es la pendiente,  $x$  es el tiempo desde la polinización medido en días y  $c$  es el punto de quiebre de la regresión (*i.e.* la duración del llenado de granos en días). Se excluyeron los datos correspondientes a la fase *lag*, considerados como valores de peso seco del grano inferiores al 10% del peso seco máximo medio ( $PS$  cuando  $x \geq c$ ; Loss *et al.*, 1989). La tasa de crecimiento se consideró igual a  $b$ , mientras que la tasa de desarrollo se calculó como  $c^{-1}$ .

### 2.2.2.3 Cálculo de grados-día

A menos que se indique lo contrario, los grados-día se calcularon diariamente, y los grados-día acumulados para cada subparcela se obtuvieron sumando los valores diarios, comenzando un día después de la fecha de polinización y hasta alcanzar la madurez fisiológica ( $c$  en Ec. 2.1):

$$GD = \begin{cases} 0 & \text{si } t_m \leq t_b \\ t_m - t_b & \text{si } t_m > t_b \end{cases} \quad \text{Ec. 2.2}$$

$$GDA = \sum_{i=1}^c GD_i \quad \text{Ec. 2.3}$$

Donde  $GD$  son los grados-día diarios,  $t_m$  es la temperatura media diaria,  $t_b$  es la temperatura base y  $GDA$  son los grados-día acumulados para el llenado de granos.

#### **2.2.2.4 Estimación de la temperatura base para el desarrollo**

La temperatura base para el desarrollo se estimó para cada cultivar por separado. Asimismo, se desarrolló un modelo de aplicación amplia con datos agrupados de todos los cultivares. La formulación de un modelo preciso para el desarrollo de granos es el objetivo central del presente estudio. Por lo tanto, la estimación se realizó empleando cinco de los métodos más utilizados en la literatura. Para los métodos de estimación que requieren iteración, se consideraron temperaturas base candidatas de 0 a 12 °C, con incrementos de 0.1 °C.

##### **2.2.2.4.1 Método lineal-plateau**

Una regresión bilineal con un *plateau* que describe la materia seca del grano en función del tiempo térmico acumulado desde polinización se ajustó con datos de todas las fechas de siembra. Como el peso final del grano puede variar entre fechas de siembra, los datos de peso de grano de cada subparcela se expresaron como una proporción de su valor máximo. La regresión se repitió cambiando la temperatura base empleada en el cálculo de los grados-día. Se seleccionó la temperatura base que maximizó la bondad del ajuste (medida como el coeficiente de determinación,  $r^2$ ). Para este método, el tiempo térmico entre la polinización y madurez fisiológica se estimó como el punto de quiebre de la regresión bilineal.

##### **2.2.2.4.2 Método de la pendiente cero**

Este método asume independencia entre el tiempo térmico y la temperatura media. El tiempo térmico acumulado entre polinización y madurez fisiológica se calculó para cada parcela (ver Ec. 2.2 y 2.3) iterando sobre las temperaturas base candidatas. Se evaluó la pendiente de la regresión entre cada set de sumas térmicas y la temperatura media de la fase. La temperatura base seleccionada fue aquella que resultó en una pendiente de cero.

### 2.2.2.4.3 Método de menor variabilidad

Se sabe que minimizar el desvío estándar (medido en días) y minimizar el coeficiente de variación de la duración de la fase produce resultados casi idénticos al estimar la temperatura base (Ruml *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 1995). Por lo tanto, en el presente trabajo solo se consideró el coeficiente de variación. El coeficiente de variación se definió como:

$$CV = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (GDA_i - GDA_m)^2}{N-1}}}{GDA_m} \times 100 \quad \text{Ec. 4}$$

Donde  $GDA_i$  son los grados-día acumulados para la  $i$ -ésima parcela,  $GDA_m$  es el promedio de grados-día acumulados de todas las parcelas, y  $N$  es el número de parcelas.

### 2.2.2.4.4 Método de menor variabilidad considerando una temperatura óptima

Siendo que las fechas de siembra tardías generalmente ubican el llenado de granos en períodos durante los cuales las temperaturas medias diarias pueden ser relativamente altas, se agregó alternativamente una temperatura óptima al cálculo de grados-día (Ec. 2.5, 2.6 y 2.7). Se consideraron temperaturas óptimas candidatas de 20 a 30 °C, con incrementos de 0.1 °C.

$$GD_{op} = \begin{cases} 0 & \text{si } t_m \leq t_b \\ t_m - t_b & \text{si } t_b < t_m < t_o \\ t_o - t_b & \text{si } t_m \geq t_o \end{cases} \quad \text{Ec. 2.5}$$

$$GDA_{op} = \sum_{i=1}^c GD_{op}^i \quad \text{Ec. 2.6}$$

$$CV_{op} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (GDA_{op}^i - GDA_{op}^m)^2}{N-1}}}{GDA_{op}^m} \times 100 \quad \text{Ec. 2.7}$$

Donde  $t_o$  es la temperatura óptima, por encima de la cual los aumentos en la temperatura media no dan como resultado reducciones adicionales de la duración de la fase. De acuerdo con este método se seleccionaron aquellas temperaturas base y óptima que minimizaron el coeficiente de variación.

#### 2.2.2.4.5 Método de intersección del eje x

Este método consiste en realizar una regresión lineal entre la tasa de desarrollo y temperatura media de la fase. La temperatura base corresponde a la intersección del eje x (*i.e.* la temperatura media cuando la tasa de desarrollo es cero) y, para este método en particular, el tiempo térmico entre polinización y madurez fisiológica se calcula como la inversa de la pendiente.

#### 2.2.2.5 Estimación de la temperatura base tratando el llenado de granos como un proceso de crecimiento

La temperatura base para el crecimiento del grano se evaluó mediante el método de intersección del eje x, descrito anteriormente (ver sección 2.2.2.4.5), solo que la tasa de crecimiento ( $\text{mg día}^{-1}$ ) ( $b$  en Ec. 2.1), en lugar de la tasa de desarrollo ( $\text{día}^{-1}$ ), se modeló en función de la temperatura media de la fase. Este fue el único método de estimación utilizado en el presente estudio para evaluar la temperatura base y el tiempo térmico considerando el llenado de granos como un proceso de crecimiento. La temperatura base corresponde a la intersección del eje x (*i.e.* la temperatura media cuando la tasa de crecimiento es cero), mientras que el requerimiento de tiempo térmico para acumular un miligramo de materia seca por grano se calculó como la inversa de la pendiente de la regresión.

#### 2.2.2.6 Evaluación y validación de los modelos.

Para evaluar y comparar los métodos de estimación de la temperatura base de desarrollo se calcularon dos medidas del desempeño del modelo: la raíz del error cuadrático medio (Ec. 2.8) y el índice de concordancia de Willmott (Ec. 2.9, Willmott *et al.*, 2012).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (P_i - O_i)^2}{N}}$$

Ec. 2.8

$$d_r = \begin{cases} 1 - \frac{\sum_{i=1}^N |P_i - O_i|}{2 \sum_{i=1}^N |O_i - \bar{O}|} & \text{si } \sum_{i=1}^N |P_i - O_i| \leq 2 \sum_{i=1}^N |O_i - \bar{O}| \\ \frac{2 \sum_{i=1}^N |O_i - \bar{O}|}{\sum_{i=1}^N |P_i - O_i|} - 1 & \text{si } \sum_{i=1}^N |P_i - O_i| > 2 \sum_{i=1}^N |O_i - \bar{O}| \end{cases} \quad \text{Ec. 2.9}$$

Donde  $P_i$  y  $O_i$  son la duración de fase predicha y observada en días para la  $i$ -ésima parcela, respectivamente.

El peso seco relativo del grano se graficó en función del tiempo desde polinización en días y en tiempo térmico para hacer comparaciones.

Los modelos cultivar-específicos para el desarrollo de los granos fueron validados para Andreia y Scrabble utilizando datos independientes de otros experimentos a campo llevados a cabo en dos estaciones de crecimiento diferentes (

**Cuadro 2.3).** El modelo de aplicación amplia para el desarrollo de granos fue validado contra datos independientes de esos dos cultivares, más un tercero (Explorer) que no se incluyó en las estimaciones anteriores. El modelo de crecimiento de grano también se validó con los datos de esos tres cultivares, considerando la acumulación de materia seca durante la fase de crecimiento lineal del llenado de grano (*i.e.* entre el final de la fase *lag* y la madurez fisiológica). Todos los datos utilizados para la validación fueron obtenidos de ensayos en condiciones de campo llevados a cabo en el marco de una tesis de grado (Otero, 2015).

**Cuadro 2.3.** Fecha de siembra, temperatura media, media mínima y media máxima para la fase de llenado de granos promediando los cultivares y los tratamientos de nitrógeno, correspondiente a los datos utilizados para validar los modelos cuantitativos. FS: Fecha de siembra; Tm: Temperatura media; Tmin: Temperatura media mínima; Tmax: Temperatura media diaria máxima.

Año	FS	Tm [°C]	Tmin [°C]	Tmax [°C]
2013	26-jun	19.7	13.0	24.7
	26-jul	19.8	13.0	26.5
	11-oct	25.9	18.1	31.9
2014	18-ago	22.1	16.6	26.7



### 2.2.2.7 Análisis estadístico

Todos los cálculos y regresiones se realizaron con el lenguaje de programación R (R Core Team, 2018).

Los valores de subparcelas con el mismo tratamiento se promediaron para realizar las regresiones para los métodos de intersección del eje x y de pendiente cero, así como para calcular el coeficiente de variación en los métodos de menor variabilidad. El método lineal-*plateau* se realizó de acuerdo con Gualano y Benech-Arnold (2009a). Las diferencias entre los tratamientos de nitrógeno y los cultivares fueron evaluadas por ANOVA para cada fecha de siembra, y mediante la regresión del método de intersección del eje x.

En el método de intersección del eje x se evaluó el efecto del nitrógeno sobre la tasa de desarrollo y de crecimiento mediante pruebas de verosimilitud comparando regresiones con y sin disponibilidad de nitrógeno como variable explicativa, y considerando un valor p de 0.05. A su vez, en dicho método se calculó el intervalo de confianza de Wald para la estimación de temperatura base usando el paquete de R *investr* (Greenwell y Schubert Kabban, 2014).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Efecto de la fecha de siembra, el cultivar y la disponibilidad de nitrógeno sobre la tasa de crecimiento de los granos y la duración del llenado de granos

Se observaron diferencias significativas entre las siembras tanto en la duración del llenado de grano como en la tasa de crecimiento (**Cuadro 2.4**). Dentro de cada año, las siembras tempranas siempre se asociaron con llenados de granos más largos y tasas de crecimiento más bajas, en comparación con las siembras tardías (**Cuadro 2.4**). Considerando todas las combinaciones de fechas de siembra y disponibilidad de nitrógeno, la duración promedio del llenado de granos varió en un rango de 14, 18 y 19

días para Q. Carisma, Andreia y ABI Balster y Scrabble, respectivamente. La tasa de crecimiento del grano, por otro lado, varió en un rango de 0.67, 0.61, 0.75 y 0.79 mg grano<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> para cada uno de esos cultivares, respectivamente.

**Cuadro 2.4.** Tasa de crecimiento del grano y la duración de la fase de llenado de granos para cada fecha siembra, promediando los cultivares y tratamientos de nitrógeno. Letras diferentes indican diferencias significativas a través de la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). FS: Fecha de siembra; TCG: Tasa de crecimiento del grano; DG: duración de llenado de granos.

Año	FS	TCG [mg grano <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> ]	DG [días]
2015	02-jun	1.60 <sup>d</sup>	40 <sup>a</sup>
	24-jun	1.76 <sup>c</sup>	34 <sup>b</sup>
	17-jul	1.92 <sup>b</sup>	30 <sup>c</sup>
	02-sep	2.09 <sup>a</sup>	25 <sup>d</sup>
2016	24-jun	1.57 <sup>d</sup>	34 <sup>b</sup>
	16-ago	nd	27 <sup>d</sup>
2017	04-jul	1.75 <sup>c</sup>	33 <sup>b</sup>
	18-ago	2.00 <sup>ab</sup>	29 <sup>c</sup>

nd: no disponible

Andreia, Scrabble y ABI Balster alcanzaron la polinización en una fecha similar en cada siembra, mientras que Q. Carisma tendió a llegar a la polinización más tarde (*ca.* 4 días) en las siembras de junio y antes (*ca.* 6 días) en las siembras de agosto y septiembre, en comparación a los otros cultivares (**Cuadro 2.5**). El tratamiento con nitrógeno afectó significativamente el momento de la polinización en 4 de las 8 siembras (**Cuadro 2.5**). Sin embargo, el efecto fue relativamente pequeño (2.5 días o menos), lo cual es irrelevante en términos agronómicos, y la dirección de dicho efecto fue inconsistente entre siembras y genotipos (**Cuadro 2.5**). Dicha ambigüedad en el efecto del nitrógeno se observó al considerar la tasa de crecimiento del grano y la duración del llenado de granos, ya que se encontraron diferencias significativas para estas características solo en 3 siembras (**Cuadro 2.5**). Además, en solo una de esas siembras la diferencia fue superior al 8% (**Cuadro 2.5**). Por lo tanto, el efecto del nitrógeno, aunque significativo en algunos casos, fue agronómicamente insignificante en términos de tasa de crecimiento de grano y duración de llenado de granos.

**Cuadro 2.5.** Tiempo desde la siembra hasta la polinización (S-P), tasa de crecimiento del grano (TCG) y duración de llenado de granos (DG) para cada fecha de siembra (FS) y cultivar (C) bajo dos tratamientos de disponibilidad de nitrógeno (N). La significancia estadística de cada factor se indica al final de cada columna. Las letras comparan combinaciones de genotipos por nitrógeno dentro de cada fecha de siembra usando la prueba de Tukey.

C	N	FS											
		2-jun-2015			24-jun-2015			17-jul-2015			2-sep-2015		
		S-P [días]	TCG [mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	DG [días]	S-P [días]	TCG [mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	DG [días]	S-P [días]	TCG [mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	DG [días]	S-P [días]	TCG [mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	DG [días]
Andreaia	N1	123 <sup>ac</sup>	1.55 <sup>ac</sup>	39.9 <sup>ac</sup>	117 <sup>a</sup>	1.76 <sup>a</sup>	31.7 <sup>a</sup>	102 <sup>a</sup>	1.91 <sup>a</sup>	27.9 <sup>a</sup>	73 <sup>bc</sup>	1.98 <sup>a</sup>	25.2 <sup>a</sup>
	N2	120 <sup>ab</sup>	1.52 <sup>ab</sup>	42.7 <sup>c</sup>	116 <sup>a</sup>	1.59 <sup>a</sup>	36.0 <sup>ab</sup>	102 <sup>a</sup>	1.75 <sup>a</sup>	30.0 <sup>a</sup>	74 <sup>c</sup>	2.00 <sup>a</sup>	26.6 <sup>a</sup>
ABI Balster	N1	120 <sup>bc</sup>	1.47 <sup>a</sup>	42.0 <sup>c</sup>	118 <sup>a</sup>	1.83 <sup>a</sup>	32.7 <sup>ab</sup>	102 <sup>a</sup>	1.91 <sup>a</sup>	28.8 <sup>a</sup>	74 <sup>c</sup>	2.02 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>
	N2	119 <sup>ac</sup>	1.47 <sup>a</sup>	43.1 <sup>c</sup>	114 <sup>a</sup>	1.87 <sup>a</sup>	36.5 <sup>ab</sup>	102 <sup>a</sup>	2.22 <sup>a</sup>	29.4 <sup>a</sup>	76 <sup>c</sup>	2.02 <sup>a</sup>	25.1 <sup>a</sup>
Q. Carisma	N1	128 <sup>d</sup>	1.79 <sup>bc</sup>	36.8 <sup>ab</sup>	117 <sup>a</sup>	1.72 <sup>a</sup>	30.8 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	1.97 <sup>a</sup>	28.6 <sup>a</sup>	67 <sup>ab</sup>	2.15 <sup>a</sup>	23.0 <sup>a</sup>
	N2	127 <sup>cd</sup>	1.60 <sup>ac</sup>	35.3 <sup>a</sup>	115 <sup>a</sup>	1.86 <sup>a</sup>	34.7 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	2.18 <sup>a</sup>	29.6 <sup>a</sup>	66 <sup>a</sup>	2.16 <sup>a</sup>	25.1 <sup>a</sup>
Scrabble	N1	123 <sup>ab</sup>	1.59 <sup>ac</sup>	41.1 <sup>bc</sup>	115 <sup>a</sup>	1.80 <sup>a</sup>	33.3 <sup>ab</sup>	102 <sup>a</sup>	1.74 <sup>a</sup>	31.7 <sup>a</sup>	74 <sup>c</sup>	2.41 <sup>a</sup>	22.9 <sup>a</sup>
	N2	123 <sup>a</sup>	1.80 <sup>c</sup>	40.3 <sup>bc</sup>	116 <sup>a</sup>	1.63 <sup>a</sup>	38.1 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	1.70 <sup>a</sup>	33.3 <sup>a</sup>	76 <sup>c</sup>	1.92 <sup>a</sup>	25.7 <sup>a</sup>
	G	***	**	***	ns	ns	ns	*	*	*	***	ns	ns
	N	*	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	*
	G*N	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C	N	FS											
		24-jun-2016			16-ago-2016			4-jul-2017			18-ago-2017		
		S-P [días]	TCG [mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	DG [días]	S-P [días]	TCG [mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	DG [días]	S-P [días]	TCG [mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	DG [días]	S-P [días]	TCG [mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	DG [días]
Andreaia	N1	108 <sup>ab</sup>	1.65 <sup>a</sup>	34.0 <sup>a</sup>	80 <sup>ab</sup>	-	25.0 <sup>a</sup>	104 <sup>a</sup>	1.85 <sup>a</sup>	33.3 <sup>a</sup>	76.0 <sup>b</sup>	2.13 <sup>b</sup>	28.3 <sup>a</sup>
	N2	108 <sup>ab</sup>	1.54 <sup>a</sup>	35.5 <sup>a</sup>	82 <sup>ab</sup>	-	28.1 <sup>a</sup>	104 <sup>a</sup>	1.74 <sup>a</sup>	32.9 <sup>a</sup>	77.3 <sup>b</sup>	1.91 <sup>ab</sup>	30 <sup>a</sup>
ABI Balster	N1	106 <sup>a</sup>	1.47 <sup>a</sup>	35.5 <sup>a</sup>	81 <sup>ab</sup>	-	26.5 <sup>a</sup>	104 <sup>a</sup>	1.85 <sup>a</sup>	31.6 <sup>a</sup>	77.0 <sup>b</sup>	1.95 <sup>ab</sup>	28.6 <sup>a</sup>
	N2	108 <sup>ac</sup>	1.55 <sup>a</sup>	34.7 <sup>a</sup>	82 <sup>b</sup>	-	25.6 <sup>a</sup>	105 <sup>a</sup>	1.62 <sup>a</sup>	33.7 <sup>a</sup>	78.7 <sup>b</sup>	2.01 <sup>ab</sup>	27.9 <sup>a</sup>
Q. Carisma	N1	110 <sup>bc</sup>	1.57 <sup>a</sup>	32.0 <sup>a</sup>	79 <sup>a</sup>	-	25.4 <sup>a</sup>	104 <sup>a</sup>	1.74 <sup>a</sup>	32.5 <sup>a</sup>	71.0 <sup>a</sup>	2.05 <sup>ab</sup>	28.4 <sup>a</sup>
	N2	110 <sup>bc</sup>	1.51 <sup>a</sup>	33.3 <sup>a</sup>	79 <sup>ab</sup>	-	25.6 <sup>a</sup>	104 <sup>a</sup>	1.64 <sup>a</sup>	33.3 <sup>a</sup>	72.0 <sup>a</sup>	1.83 <sup>a</sup>	30.8 <sup>a</sup>
Scrabble	N1	108 <sup>ac</sup>	1.62 <sup>a</sup>	33.8 <sup>a</sup>	81 <sup>ab</sup>	-	28.0 <sup>a</sup>	105 <sup>a</sup>	1.78 <sup>a</sup>	35.1 <sup>a</sup>	76.0 <sup>b</sup>	2.11 <sup>b</sup>	29.8 <sup>a</sup>
	N2	111 <sup>c</sup>	1.66 <sup>a</sup>	33 <sup>a</sup>	82 <sup>b</sup>	-	29.6 <sup>a</sup>	105 <sup>a</sup>	1.74 <sup>a</sup>	35.0 <sup>a</sup>	77.0 <sup>b</sup>	2.00 <sup>ab</sup>	30.7 <sup>a</sup>
	C	***	ns	*	**		ns	ns	ns	*	***	ns	*
	N	**	ns	ns	*		ns	ns	**	ns	**	**	*
	C*N	*	ns	ns	ns		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

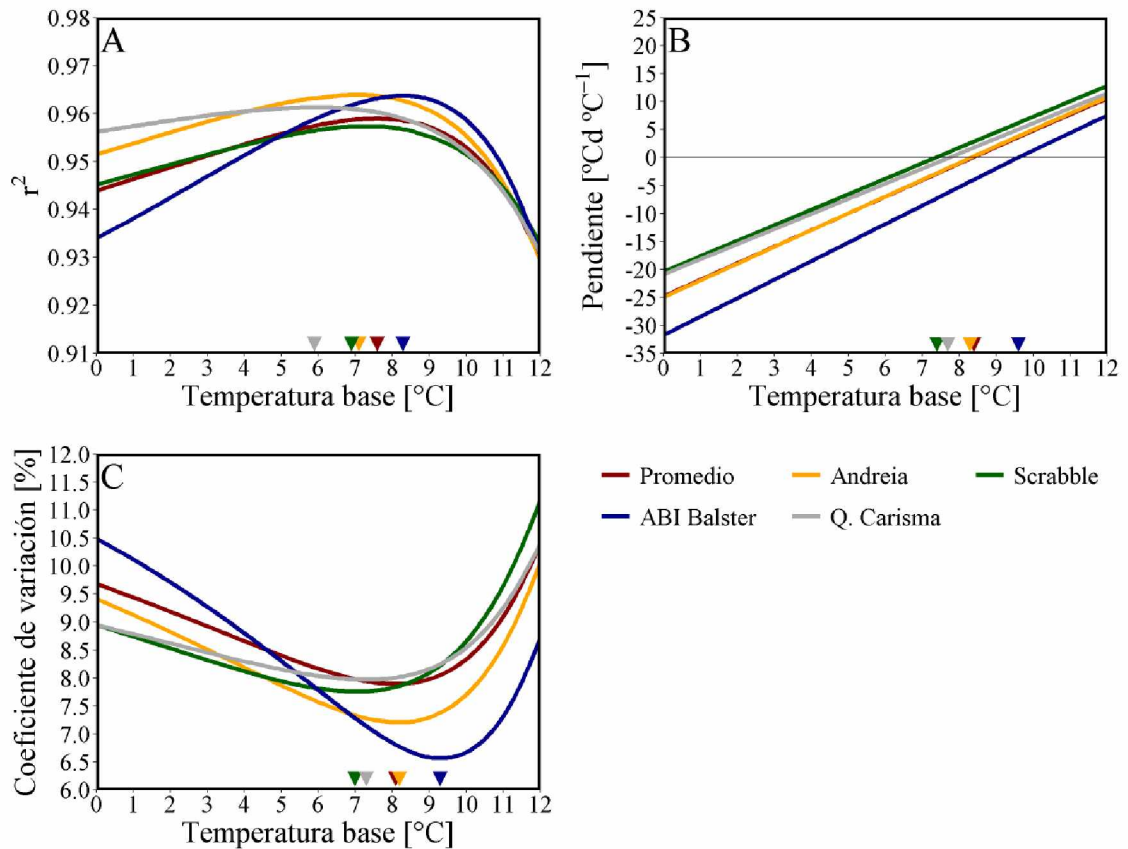
\* p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.005; ns: no significativo

### 2.3.2 Estimaciones de temperatura base

Considerando todos los métodos y cultivares, la temperatura base de desarrollo varió entre 5.9 y 9.6 °C (**Cuadro 2.6**). Promediando los métodos de estimación, la temperatura base fue de 7.0 °C para Q. Carisma, 7.1 °C para Scrabble, 8.0 °C para Andreia y 9.2 °C para ABI Balster, mientras que el tiempo térmico entre polinización y madurez fisiológica fue de 377, 409, 363 y 319 °Cd, respectivamente. ABI Balster, seguido de Andreia, presentó la temperatura base más alta independientemente del método utilizado para su estimación (**Cuadro 2.6**). La discrepancia más alta entre métodos con respecto a las estimaciones de temperatura base fue de 1.8 °C para Q. Carisma, y menores a 1.5 °C para el resto de los cultivares (**Cuadro 2.6**). Cuando la temperatura base se fijó arbitrariamente en cero, Q. Carisma tuvo el tiempo térmico más bajo requerido para completar el llenado de granos (*i.e.* el llenado de grano más corto), seguido por ABI Balster, Andreia y Scrabble, respectivamente. Cuando se agruparon los datos de los cuatro cultivares, las estimaciones de temperatura base oscilaron entre 7.6 y 8.8 °C y fueron similares a la media de las estimaciones de los cultivares para cada método (la diferencia siempre fue inferior a 0.55 °C; **Cuadro 2.6**).

**Cuadro 2.6.** Estimaciones de temperatura base obtenidas a través de diferentes métodos para los cuatro cultivares de cebada, individualmente y agrupados. Entre paréntesis se muestra el requerimiento de tiempo térmico para el llenado de granos. P0: Pendiente cero; MCV: Menor coeficiente de variación; MCV<sub>op</sub>: Menor coeficiente de variación considerando una temperatura óptima; X-int<sub>d</sub>: Intercepción del eje x de la tasa de desarrollo.

Método	Cultivar				
	Andreia	Scrabble	ABI Balster	Q. Carisma	Todos
Cero	0.0 (617)	0.0 (642)	0.0 (612)	0.0 (592)	0.0 (616)
Lineal-plateau	7.1 (389)	6.9 (410)	8.3 (338)	5.9 (404)	7.6 (365)
P0	8.3 (356)	7.4 (400)	9.6 (310)	7.7 (360)	8.4 (352)
MCV	8.2 (359)	7.0 (413)	9.3 (320)	7.3 (372)	8.1 (361)
MCV <sub>op</sub>	8.5 (347)	7.0 (413)	9.6 (308)	7.3 (372)	8.4 (350)
X-int <sub>d</sub>	-	-	-	-	8.8 (335)



**Figura 2.1.** Coeficiente de determinación del ajuste bilineal entre el peso seco relativo del grano y el tiempo térmico (A), pendiente de la relación entre la duración del llenado del grano en grados-día y la temperatura media (B), y coeficiente de variación de la duración del llenado del grano en grados-día (C) en función de la temperatura base empleada en el cálculo de los grados-día, para cada cultivar individualmente y todos ellos agrupados. Las flechas indican en el eje correspondiente la mejor temperatura base de acuerdo con cada método.

La variación en el  $r^2$  de la regresión lineal-*plateau* que describe la acumulación de peso seco del grano en función del tiempo térmico desde antesis, fue relativamente pequeña (*ca.* 0.03) para un amplio rango de temperaturas base candidatas para todos los cultivares (**Figura 2.1A**). Sin embargo, el ajuste fue máximo cuando se seleccionó una temperatura base específica, tanto al considerar los cultivares separados como al agruparlos (**Figura 2.1A**, **Cuadro 2.6**). El valor de  $r^2$  fue superior a 0.92 para todos los cultivares y temperaturas base. Las temperaturas base supra-óptimas disminuyeron el  $r^2$  a una tasa mayor que las sub-óptimas (**Figura 2.1A**). Este método proporcionó las estimaciones de temperatura base más bajas para todos los cultivares (**Cuadro 2.6**).

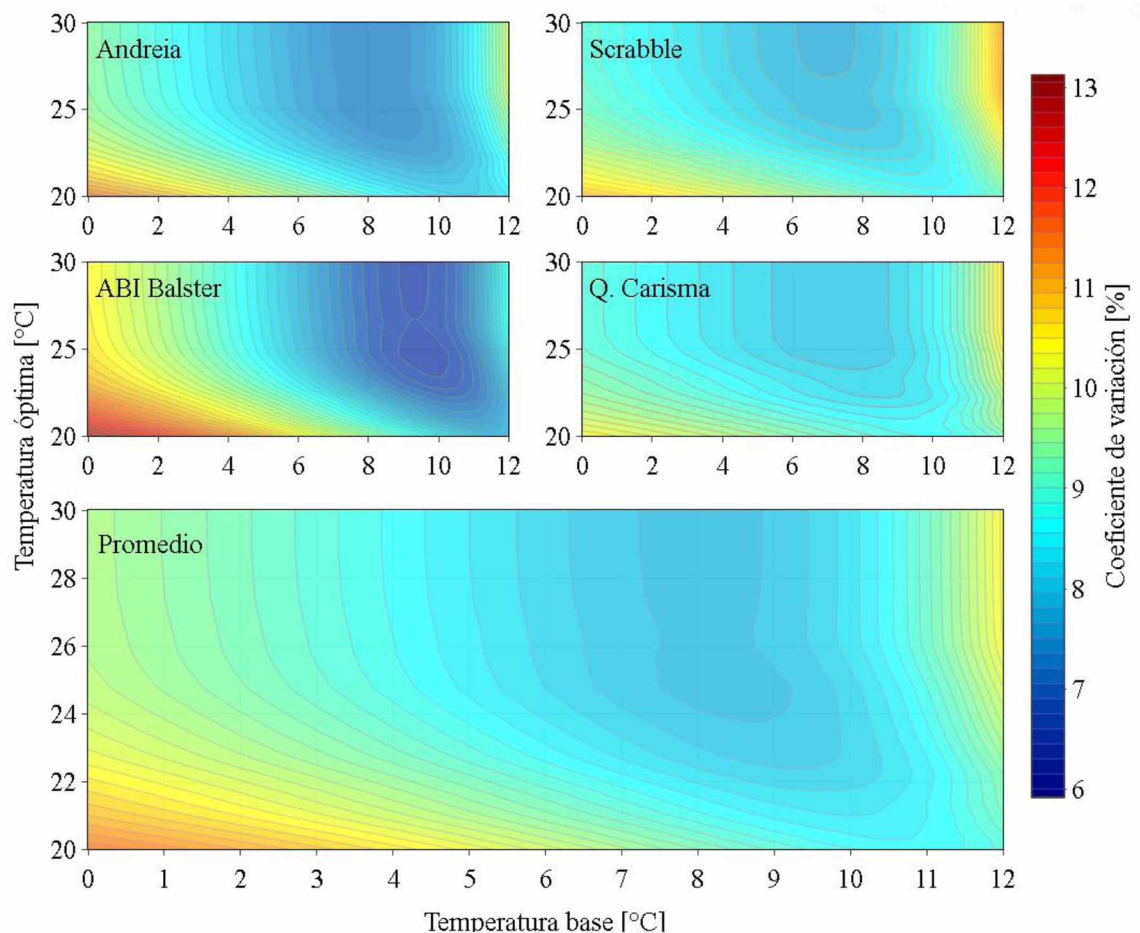
La pendiente de la relación lineal entre tiempo térmico y temperatura media se graficó en función de la temperatura base para cada cultivar (**Figura 2.1B**). La independencia entre tiempo térmico y temperatura media (*i.e.* la pendiente es cero) se logró seleccionando una temperatura base específica para cada cultivar. Por otro lado, las temperaturas base más altas y bajas produjeron pendientes positivas y negativas, respectivamente (**Figura 2.1B**).

El método de menor variabilidad también dio como resultado un único valor de temperatura base que minimizó el coeficiente de variación de la duración del llenado de grano para cada cultivar (**Figura 2.1C**). Las temperaturas base supra-óptimas aumentaron la variabilidad a una tasa más alta que las sub-óptimas (**Figura 2.1C**). ABI Balster y Andreia mostraron menos variabilidad que los otros cultivares (**Figura 2.1C**).

Cuando se consideró una temperatura óptima para el cálculo de grados por día, las estimaciones de temperatura base fueron ligeramente más altas, mientras que el coeficiente de variación disminuyó para todos los cultivares, excepto Scrabble, que permaneció sin cambios (**Figura 2.2, Cuadro 2.6**). Temperaturas óptimas de 24.8, 25.8, 24.7 y 28.8 °C minimizaron el coeficiente de variación para Andreia, ABI Balster, Q. Carisma y Scrabble, respectivamente. Cuando se consideraron temperaturas óptimas más altas, el coeficiente de variación no cambió para el cultivar Scrabble, mientras que aumentó para Andreia, ABI Balster y Q. Carisma. Cuando todos los cultivares se agruparon, la temperatura óptima seleccionada fue de 24.8 °C (**Figura 2.2**). Combinaciones de bajas temperaturas base y óptima dieron como resultado la mayor variabilidad observada en todos los casos (**Figura 2.2**).

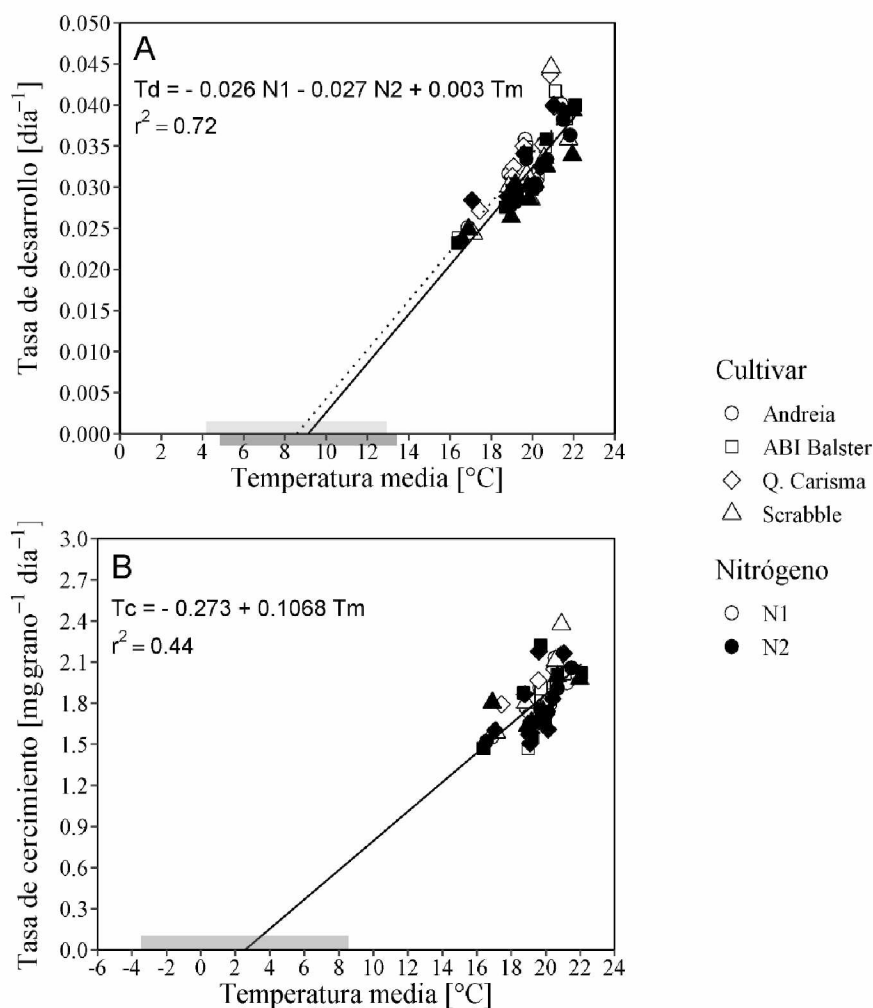
Se requirió extrapolación para obtener la intersección del eje x de la regresión lineal entre la tasa de desarrollo y la temperatura (**Figura 2.3A**). La temperatura media tuvo una asociación lineal positiva con la variable dependiente ( $p < 0.001$ ). No se encontró

un efecto significativo del cultivar. Por otro lado, la disponibilidad de nitrógeno afectó significativamente la ordenada al origen ( $-0.026 \text{ día}^{-1}$  para N1 y  $-0.027 \text{ día}^{-1}$  para N2;  $p < 0.05$ , **Figura 2.3A**). Sin embargo, el gran error introducido como consecuencia de la extrapolación resultó en diferencias no significativas entre los tratamientos de nitrógeno con respecto a la intersección del eje x; por lo tanto, ambas estimaciones se promediaron para obtener una única temperatura base, común a todos los cultivares y condiciones nutricionales (**Figura 2.3A**, **Cuadro 2.6**). El intervalo de confianza ( $p < 0.05$ ) de ambas estimaciones de temperatura base fue de *ca.*  $\pm 4 \text{ °C}$ , y ambas fueron estadísticamente diferentes de cero ( $p < 0.001$ ).



**Figura 2.2.** Coeficiente de variación de la duración del llenado de granos en tiempo térmico en función de la temperatura base (0 a 12 °C) y la temperatura óptima (20 a 30 °C) empleadas para el cálculo de los grados-día, para cada cultivar individualmente, y su promedio.

La intersección del eje x de la regresión lineal entre la tasa de crecimiento y la temperatura media fue el único método utilizado en el presente estudio para estimar la temperatura base y el requerimiento de tiempo térmico para el crecimiento del grano de cebada (**Figura 2.3B**). La temperatura media tuvo una asociación lineal positiva con la tasa de crecimiento ( $p < 0.001$ ). No se encontraron efectos significativos del nitrógeno ni del cultivar (**Figura 2.3B**). La tasa de crecimiento en grados-día fue de  $0.107 \text{ mg } ^\circ\text{Cd}^{-1}$ ,



**Figura 2.3.** A: Regresión lineal entre la tasa de desarrollo y la temperatura media de la fase de llenado de granos. Las líneas de regresión punteadas y sólidas corresponden a los tratamientos de disponibilidad de nitrógeno baja (N1) y alta (N2), respectivamente. Las barras de color gris claro y gris oscuro muestran los intervalos de confianza (95%) de las estimaciones de temperatura base correspondientes a los tratamientos con baja y alta disponibilidad de nitrógeno, respectivamente. B: Regresión lineal entre la tasa de crecimiento y la temperatura media de la fase de llenado del grano. La barra gris muestra el intervalo de confianza (95%) de la estimación de la temperatura base.



equivalente a un requerimiento térmico de  $9.35 \text{ }^\circ\text{Cd mg}^{-1}$  acumulado por encima de una temperatura base de  $2.5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

La intersección con el eje x presentó un intervalo de confianza de *ca.*  $\pm 6 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $p < 0.05$ ) y, en consecuencia, no fue estadísticamente diferente de cero (**Figura 2.3B**). La tasa de desarrollo y la tasa de crecimiento presentaron un grado de correlación alto ( $r > 0.8$ ,  $p < 0.001$ ).

### 2.3.3 Desempeño de los modelos y validación

Todos los métodos describieron con éxito la variabilidad observada en la tasa de desarrollo entre siembras, presentando pequeñas diferencias en ambos indicadores de desempeño ( $d_r$  y RECM, **Cuadro 2.7**). El RECM siempre fue menor a 3.5 días, con valores similares para los cuatro cultivares, mientras que el  $d_r$  varió entre 0.65 y 0.81, con ABI Balster y Q. Carisma teniendo el mejor y el peor ajuste para todos los métodos de estimación, respectivamente (**Cuadro 2.7**).

Al considerar cada cultivar individualmente, el índice de concordancia de Willmott ( $d_r$ ) varió muy poco, motivo por el cual se utilizó el RECM para hacer comparaciones entre los métodos. Seleccionar cero arbitrariamente como temperatura base produjo las predicciones menos precisas de la duración del llenado de granos para todos los cultivares, excepto Scrabble, para el cual solo el método de intersección del eje x fue peor (**Cuadro 2.7**). El método de mejor ajuste varió según el cultivar considerado. Con la excepción del método de intersección del eje x, en los cultivares Andreia y Q. Carisma todos los métodos presentaron un ajuste casi idéntico (**Cuadro 2.7**). Por otro lado, los métodos que mostraron la mejor concordancia con las observaciones para los cultivares Scrabble y ABI Balster fueron el de pendiente cero y el de mínima variabilidad considerando una temperatura óptima, respectivamente (**Cuadro 2.7**). Incluir una temperatura óptima en el cálculo de los grados-día mejoró el ajuste del modelo solo para

ABI Balster, mientras que para Andreia y Q. Carisma permaneció prácticamente inalterado, y disminuyó ligeramente para Scrabble (**Cuadro 2.7**). Considerando todos los cultivares agrupados, el método de pendiente cero permitió estimar la temperatura base y el tiempo térmico que resultaron en las predicciones más precisas, con el menor RECM y un  $d_r$  más alto (**Cuadro 2.7**).

**Cuadro 2.7.** Raíz del error cuadrático medio (RECM) e índice de concordancia de Willmott ( $d_r$ ) para modelos de tiempo térmico de desarrollo ajustados a través de diferentes métodos, para todos los cultivares, individualmente y agrupados. P0: Pendiente cero, MCV: Menor coeficiente de variación, MCV<sub>op</sub>: Menor coeficiente de variación considerando una temperatura óptima, X-int<sub>d</sub>: Intercepción del eje x de la tasa de desarrollo.

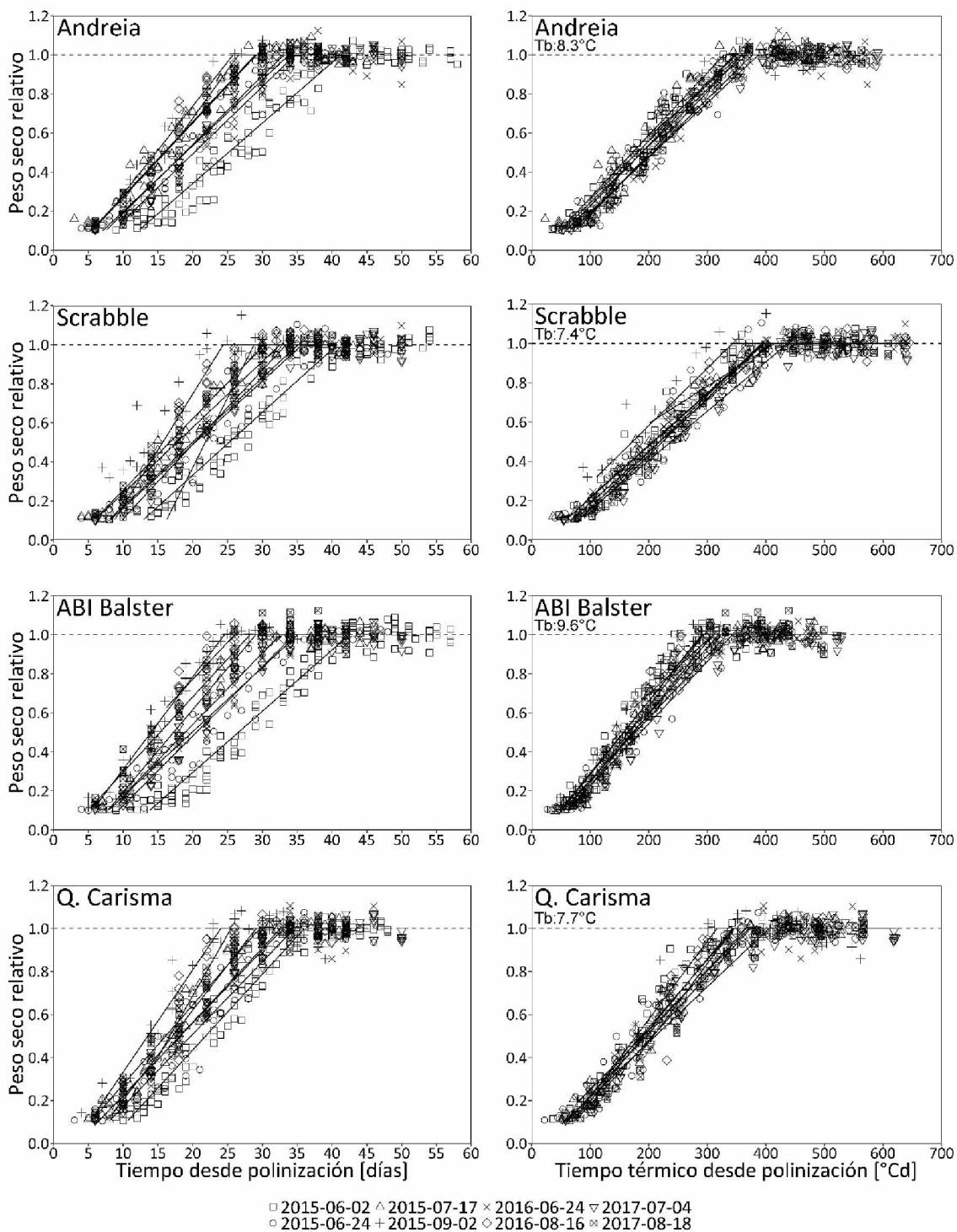
Método	Cultivar									
	Andreia		Scrabble		ABI Balster		Q. Carisma		Todos	
	RECM	$d_r$	RECM	$d_r$	RECM	$d_r$	RECM	$d_r$	RECM	$d_r$
Cero	2.71	0.72	2.70	0.73	3.16	0.71	2.88	0.65	3.01	0.69
lineal-plateau	2.30	0.77	2.48	0.74	2.69	0.78	2.56	0.69	2.81	0.71
P0	2.26	0.77	2.44	0.74	2.32	0.81	2.57	0.69	2.48	0.75
MCV	2.26	0.77	2.47	0.74	2.33	0.81	2.57	0.69	2.49	0.75
MCV <sub>op</sub>	2.27	0.77	2.47	0.74	2.29	0.81	2.57	0.69	2.53	0.75
X-int <sub>d</sub>	2.48	0.75	3.20	0.65	2.44	0.80	2.66	0.68	2.71	0.73

La estimación de temperatura base y requerimiento de tiempo térmico obtenida a través del método con mejor ajuste para cada cultivar se empleó para describir el peso seco relativo del grano en función del tiempo térmico, reduciendo con éxito la variabilidad entre siembras tanto en el desarrollo como en el crecimiento del grano (**Figura 2.4**).

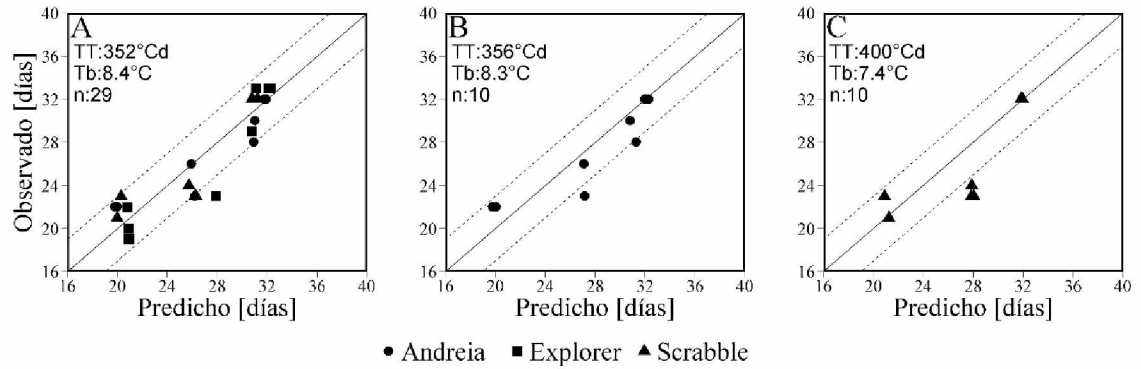
La temperatura base y el requerimiento térmico estimado a través del método de mejor ajuste para el grupo de cultivares (pendiente cero) fueron validados contra datos independientes de distintas fechas de siembra y campañas (**Figura 2.5A**). Los datos incluyeron dos de los cultivares empleados para ajustar el modelo (Andreia y Scrabble) y un tercero (Explorer) no evaluado en el presente trabajo. Este modelo mostró predicciones precisas para todos los cultivares, con un RECM de 1.9 días y un  $d_r$  de 0.83 (**Figura 2.5A**). Los datos de Andreia y Scrabble también se utilizaron para validar los modelos

cultivar-específicos que presentaron el mejor. RECM fue de 2 días para Andreia y 2.6 días para Scrabble, mientras que el  $d_r$  fue de 0.81 y 0.83, respectivamente. (**Figura 2.5B, C**). El modelo de aplicación amplia presentó el 97% de las predicciones dentro de una desviación de 3 días de los valores observados correspondientes (**Figura 2.5A**), mientras que los modelos para Andreia y Scrabble mostraron 90% y 70% de las predicciones dentro del mismo rango, respectivamente (**Figura 2.5**).

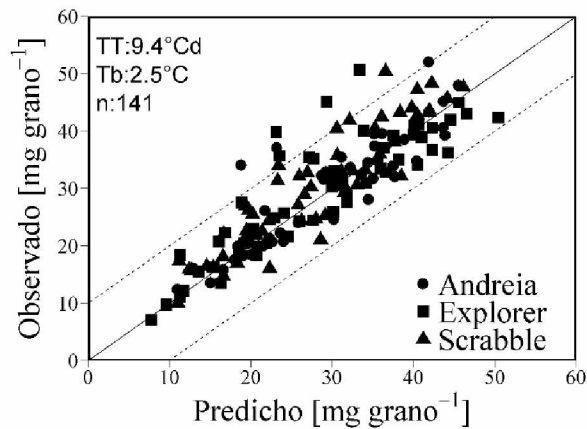
El modelo de tiempo térmico para el crecimiento del grano se validó con los datos de los mismos experimentos independientes utilizados para la validación del modelo de desarrollo. El modelo predijo con éxito el crecimiento de grano con un RECM de  $4.8 \text{ mg grano}^{-1}$ , un  $d_r$  de 0.80 y menos del 5% de las predicciones más allá de una desviación de  $10 \text{ mg grano}^{-1}$ . El modelo tiende a subestimar, aunque solo en seis datos, el crecimiento de grano para pesos de grano superiores a 30 mg (**Figura 2.6**).



**Figura 2.4.** Peso seco relativo del grano en función del tiempo (izquierda) y del tiempo térmico (derecha) desde la polinización para cada uno de los cuatro cultivares empleados en el presente estudio. La línea horizontal discontinua indica el peso relativo máximo. Las líneas continuas muestran ajustes bilineales para cada una de las fechas de siembra. La temperatura base se estimó mediante el método del pendiente cero para Andreia, Scrabble y Q. Carisma, y mediante el método de menor variabilidad considerando una temperatura óptima para ABI Balster.



**Figura 2.5.** Relación entre la duración de llenado de grano predicha y observada para el modelo de aplicación amplia de cebada (A) y los modelos específicos para los cultivares Andreaia (B) y Scrabble (C). La línea continua muestra la relación 1:1 y las líneas discontinuas indican un desvío de 3 días.



**Figura 2.6** Relación entre el peso de grano predicho y observado. La línea continua muestra la relación 1:1 y las líneas discontinuas indican un desvío de 10 mg grano<sup>-1</sup>.

## 2.4 Discusión

Comprender cómo los atributos del grano que afectan la calidad maltera son moldeados por el ambiente explorado por la planta madre durante el período de formación de los granos, requiere de un modelo de tiempo térmico preciso, capaz de describir el desarrollo del grano en una amplia gama de condiciones ambientales. A pesar de la importancia de seleccionar una temperatura base adecuada en la aplicación de dichos modelos, las estimaciones de este parámetro para la fase de llenado de granos en cebada son escasas en la literatura (Sadras y Dreccer, 2015). El presente estudio se realizó con el

objetivo de estimar la temperatura base y el requerimiento de tiempo térmico entre polinización y madurez fisiológica para el desarrollo del grano en cebada, con el fin de formular modelos fenológicos robustos. Además, dado que los fenómenos de desarrollo y crecimiento generalmente se confunden al evaluar el llenado de grano en la cebada, se estimó la temperatura base para el crecimiento del grano. Este último aspecto, *i.e.* temperatura base para el crecimiento del grano, es inédito ya que no se ha publicado con anterioridad en la literatura.

Para abarcar una amplia gama de ambientes térmicos durante la fase de llenado de granos, se sembraron cuatro cultivares comerciales de cebada cervecera en diferentes fechas entre 2015 y 2017. Las condiciones meteorológicas contrastantes entre las distintas fechas de siembra y años dieron como resultado una amplia gama de temperaturas exploradas por los cultivos durante el llenado de granos (**Cuadro 2.2**). La variabilidad lograda en la duración del llenado de granos y la tasa de crecimiento del grano coincidió con los valores reportados en estudios previos (**Cuadros 2.4 y 2.5**; García Del Moral *et al.*, 1991; Ho y Jui, 1989; Metzger *et al.*, 1984; Rasmusson *et al.*, 1979; Riggs y Gothard, 1976; Scott *et al.*, 1983).

La temperatura base para el desarrollo del grano se estimó a través de distintos métodos, tal como fue descrito en la sección de 2.3.2 del presente capítulo. Los cuatro cultivares presentaron temperaturas base relativamente similares, independientemente del método considerado (**Cuadro 2.6**). Las pocas estimaciones de temperatura base de desarrollo durante el llenado de granos reportadas para cebada (Gallagher *et al.*, 1983; Goyne *et al.*, 1996; Gualano y Benez-Arnold, 2009a; Rodríguez *et al.*, 2001) informaron valores de entre 3.4 y 7.1 °C, mientras que las temperaturas base calculadas en la presente tesis oscilaron entre 5.9 y 9.6 °C, dependiendo del cultivar y el método de estimación utilizado (**Cuadro 2.6**). A pesar del hecho de que no se encontró un efecto significativo

del cultivar cuando la estimación se realizó con el método de intercepción del eje x, se pudieron observar algunas diferencias entre los genotipos. Los cultivares ABI Balster y Andreia presentaron la temperatura base más alta sin importar el método de estimación utilizado, mientras que Scrabble y Q. Carisma mostraron valores comparativamente más bajos (**Cuadro 2.6**). Diferencias entre cultivares con respecto a la temperatura base para el desarrollo del grano se han informado previamente para cebada (Gualano y Benech-Arnold, 2009a) y trigo (Porter y Gawith, 1999; Slafer y Rawson, 1995a). Por lo tanto, los modelos específicos de cultivar deben usarse siempre que estén disponibles.

El final del llenado de granos (*i.e.* la madurez fisiológica) es más difícil de cuantificar que los eventos de desarrollo visual como la aparición de las hojas o la espigazón (Ritchie y NeSmith, 1991). A pesar de esto, los bajos RECM y elevados  $d_r$  sugieren que todos los métodos considerados en el presente estudio funcionan relativamente bien (**Cuadro 2.7**). De todas formas, cada método presenta ventajas y limitaciones distintas, y permite obtener diferentes conclusiones.

El método lineal-*plateau* proporcionó las estimaciones de temperatura base más bajas para todos los cultivares, ya sea individualmente o agrupados (**Cuadro 2.6**), posiblemente debido al hecho de que en este método se subestima la temperatura base. Dicho sesgo podría ser consecuencia de incluir directamente la acumulación de materia seca (*i.e.* un proceso de crecimiento) en la estimación. Los valores estimados para los cultivares Q. Carisma, Andreia y Scrabble fueron similares a las reportadas en otros estudios que utilizaron este mismo método (**Cuadro 2.6**; Gualano *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2001).

Según el método de menor variabilidad y el método lineal-*plateau*, emplear una temperatura base superior a la real es peor que subestimarla (**Figura 2.1**). No se puede llegar a la misma conclusión al considerar el método de pendiente cero, ya que el error en

el requerimiento de tiempo térmico de la fase cambia de manera constante dentro del rango de temperaturas base estudiadas (**Figura 2.1**). Sin embargo, subestimar la temperatura base puede aumentar el error en la predicción de la duración del llenado de granos si se combina con bajas temperaturas óptimas (*ca.* 20 °C; **Figura 2.2**).

Es ampliamente aceptado que la duración del llenado de granos para cultivos templados que crecen libres de estrés terminales, como sequía o golpes de calor, depende principalmente de la temperatura, y que esta respuesta es en gran medida independiente de la relación fuente-destino (Sofield *et al.*, 1977; Wardlaw *et al.*, 1980). Sin embargo, cuando se empleó el método de la intersección del eje x, una alta disponibilidad de nitrógeno resultó en una disminución significativa en la tasa de desarrollo (*i.e.* mayor duración del llenado del granos; **Figura 2.3A**). Tal efecto no fue impulsado por un cambio en la fecha de polinización, ya que el tiempo a floración se vio solo ligeramente afectado por la disponibilidad de nitrógeno, en línea con lo que ha sido previamente publicado en la literatura (Hall *et al.*, 2014; **Cuadro 2.5**). Sin embargo, bajo condiciones de producción de alto rendimiento, como las logradas con los experimentos llevados a cabo en esta tesis con riego suplementario, la disponibilidad de nitrógeno podría estar afectando la acumulación de materia seca y, de manera indirecta, la duración del llenado de granos (Manderscheid *et al.*, 2009). Este puede ser el caso de aquellas siembras en las cuales se detectó un leve efecto de nitrógeno sobre la duración del llenado de granos (**Cuadro 2.5**). Aun así, el efecto del nitrógeno en la tasa de desarrollo no resultó en diferencias significativas con respecto a la temperatura base ni al requerimiento de tiempo térmico para el desarrollo o crecimiento del grano (**Figura 2.3**). Por lo tanto, los efectos del nitrógeno en la duración del llenado y el crecimiento del grano, aunque significativos en algunos casos, pueden considerarse insignificantes en el rango de condiciones agronómicas explorado en la presente tesis.



Una de las principales limitaciones del presente trabajo, asociada con el método de intersección del eje x, está relacionada con la falta de datos en el rango de temperatura cercano a la base, lo que aumenta sustancialmente el error en la estimación (**Figura 2.3**). Este problema ha sido señalado previamente por diferentes autores trabajando con otros cultivos (Sharratt, 1999; Sharratt *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1995; Zapata *et al.*, 2015), y generalmente está asociado a experimentos a campo, ya que en estas condiciones la mayoría de los cultivos suele explorar temperaturas muy por encima de la base, independientemente de la fase ontogénica considerada. Por otro lado, las estimaciones realizadas con datos obtenidos de experimentos realizados en condiciones controladas (*i.e.* cámaras de crecimiento) permiten trabajar con temperaturas más cercanas a la base, con lo cual serían un complemento adecuado en este tipo de ensayos, y permitirían validar las estimaciones realizadas en la presente tesis.

Para todos los cultivares y métodos, la temperatura base de desarrollo fue mayor a cero (**Cuadro 2.6**). Sin embargo, varios estudios que utilizan modelos de tiempo térmico para modelar el desarrollo del grano asumen que la temperatura base es cero (Dofing, 1997; Frank y Bauer, 1995; Kennedy *et al.*, 2017; Paynter y Young, 2000; Voltas *et al.*, 1999). Esta suposición se basa principalmente en el hecho de que otros procesos fisiológicos, como la aparición de hojas y/o la duración de las fases anteriores a espigazón, pueden predecirse bien con un modelo de tiempo térmico utilizando una temperatura base de cero (Cao y Moss, 1989; Gallagher, 1979). Sin embargo, se sabe que la temperatura base del desarrollo se incrementa a medida que la fenología de trigo avanza desde la emergencia hasta la madurez fisiológica (Angus *et al.*, 1981; Del Pozo *et al.*, 1987; Shewry y Darlington, 2002; Slafer y Savin, 1991). Asimismo, la hipótesis de que diferentes procesos de desarrollo tienen temperaturas cardinales comunes fue refutada

para otros cultivos (Ellis *et al.*, 1993; Slafer y Rawson, 1995b). Por lo tanto, asumir arbitrariamente que existe una única temperatura base para cebada puede ser erróneo.

Tres de los cuatro cultivares evaluados en este trabajo de investigación presentaron una temperatura óptima cercana a los 25 °C, mientras que para el cuarto (Scrabble) no se encontró una temperatura óptima en el rango de 20 a 30 °C, probablemente debido a la falta de exposición a temperaturas cercanas al límite superior de dicho rango (**Figura 2.2**). Una variación genotípica similar en la temperatura óptima de desarrollo para las fases previas a la espigazón fue encontrada en cebada (Ellis *et al.*, 1988) y para el llenado de granos en trigo (Slafer y Rawson, 1995a). Las temperaturas óptimas encontradas en este trabajo de investigación son similares a las reportadas para el llenado de granos en trigo (Porter y Gawith, 1999; Slafer y Rawson, 1995a), ya que son cercanas al valor de 28 °C encontrados para cebada en las fases previas a la espigazón (Ellis *et al.*, 1988). Si bien la inclusión de la temperatura óptima en el cálculo del tiempo térmico redujo el coeficiente de variación de la duración del llenado de granos para tres cultivares, solo mejoró el ajuste del modelo (medido como RECM y  $d_r$ ) para uno de ellos (ABI Balster; **Figura 2.2**, **Cuadro 2.7**). La temperatura óptima podría ser más relevante para el modelo de tiempo térmico si se consideran los cultivos que crecen en regiones más cálidas.

El método de pendiente cero fue el mejor enfoque para estimar la temperatura base y el requerimiento de tiempo térmico entre polinización y madurez fisiológica cuando todos los cultivares se evaluaron juntos (**Cuadro 2.7**); De esta forma, un requerimiento de tiempo térmico de 352 °Cd acumulado por encima de una temperatura base de 8.4 °C podría usarse para describir el desarrollo del grano en cebada en aquellos casos en que estos parámetros no estén disponibles para un cultivar específico. El método de menor variabilidad, independientemente de si se consideró una temperatura óptima para el

cálculo de los grados-día, también funcionó bien en las condiciones exploradas en estos experimentos (**Cuadro 2.7**).

La estimación de la intersección con el eje x de una regresión lineal entre la tasa de crecimiento y la temperatura media fue el único método empleado en el presente estudio para evaluar la temperatura base para el crecimiento del grano. Hasta donde sabemos, no hay intentos de estimación de la tasa de crecimiento del grano en tiempo térmico para cebada a través de este método en la literatura científica; de hecho, normalmente se usa la pendiente de la relación entre materia seca del grano y el tiempo térmico desde anthesis (Le Gouis, 1993; Passarella *et al.*, 2002; Paynter y Young, 2000). La temperatura base para el crecimiento del grano no fue significativamente diferente de cero (**Figura 2.3**). El  $r^2$  de la regresión (0.44) y la falta de un efecto significativo del cultivar y de la disponibilidad del nitrógeno, sugieren que otros factores además de los considerados en el presente estudio pueden estar afectando la tasa de crecimiento del grano. El uso de fechas de siembra contrastantes para generar variabilidad térmica durante el llenado de granos, si bien ampliamente utilizado en la bibliografía, es un método que resulta indefectiblemente en variaciones en otros factores ambientales, más allá de la temperatura. Dichos factores podrían explicar parcialmente de los resultados observados. Sofield *et al.* (1977) demostraron que la temperatura y la radiación tienen un efecto significativo en la tasa de crecimiento del grano en trigo, mientras que la duración del llenado depende solo de la temperatura. Similares resultados fueron encontrados en cebada (Gallagher *et al.*, 1983; Kennedy *et al.*, 2018) y en otros cultivos (Fenner, 1992). Esto, junto con el error debido a la extrapolación, podría explicar las diferencias observadas entre las temperaturas base para el crecimiento y el desarrollo del grano. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que procesos simultáneos de crecimiento y desarrollo pueden presentar diferentes temperaturas cardinales, como lo reportaron Slafer y Rawson

(1995b) al comparar la tasa de elongación de tallo con la tasa de aparición de hojas. Por otro lado, es importante destacar que muchos trabajos publicados en la literatura en condiciones de campo (*i.e.* con estructura de canopeo) demuestran que tanto trigo como cebada no presentan limitaciones de fuente durante el llenado de los granos (Álvarez Prado *et al.*, 2017; Borrás *et al.*, 2004). A pesar del error en la estimación, el modelo predijo con éxito el crecimiento del grano cuando se validó contra datos independientes de los cultivares Andreia y Scrabble, más un tercero (Explorer) no utilizado en el ajuste del modelo (**Figura 2.6**). La fuerte correlación negativa entre la tasa de crecimiento de grano y la duración del llenado de granos encontrada aquí ha sido previamente reportada para cebada (Ho y Jui, 1989; Le Gouis, 1993).

## **2.5 Conclusión**

Se desarrollaron cuatro modelos para describir el desarrollo del grano de cebada para cultivares específicos, y un modelo de aplicación amplia. Dos de los modelos específicos y el modelo general fueron validados con datos independientes. Estos modelos son simples, precisos y de fácil aplicación por parte de investigadores e industriales para evaluar el efecto del ambiente explorado por la planta madre en la calidad maltera del grano. Se pueden encontrar aplicaciones adicionales para estos modelos de fenología, como predecir el momento de madurez fisiológica y, de esta manera, el tiempo a cosecha.

**Capítulo 3: Determinación de ventanas  
de sensibilidad a la temperatura  
durante el llenado de los granos, para  
la definición de la susceptibilidad al  
brotado precosecha en cebada  
cervecera**



### **CAPÍTULO 3**

#### **Determinación de ventanas de sensibilidad a la temperatura durante el llenado de los granos, para la definición de la susceptibilidad a brotado precosecha en cebada cervecera**

##### **Resumen**

Tanto el brotado precosecha como el pregerminado traen aparejada una serie de consecuencias negativas en la calidad del grano de cebada cervecera, que dificultan el cumplimiento de los requisitos mínimos indispensables para su adecuado procesamiento industrial. El nivel de dormición que presentan los granos previo a la cosecha está inversamente relacionado con la susceptibilidad del cultivo a sufrir dichas adversidades. Con el objetivo de determinar de qué manera los factores ambientales durante el llenado de granos afectan la tasa de salida de la dormición, cuatro cultivares comerciales se sembraron en nueve fechas escalonadas a lo largo de cuatro campañas, y bajo dos disponibilidades de nitrógeno contrastantes. El llenado de granos fue dividido en intervalos arbitrarios de tiempo térmico, para luego realizarse análisis de correlación entre la temperatura media explorada durante dichos intervalos y el índice de germinación cercano a cosecha (estimador de la susceptibilidad a brotado precosecha). Tres de los cuatro cultivares presentaron un intervalo con una correlación significativa (i.e. una ventana de sensibilidad). Para uno de los cultivares la ventana de sensibilidad estuvo ubicada justo antes de la madurez fisiológica, en forma consistente con otros reportes en la literatura. Los otros dos cultivares, en cambio, presentaron una ventana de sensibilidad en algún momento en la primera mitad del llenado de granos, sugiriendo que un proceso fisiológico distinto al que estaría detrás del control de la dormición en el resto de los cultivares evaluados está involucrado en la determinación de la dinámica de salida de la dormición luego de la madurez fisiológica. El aumento en la disponibilidad de nitrógeno,

si bien no afectó la ubicación relativa de las ventanas de sensibilidad, aumentó el nivel de dormición luego de la madurez fisiológica, disminuyendo la susceptibilidad al brotado precosecha. Las implicancias del efecto del genotipo sobre estas variables son discutidas. Los modelos cuantitativos aquí presentados abren la puerta a nuevos interrogantes, a la vez que representan una oportunidad de mejora de la calidad comercial mediante practicas comunes a campo, como lo son el manejo de la fertilización nitrogenada, o el secado y la cosecha anticipada del cultivo en caso de riesgo de brotado.



### 3.1 Introducción

El malteado es un proceso biológico en el cual la germinación de los granos ocupa un rol central. La dormición es un atributo interno de la semilla que impide su germinación en condiciones hídricas, térmicas y gaseosas que de otro modo serían permisivas (Benech-Arnold *et al.*, 2000). En cebada, la dormición se impone tempranamente luego de la polinización, y raramente se pierde antes de la madurez fisiológica. En efecto, el embrión adquiere la capacidad de germinar tempranamente (*ca.* 15 días después de la polinización) si se lo aísla del resto de las estructuras del grano y se lo incuba en agua.

En el caso de la cebada, un bajo nivel de dormición a cosecha es deseable para poder maltear los granos rápidamente luego de la cosecha (Benech-Arnold, 2001). De esta manera, se evita la necesidad de tener que remover la dormición artificialmente mediante la aplicación de hormonas, o de almacenar los granos hasta que los mismos pierdan la dormición naturalmente, exponiéndolos a deterioro fisiológico o por exposición a agente biológicos como insectos y hongos, y aumentando significativamente los costos de almacenamiento (Benech-Arnold, 2001). Por este motivo, el desarrollo de cultivares que presenten un bajo nivel de dormición a cosecha ha sido históricamente un objetivo central en los programas de mejoramiento de cebada cervecera. Sin embargo, dicho proceso de selección trajo aparejada la obtención de materiales que presentan un bajo nivel de dormición previo a la cosecha, cuando los granos aún se encuentran en la planta madre. Cuando esta baja dormición se combina con precipitaciones en momentos previos a la cosecha, se puede desencadenar la germinación de los granos. La misma puede detenerse rápidamente por falta de agua (pre-germinado) o avanzar más allá del “punto de no retorno”, momento a partir del cual los granos pierden la tolerancia a la desecación (brotado; Schopfer *et al.*, 1979). Tanto el pre-germinado como el brotado traen

aparejadas consecuencias negativas en el rendimiento, en la calidad comercial y en la calidad maltera (Brookes, 1980; Sole, 1994). Como resultado del brotado precosecha, se pierde irremediamente la viabilidad del grano y, en consecuencia, su capacidad germinativa, quedando inutilizable desde el punto de vista industrial. Respecto a este tema se establecen descuentos en la comercialización de lotes de grano de cebada con una capacidad germinativa por debajo de 98%, existiendo una tolerancia de recibo de 95% (SENASA, 2013). Si bien el pre-germinado no determina la pérdida instantánea de la viabilidad, sí afecta negativamente la longevidad potencial de los granos, lo que reduce significativamente el tiempo durante el cual los mismos pueden almacenarse luego de la cosecha, y hasta que la capacidad instalada de la industria maltera pueda procesarlos (Gualano *et al.*, 2014; Sole, 1994). Más aún, al desencadenarse el proceso germinativo y darse la reactivación metabólica, se inicia la hidrólisis de compuestos de reserva y su consumo por parte del embrión (Bewley y Black, 1994), disminuyendo el material fermentable obtenible durante el malteado.

Actualmente, existen cultivares de cebada cervecera que pierden la dormición rápidamente luego de madurez fisiológica, y que por lo tanto son susceptibles al brotado precosecha, independientemente de la condición de cultivo (Benech-Arnold, 2001). Asimismo, otros cultivares comerciales presentan una velocidad de salida de la dormición intermedia a partir de madurez fisiológica (Benech-Arnold, 2001). Dichos cultivares de comportamiento intermedio, en algunas localidades o años (i.e. en algunos ambientes) se comportan como resistentes a brotado precosecha (i.e. presentan alto nivel de dormición a cosecha), mientras que en otros se comportan como susceptibles (i.e. presentan un bajo nivel de dormición a cosecha). Rodríguez *et al.* (2001) y Gualano y Benech-Arnold (2009a) determinaron que, para un número de cultivares de comportamiento intermedio, la velocidad de salida de la dormición está directamente relacionada con la temperatura

media explorada por el cultivo durante un período acotado de tiempo térmico previo al momento de madurez fisiológica. A este período de sensibilidad a la temperatura para la determinación de un atributo directamente relacionado con la calidad maltera del cultivo se lo denominó “ventana de sensibilidad” (Rodríguez *et al.*, 2001). De esta forma, conociendo la ubicación de estas ventanas de sensibilidad y contando con un modelo cuantitativo que relacione la temperatura media explorada durante dicho período con la tasa de salida de la dormición, puede estimarse la susceptibilidad del cultivo a sufrir daños por brotado precosecha. Si se combina esta información con un pronóstico meteorológico, puede predecirse el riesgo del cultivo de cebada a sufrir brotado precosecha y actuar en consecuencia.

Existen reportes en la bibliografía que indican que otros factores ambientales explorados por el cultivo, además de la temperatura, permiten explicar parte de la variabilidad observada en la velocidad de salida de la dormición, y, por ende, en la susceptibilidad a sufrir brotado precosecha. Gualano y Benez-Arnold (2009b) encontraron que la restricción hídrica durante el llenado de granos aceleraba la salida de la dormición después de madurez fisiológica. La disponibilidad de nitrógeno y el fotoperíodo durante el llenado de granos, por otro lado, no mostraron un efecto significativo sobre la salida de la dormición (Gualano, 2011; Gualano y Benez-Arnold, 2009b).

La aparición de nuevos cultivares comerciales trae aparejada la necesidad de actualizar y ampliar los modelos existentes para caracterizar la susceptibilidad al brotado que presentan dichos materiales. Más aun, algunos de los genotipos difundidos hoy en día presentan en su misma línea de mejoramiento materiales que históricamente han presentado una marcada susceptibilidad al brotado precosecha (Antonio Aguinaga, comunicación personal).

El presente capítulo tiene el objetivo de extender el conocimiento existente sobre el efecto del ambiente durante el llenado de los granos, sobre la velocidad de salida de la dormición y, consecuentemente, sobre la susceptibilidad al brotado, en cultivares comerciales actuales de cebada cervecera.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Generalidades y tratamientos**

Con el objetivo de generar variabilidad ambiental durante el llenado de granos, cuatro cultivares comerciales de cebada cervecera se sembraron en nueve fechas de siembra (desde óptima a subóptimas) a lo largo de tres campañas y bajo disponibilidades de nitrógeno contrastantes. Las siembras utilizadas fueron las mismas que las del capítulo 2 con una adicional el 22 de septiembre de 2016 (**Cuadro 2.1**). Sin embargo, debido a abundantes precipitaciones durante el período de llenado de granos, los datos de la siembra correspondiente al 2 de junio de 2015 para el cultivar Scrabble fueron separados al hacer los análisis y determinaciones (**Cuadro 2.1**). Al igual que en el capítulo 2, las disponibilidades de nitrógeno utilizadas fueron 85 (N1) y 175 (N2) kg N ha<sup>-1</sup>.

Los cultivares utilizados, el diseño experimental, el manejo del cultivo, las mediciones correspondientes al ambiente térmico explorado y a las determinaciones de fenología, se detallan en el capítulo 2 (ver sección 2.2.1).

### **3.2.2 Muestreos y mediciones**

#### **3.2.2.1 Fenología y modelo de tiempo térmico**

Siendo que la disponibilidad de nitrógeno no afectó de manera relevante en términos agronómicos la fenología del cultivo (ver capítulo 2), la fecha de polinización se promedió para cada fecha de siembra y cultivar, independientemente del tratamiento de nitrógeno. La dinámica de llenado de granos se abordó mediante un modelo de tiempo térmico ajustado específicamente para cada cultivar (ver capítulo 2). El tiempo térmico

requerido para completar el llenado de granos, junto con la temperatura base por encima de la cual se debe acumular temperatura para su cálculo y la temperatura óptima por encima de la cual la temperatura ya no se acumula, se presentan en la **Cuadro 3.1**.

**Cuadro 3.1.** Tiempo térmico requerido para completar el llenado de granos, junto con la temperatura base y óptima para su cálculo, y el método utilizado para su estimación, para cada uno de los cultivares empleados en el presente trabajo. DG: duración de llenado de granos;  $T_b$ : temperatura base;  $T_o$ : Temperatura óptima; P0: Pendiente cero;  $MCV_{op}$ : Menor coeficiente de variación considerando una temperatura óptima (ver capítulo 2).

Cultivar	DG [°Cd]	$T_b$ [°C]	$T_o$ [°C]	Método
Andreia	356	8.3	-	P0
Scrabble	400	7.4	-	P0
ABI Balster	308	9.6	24.7	$MCV_{op}$
Q. Carisma	360	7.7	-	P0

### 3.2.2.2 Dinámica de salida de la dormición y estimación de la susceptibilidad al brotado precosecha

Se realizaron pruebas de germinación y determinaciones de contenido de humedad del grano periódicamente a partir de *ca.* 10 días antes de madurez fisiológica. Brevemente, se tomaron muestras de 7-8 espigas por subparcela cada 2-4 días. Los granos del tercio central de las espigas de cada subparcela se trillaron a mano y se homogeneizaron. Para la determinación del contenido de humedad, 50 granos se secaron a 80 °C durante 72 h, después de lo cual se determinó el peso seco por grano con una balanza de precisión, y se calculó el contenido relativo de humedad sobre el peso fresco del grano. Para llevar a cabo las pruebas de germinación, 30 granos se colocaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecidos con 6 ml de agua destilada, para luego incubarse en oscuridad a 20 °C durante 12 días. El número de granos germinados se determinó diariamente. Se consideraron como germinados aquellos granos que presentaron la radícula elongada 1mm por afuera de las glumelas. Las placas de Petri se envolvieron con una película plástica para minimizar las pérdidas de agua por evaporación. El nivel de dormición se evaluó mediante un Índice de Germinación (IG)

ampliamente utilizado en la literatura para estimar el nivel de dormición de una población de semillas (Benech-Arnold *et al.*, 1999; Gualano y Benech-Arnold, 2009a, 2009b; Rodríguez *et al.*, 2001; Steinbach *et al.*, 1997, 1995). El mismo considera tanto la proporción de granos germinados luego de un período determinado, como la tasa a la cual dichos granos germinaron, otorgándole mayor ponderación a aquellos granos que germinan tempranamente, respecto de aquellos que lo hacen tardíamente. El IG se calculó como:

$$IG = \frac{\sum_{i=1}^{12} [12-(i-1)] \times n_i}{3} \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde  $n_i$  es el número de granos germinados el día de incubación  $i$  (no acumulado), para los 12 días de incubación. El índice presenta valores que van de 0 (ningún grano germina al cabo de los 12 días de incubación) a 120 (los 30 granos germinan el primer día de incubación).

La determinación del IG cuando el cultivo se encuentra próximo a la madurez comercial (*ca.* 12% de contenido de humedad del grano) es un buen indicador de la susceptibilidad del cultivo a sufrir brotado precosecha (Gualano y Benech-Arnold, 2009a; Rodríguez *et al.*, 2001). Gualano y Benech-Arnold (2009a) utilizaron dicho índice medido cuando los granos presentan entre 20 y 10% de humedad, ya que observaron que el mismo tendía a estabilizarse en ese rango de contenidos hídricos. En el presente trabajo dicha tendencia no se observó en algunas de las fechas de siembra, por lo que se consideró un rango más amplio de entre *ca.* 30 y 12% de contenido de humedad. Cuando se contó con más de una medición de IG entre dichos contenidos de humedad, las mismas se promediaron para obtener un valor representativo del rango. Al valor de IG que caracterizó al cultivo entre 30 y 12% humedad, ya sea que corresponda a una única medición o a un promedio, se lo denominó IG cercano a madurez comercial (IG<sub>cme</sub>).

### **3.2.2.3 Determinación de ventanas de sensibilidad a la temperatura y efecto del nitrógeno**

Para evaluar el efecto de la temperatura explorada por los cultivos durante el llenado de granos sobre la velocidad de salida de la dormición, y por ende, sobre la susceptibilidad a sufrir brotado precosecha, se realizó un análisis de correlación siguiendo la metodología utilizada por Rodríguez *et al.* (2001) y Gualano y Benech-Arnold (2009a). Brevemente, para cada cultivar, fecha de siembra, y tratamiento de nitrógeno, el tiempo térmico desde la polinización y hasta la madurez fisiológica se dividió arbitrariamente en intervalos de 50, 75, 100 y 150 °Cd. Se realizaron análisis de correlación entre la temperatura media de cada intervalo y el IG cercano a madurez comercial. Un intervalo con sensibilidad a la temperatura para la determinación de la susceptibilidad al brotado precosecha (*i.e.* una ventana de sensibilidad) sería el que muestra una correlación significativa entre la temperatura y el IG cercano a madurez comercial. Para determinar si la disponibilidad de nitrógeno tiene un efecto significativo sobre la ubicación relativa de las ventanas de sensibilidad, el análisis se llevó a cabo considerando los tratamientos de nitrógeno tanto por separado como combinados. En concordancia con Rodríguez *et al.* (2001), y considerando las múltiples comparaciones realizadas a lo largo del análisis, se utilizó un alfa de 0.0001 para evitar cometer un error de Tipo I. Para evaluar la conveniencia de considerar intervalos acotados de tiempo térmico, también se realizó el análisis de correlación empleando la temperatura media para todo el período de llenado de granos. Cabe aclarar que, al realizar un análisis exploratorio de los datos, se observó que las fechas de siembra de septiembre de 2015 y 2016 mostraron un comportamiento consistente con el resto (en lo que respecta a las ventanas de sensibilidad) cuando la suma de tiempo térmico se realizó a partir de 5 días previos a la fecha de polinización. Por lo

tanto, para dichas fechas de siembra se ajustó el modelo de tiempo térmico de acuerdo con lo comentado.

Para determinar si la disponibilidad de nitrógeno tuvo algún efecto sobre la susceptibilidad al brotado precosecha en alguno de los cultivares, se realizó un análisis de regresión múltiple considerando el IG cercano a madurez comercial como variable respuesta, y el cultivar, la temperatura durante la ventana de sensibilidad correspondiente a cada cultivar, y el tratamiento de nitrógeno como variables explicativas.

Todos los cálculos, análisis y gráficos se realizaron utilizando el lenguaje de programación R y el entorno RStudio (R Core Team, 2018). Salvo indicación contraria, se consideraron significativas aquellas relaciones que presentaron un valor p menor a 0.05.

### 3.3 Resultados

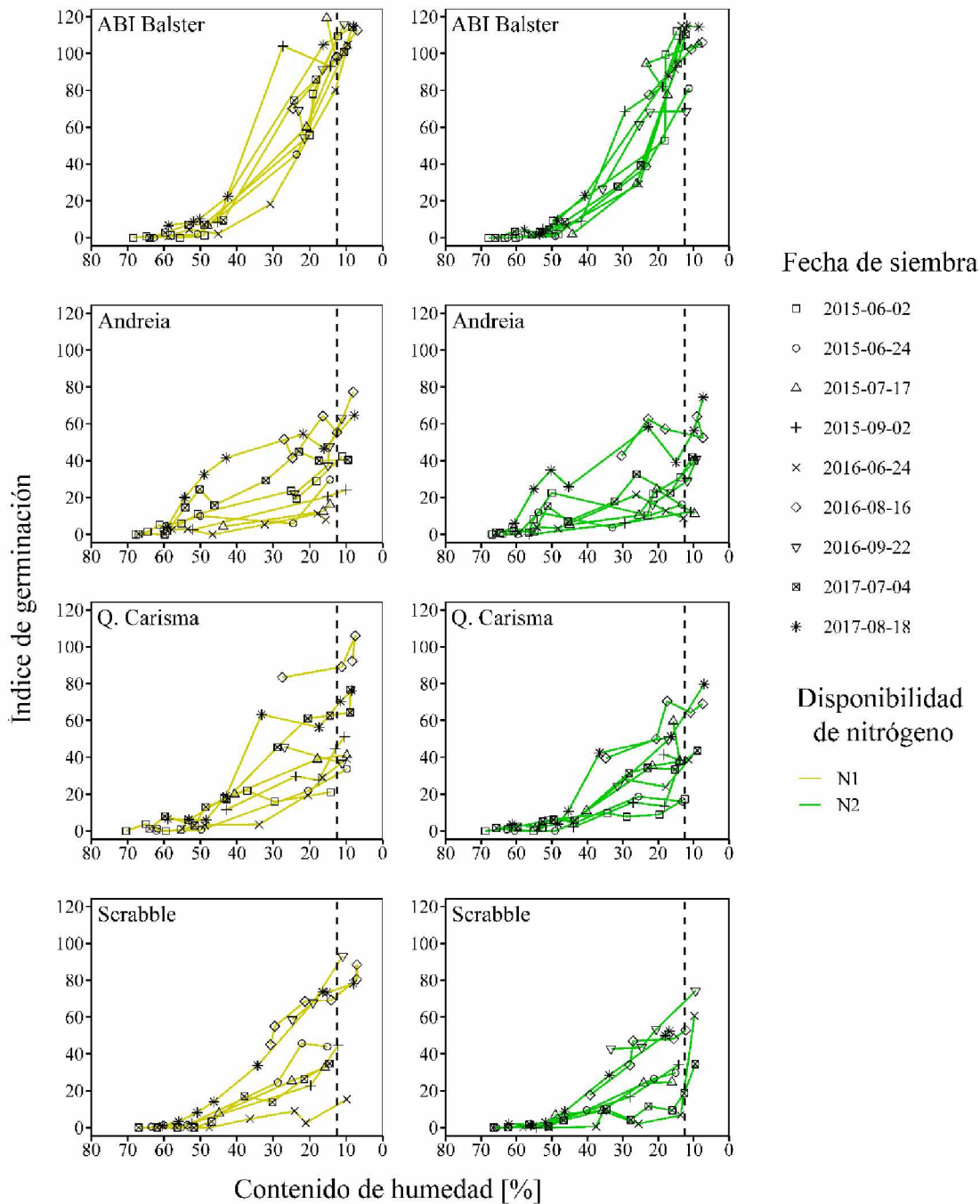
#### 3.3.1 Análisis exploratorio de la dinámica de salida de la dormición

En términos generales, ABI Balster, Scrabble y Q. Carisma presentaron valores de IG que fueron cercanos a cero cuando el contenido de humedad de los granos fue menor al que corresponde a la madurez fisiológica (*ca.* 46%), independientemente de la fecha de siembra y la disponibilidad de nitrógeno (**Figura 3.1**). Sin embargo, dicho comportamiento no se observó en Andreia en algunas fechas de siembra, ya que este cultivar presentó valores de IG de entre *ca.* 20 y 40 cuando los granos aun presentaban contenidos de humedad superiores al 50% (**Figura 3.1**). Luego de la madurez fisiológica, la dinámica de salida de la dormición presentó diferencias entre genotipos ( $p < 0.001$ , **Figura 3.1**). Promediando entre fechas de siembra y disponibilidades de nitrógeno, Andreia, Scrabble y Q. Carisma presentaron valores de IG cercanos a madurez comercial de 27.3, 29.7 y 37.8, respectivamente. A su vez, dichos cultivares mostraron un rango de IG cercano a madurez comercial de entre *ca.* 4 y 70, dependiendo la fecha de siembra, la



disponibilidad de nitrógeno y el contenido de humedad del grano (**Figura 3.1**). Por otro lado, ABI Balster mostró una salida de la dormición más abrupta en comparación con los otros cultivares, con un IG cercano a madurez comercial de 94.6 en promedio. La variabilidad observada para este cultivar en lo que respecta a la dinámica de salida de la dormición, fue más acotada respecto a los otros cultivares, con valores de IG cercano a madurez comercial de entre 69 y 112, dependiendo la fecha de siembra, la disponibilidad de nitrógeno y el contenido de humedad (**Figura 3.1**).

La velocidad de salida de la dormición varió significativamente dependiendo de la fecha de siembra ( $p < 0.001$ ). En términos generales, aunque con algunas excepciones, las fechas de siembra más tardías (i.e. agosto y septiembre) presentaron valores de IG cercano a madurez comercial mayores que los registrados para las fechas más tempranas (i.e. junio y julio; **Figura 3.1**). Por otro lado, la disponibilidad de nitrógeno también tuvo un efecto significativo sobre el IG cercano a madurez comercial ( $p < 0.05$ ), con valores promedio 7.5 puntos menores para el tratamiento de mayor disponibilidad (N2), respecto al de menor disponibilidad (N1). Dicho efecto fue independiente del cultivar y de la fecha de siembra.



**Figura 3.1.** Índice de germinación en función del contenido de humedad de los granos según la fecha de siembra y la disponibilidad de nitrógeno, para los cuatro cultivares evaluados en el presente estudio. Cada punto es el promedio de tres repeticiones. La línea vertical intermitente indica la tolerancia de contenido de humedad de recibo luego de la cosecha (12.5%).

### 3.3.2 Ubicación de ventanas de sensibilidad a la temperatura

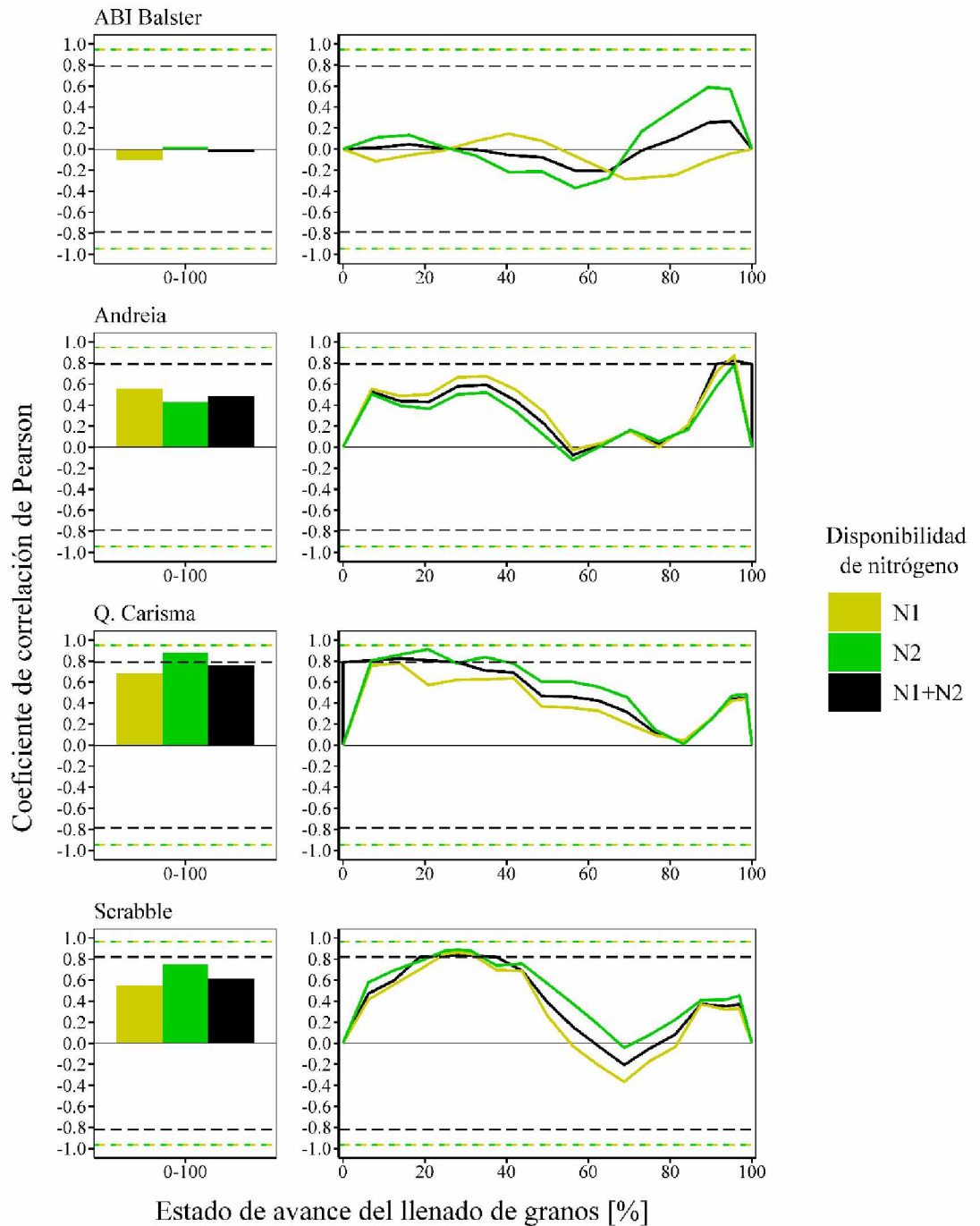
Al evaluar la asociación entre el índice de germinación y la temperatura media explorada por el cultivo durante intervalos acotados de tiempo térmico dentro del llenado de granos, se encontró una correlación significativa para los cultivares Andreaia, Q.

Carisma y Scrabble (**Figura 3.2, Cuadro 3.2**). En el caso de Andreia, dicha asociación correspondió a un intervalo breve de *ca.* 30 °Cd, ubicado justo antes de madurez fisiológica (**Figura 3.2, Cuadro 3.2**). En el caso de Scrabble y Q. Carisma, el intervalo se ubicó cerca del primer tercio del llenado de granos, y fue, en términos relativos, más amplio que el encontrado para Andreia (**Figura 3.2, Cuadro 3.2**). Para dichos cultivares, el coeficiente de correlación para la ventana de sensibilidad encontrada siempre fue superior a 0.8. En el caso de ABI Balster, no se encontró una correlación significativa entre ningún intervalo de tiempo térmico durante el llenado y el índice de germinación cercano a madurez comercial. Al considerar los tratamientos de disponibilidad de nitrógeno por separado, si bien no se encontraron correlaciones significativas, el perfil de asociaciones a lo largo del llenado de granos fue muy similar entre ambos tratamientos, y con relación al resultado que se obtuvo en el análisis combinado (**Figura 3.2**). De hecho, los intervalos de mayor ajuste prácticamente no variaron al considerar las distintas disponibilidades de nitrógeno (**Figura 3.2, Cuadro 3.2**). No se observó una correlación significativa entre la temperatura media del llenado completo y el índice de germinación para ninguno de los genotipos analizados, ya sea evaluando los tratamientos de disponibilidad de nitrógeno por separado o combinándolos (**Figura 3.2, Cuadro 3.2**). De esta forma, dicha asociación en ningún caso presentó un coeficiente de correlación mayor, en términos absolutos, que el que se encontró para el intervalo acotado de tiempo térmico de mejor ajuste durante el llenado de los granos, para cada cultivar (**Figura 3.2, Cuadro 3.2**). En lo que respecta a ABI Balster, si bien se observó una leve tendencia a presentar mayores coeficientes de correlación hacia el final del llenado, entre la temperatura media y el índice de germinación cercano a madurez comercial, en ningún caso los mismos se acercan a la significancia estadística.

**Cuadro 3.2.** Intervalo de tiempo térmico que presentó la mayor correlación entre el índice de germinación cercano a madurez comercial y la temperatura media para cada disponibilidad de nitrógeno por separado o agrupadas, junto con la ubicación relativa dentro del llenado de granos y el coeficiente de correlación correspondiente a dicho período, además del calculado considerando la temperatura media del período completo de llenado de granos.

Cultivar	Disponibilidad de Nitrógeno	Intervalo de tiempo térmico	Ubicación relativa del intervalo	Coeficiente de correlación (r)	
				Considerando el intervalo de tiempo térmico	Considerando todo el llenado de granos
		[°Cd]	[%]		
ABI Balster	N1	175-250	57-81	-0.29	-0.11
	N2	250-300	81-97	0.59	0.02
	N1+N2	275-308	89-100	0.27	-0.03
Andreia	N1	325-356	91-100	0.87	0.55
	N2	325-356	91-100	0.79	0.42
	N1+N2	325-356	91-100	0.82*	0.49
Q. Carisma	N1	0-100	0-28	0.78	0.68
	N2	0-150	0-42	0.91	0.87
	N1+N2	0-100	0-28	0.82*	0.76
Scrabble	N1	75-150	19-38	0.86	0.54
	N2	75-150	19-38	0.89	0.75
	N1+N2	75-150	19-38	0.84*	0.61

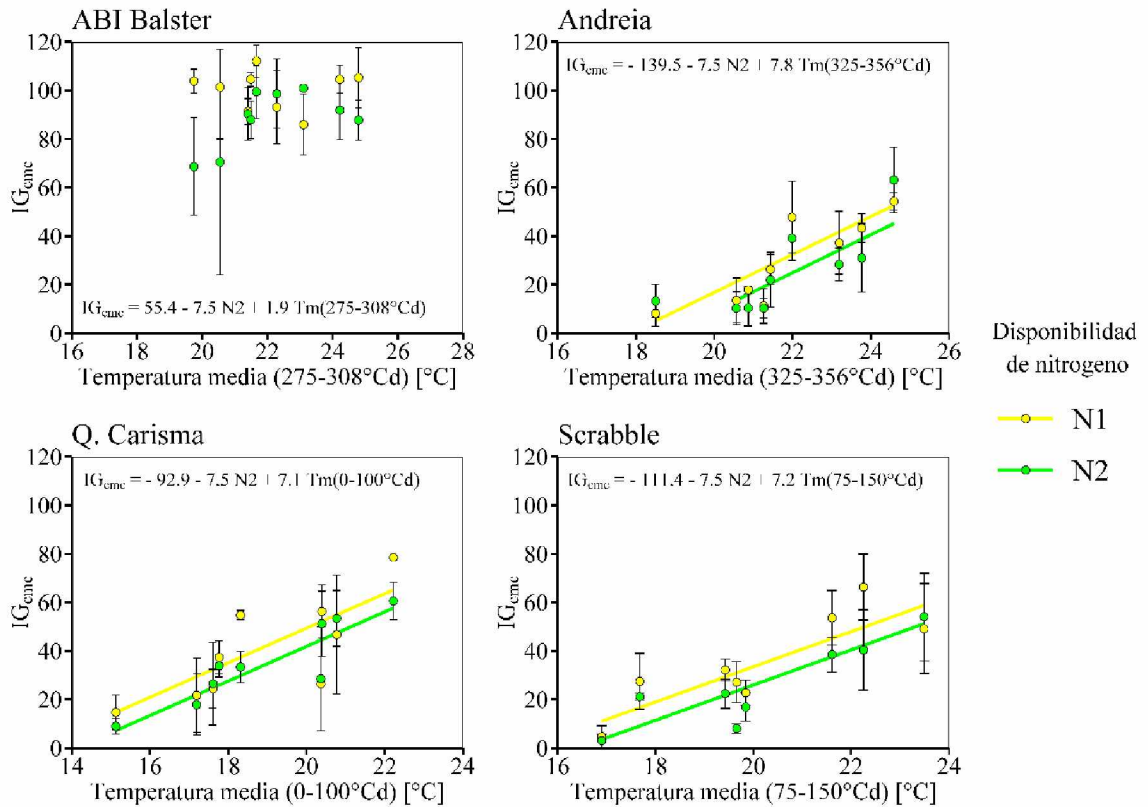
\*p<0.0001



**Figura 3.2.** Coeficiente de correlación de Pearson para la asociación entre el índice de germinación cercano a madurez comercial y la temperatura media de todo el llenado de granos (izquierda) o de distintos períodos dentro del llenado de granos (derecha), para los cuatro cultivares utilizados en el presente estudio, y los dos tratamientos de disponibilidad de nitrógeno por separado y combinados. Un 0% de estado de avance corresponde a la polinización, mientras que un 100% de estado de avance corresponde a madurez fisiológica. La línea entrecortada verde y amarilla indica el coeficiente mínimo necesario para alcanzar la significancia estadística ( $p < 0.0001$ ) para los tratamientos de nitrógeno por separado. La línea entrecortada negra indica el coeficiente mínimo necesario para alcanzar la significancia estadística ( $p < 0.0001$ ) para los tratamientos de nitrógeno combinados.

### 3.3.3 Relación entre la temperatura media en la ventana de sensibilidad, la disponibilidad de nitrógeno y la susceptibilidad al brotado precosecha

Con el objetivo de dilucidar los factores involucrados en la determinación del IG cercano a madurez comercial (indicador de la susceptibilidad del cultivo a sufrir brotado precosecha), se ajustó una regresión múltiple considerando como variables explicativas al cultivar, al contenido de nitrógeno y a la temperatura media durante la ventana de sensibilidad correspondiente. En el caso de ABI Balster, cultivar para el cual no se detectó ninguna ventana de sensibilidad para la determinación de la susceptibilidad al brotado precosecha, se utilizó el intervalo de tiempo térmico que presentó la mayor correlación (i.e. 275-308 °Cd). El modelo explicó el 90% de la variabilidad observada en el IG cercano a madurez comercial del cultivo. El efecto de la temperatura media durante la ventana de sensibilidad (o el intervalo de mayor correlación) varió dependiendo del cultivar ( $p < 0.05$ ; **Figura 3.3**). Para Andreia, Q. Carisma y Scrabble se encontró un efecto significativo de esta variable, con pendientes similares para los tres cultivares (ca. 7.5 puntos de IG °C<sup>-1</sup>; **Figura 3.3**). En el caso de ABI Balster, no se detectó efecto alguno de dicha variable sobre el IG cercano a madurez comercial (**Figura 3.3**). En lo que respecta a la disponibilidad de nitrógeno, se observó un efecto significativo sobre el IG cercano a madurez comercial ( $p < 0.01$ ). Aquellas unidades experimentales a las que se les asignó el tratamiento de mayor disponibilidad de nitrógeno (170 kg N ha<sup>-1</sup>), presentaron en promedio un IG cercano a madurez comercial 7.5 puntos menor que el registrado para el tratamiento de menor disponibilidad (85 kg N ha<sup>-1</sup>). Dicho efecto fue independiente del cultivar considerado, y no varió con la temperatura durante la ventana de sensibilidad. Por otro lado, el cultivar tuvo un efecto significativo sobre el IG cercano a madurez comercial ( $p < 0.01$ ), con ABI Balster presentando los mayores valores.



**Figura 3.3.** Regresión múltiple para el índice de germinación cercano a madurez comercial en función de la temperatura media de la ventana de tiempo térmico durante el llenado de granos con mayor correlación, de la disponibilidad de nitrógeno, y del cultivar. Las líneas sólidas indican un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de la temperatura media durante el intervalo de tiempo térmico correspondiente. La función que describe la relación entre las variables para cada cultivar se presenta en el área del gráfico correspondiente.

### 3.4 Discusión

Tanto el brotado precosecha como el pregerminado traen aparejada una serie de consecuencias negativas en la calidad del grano de cebada cervecera, que dificultan el cumplimiento de los requisitos mínimos indispensables para su adecuado procesamiento industrial. El nivel de dormición que presentan los granos previo a la cosecha, está inversamente relacionado con la susceptibilidad del cultivo a sufrir dichas adversidades. En la literatura pueden encontrarse distintos estudios llevados a cabo con el objetivo de determinar cuáles son los factores ambientales que modulan la dinámica de salida de la dormición en cebada cervecera (Benech-Arnold, 2001; Gualano y Benech-Arnold, 2009a, 2009b; Rodríguez *et al.*, 2001) y otros cereales (Rodríguez *et al.*, 2015). Algunos de

dichos factores ejercen su influencia durante períodos acotados dentro del llenado de granos (comúnmente denominados “ventanas de sensibilidad”; Benech-Arnold, 2001; Gualano y Benech-Arnold, 2009a, 2009b; Rodríguez *et al.*, 2001). Por otro lado, el genotipo también demostró tener un rol fundamental en la determinación del nivel de dormición previo a la cosecha (Benech-Arnold, 2001). De esta forma, surge la necesidad de evaluar en qué medida las asociaciones reportadas en la literatura pueden extrapolarse a los nuevos cultivares comerciales que han sido difundidos en los últimos años.

En el presente trabajo, cuatro variedades comerciales de cebada cervecera se cultivaron en nueve fechas de siembra a lo largo de tres campañas, y bajo dos disponibilidades de nitrógeno contrastantes. Las distintas fechas de siembra permitieron explorar un amplio rango de condiciones térmicas durante el llenado de granos (**Cuadro 2.2**). Las altas temperaturas durante el período de formación de las semillas disminuyen la dormición en muchas especies vegetales (Benech-Arnold *et al.*, 2022; Sexsmith, 1969; Sharif-Zadeh y Murdoch, 2000; Steadman *et al.*, 2004; Wurzburger y Koller, 1976). Particularmente para cebada cervecera se ha encontrado que, para muchos genotipos, existe una ventana de sensibilidad a la temperatura para la determinación del nivel de dormición a cosecha (Gualano y Benech-Arnold, 2009a; Rodríguez *et al.*, 2001). Para los genotipos reportados, dicha ventana se ubica justo antes de la madurez fisiológica del cultivo (Gualano y Benech-Arnold, 2009a; Rodríguez *et al.*, 2001). En el presente trabajo, los resultados obtenidos variaron dependiendo del cultivar considerado (**Figura 3.2, Cuadro 3.2**). Para el cultivar Andreia se encontró una ventana de sensibilidad de duración y ubicación relativa similar a las reportadas por Rodríguez *et al.* (2001) y por Gualano y Benech-Arnold (2009a). En el caso de ABI Balster, no se detectó ninguna ventana de sensibilidad a la temperatura para la determinación a la susceptibilidad al brotado precosecha (**Cuadro 3.2**). Dicho cultivar presentó en todos los casos un bajo nivel de



dormición previo a la cosecha, independientemente de la temperatura explorada durante el llenado de granos (**Figura 3.1**). Gualano y Benech-Arnold (2009a) reportaron un comportamiento muy similar para el cultivar B1215. ABI Balster y B1215 son cultivares que pertenecen a la misma línea de mejoramiento (Antonio Aguinaga, comunicación personal). Estos resultados destacan la relevancia y las implicancias del efecto del genotipo sobre la determinación de la susceptibilidad a brotado precosecha en cebada cervecera, previamente indicado en la literatura (Benech-Arnold, 2001; Gualano y Benech-Arnold, 2009a; Rodríguez *et al.*, 2015). Por último, para los cultivares Q. Carisma y Scrabble se encontraron ventanas de sensibilidad a la temperatura para la determinación de la susceptibilidad a brotado, pero a diferencia de Andreia, dicha ventana estuvo ubicada, para ambos cultivares, en algún momento de la primera mitad del llenado de granos (**Figura 3.2, Cuadro 3.2**). Al igual que para el cultivar Andreia, la correlación fue positiva (*i.e.* a mayor temperatura durante la ventana de sensibilidad, mayor IG cercano a madurez comercial). No se encontraron reportes en la literatura que hagan referencia a esta asociación positiva entre la temperatura explorada en este momento del llenado de granos, y la tasa de salida de la dormición en cebada. Sin embargo, recientemente Chen *et al.* (2021) encontraron que temperaturas bajas durante etapas tempranas del desarrollo de las semillas de *Brassica oleracea* resultaron en una menor tasa de germinación luego de la madurez. Dicho efecto de la temperatura se explicó por una inhibición del catabolismo del ácido abscísico, que resultó en mayores concentraciones de esta hormona promotora de la dormición en las semillas maduras (Chen *et al.*, 2021).

La distancia temporal que hay entre las ventanas de sensibilidad encontradas para Q. Carisma y Scrabble, y la hallada para Andreia y los cultivares estudiados por Rodríguez *et al.* (2001) y Gualano y Benech-Arnold (2009a) sugiere que la temperatura

estaría afectando procesos fisiológicos distintos. Existe también la posibilidad de que en ambos momentos estén ocurriendo procesos fisiológicos asociados a la determinación de la velocidad de salida de la dormición, y que por distintos motivos en estos tres cultivares se haya detectado solo uno de ellos (*i.e.* el que ocurre a inicio del llenado en Scrabble y Q. Carisma, y el que ocurre al final del llenado en Andreia). Esto explicaría por qué los tres cultivares presentan un mismo patrón de correlaciones a lo largo del llenado (**Figura 3.2**). Esto puede deberse a (i) que el peso relativo de dichos procesos depende del cultivar considerado, y el ensayo no tuvo la potencia suficiente para detectar el efecto de menor tamaño en cada caso, o a (ii) que existe una o más variables no consideradas en el presente trabajo que aumentan el error experimental y no permiten detectar dichas relaciones. En cualquier caso, determinar los procesos fisiológicos involucrados en ambas ventanas de sensibilidad es necesario para comprender cabalmente los mecanismos que regulan la susceptibilidad a brotado precosecha en cebada cervecera.

El aumento en la disponibilidad de nitrógeno generalmente se asocia a menores niveles de dormición en las semillas de distintas especies (Benech-Arnold *et al.*, 2022; Detje, 1992; Fawcett y Slife, 1978; He *et al.*, 2016; Matakias *et al.*, 2009). Curiosamente, los resultados de la presente tesis mostraron que un aumento en la disponibilidad de nitrógeno resultó en un menor IG cercano a madurez comercial y, por lo tanto, en una menor susceptibilidad del cultivo a sufrir brotado precosecha (**Figura 3.3**). Dicho efecto se observó independientemente del cultivar considerado. Gualano y Benech-Arnold (2009b) no encontraron ningún efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre la velocidad de salida de la dormición trabajando con cinco cultivares de cebada cervecera. Más aun, los tratamientos de nitrógeno aplicados en dicho estudio (40 y 180 kg N ha<sup>-1</sup>) fueron más contrastantes respecto a los utilizados en el presente trabajo (85 y 170 kg N ha<sup>-1</sup>). Si bien existen pocos estudios del efecto de la disponibilidad de nitrógeno

en cebada sobre la susceptibilidad al brotado precosecha, la evidencia en otros cereales indica una interacción de este factor con el genotipo. Diversos estudios encontraron que una mayor disponibilidad de nitrógeno se asocia a mayores niveles de brotado en trigo, aunque la respuesta fue altamente dependiente del cultivar considerado (Bhatt *et al.*, 1981; Detje, 1992; Morris y Paulsen, 1985). Kindred *et al.* (2005) encontraron que una mayor disponibilidad de nitrógeno aumentó el nivel de dormición solo en algunos genotipos de trigo. Los autores hipotetizaron que dicha respuesta pudo deberse a un efecto indirecto del nitrógeno sobre la tasa de desarrollo del cultivo. En el caso de la presente tesis, no se detectó un efecto claro y agronómicamente relevante del nitrógeno sobre la duración del llenado de granos (ver capítulo 2). Asimismo, dicho efecto debería “corregirse” al determinar el IG cercano a madurez comercial en base al contenido relativo de humedad del grano. Al presente no hay reportes en la literatura que indiquen un aumento en el nivel de dormición primaria en cebada como respuesta a un aumento en la disponibilidad de nitrógeno. El efecto del nitrógeno sobre la dinámica de salida de la dormición involucra mecanismos genéticos y metabólicos parcialmente superpuestos (He *et al.*, 2016). Determinar los mecanismos detrás de esta asociación es de suma importancia para entender en qué medida se puede minimizar la susceptibilidad del cultivo a sufrir brotado precosecha mediante una práctica tan usual como lo es el manejo de la fertilización nitrogenada. Por otro lado, siendo que la disponibilidad de nitrógeno puede afectar la dinámica de algunos procesos fisiológicos relevantes para la determinación de la calidad en cebada cervecera (*e.g.* deposición de hordeínas, Peton, 2017), resultaba de interés comparar el perfil de correlaciones entre el IG cercano a madurez comercial y la temperatura media de una serie de intervalos arbitrarios a lo largo del llenado de granos. Hasta donde sabemos, no hay reportes en la literatura que aborden esta interrogante. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que no existe

un efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre la ubicación relativa de la ventana de sensibilidad a la temperatura para la definición de la susceptibilidad al brotado precosecha.

La pendiente de la relación entre la temperatura media de la ventana de sensibilidad y el IG cercano a madurez comercial fue similar a las reportadas previamente para otros cultivares (Gualano y Benech-Arnold, 2009a). Estos resultados sugieren que la relevancia del genotipo en lo que respecta a las ventanas de sensibilidad para la determinación de la susceptibilidad al brotado precosecha radica principalmente en la presencia o ausencia (*e.g.* Andreia versus ABI Balster), o en la ubicación relativa (*e.g.* Andreia versus Q. Carisma o Scrabble) de la ventana de sensibilidad, más que en la pendiente de la relación entre la temperatura explorada durante dicha ventana de sensibilidad y el nivel de dormición cercano a cosecha. Esto explica por qué al ajustar un modelo general para varios cultivares de cebada, Gualano y Benech-Arnold (2009a) obtuvieron un mejor ajuste al utilizar la temperatura media explorada durante la ventana de sensibilidad correspondiente a cada genotipo, en vez de asumiendo una única ventana de sensibilidad para todos los cultivares.

El uso de fechas de siembra como método para generar variabilidad en la temperatura de llenado de los granos, si bien es ampliamente utilizado en experimentos a campo, resulta también en la variación de otros factores ambientales que pueden o no tener un efecto sobre la velocidad de salida de la dormición. Como se mencionó en la introducción del presente capítulo, puede afirmarse que en cebada no existe un efecto del fotoperíodo sobre la velocidad de salida de la dormición (Gualano, 2011; Gualano y Benech-Arnold, 2009b). Asimismo, al cambiar la fecha de siembra es esperable que se exponga el llenado de granos a cantidades variables de radiación. Reducciones en la cantidad de luz recibida por la planta madre durante la formación de las semillas resultó

en menores niveles de dormición en *Datura ferox* L. (Sánchez *et al.*, 1981). Hasta donde sabemos, a la fecha no existen reportes en cebada que indiquen un efecto de la cantidad de radiación explorada durante el período de formación de los granos sobre la velocidad de salida de la dormición. Si bien otros factores explorados durante la formación de los granos, e incluso luego de madurez fisiológica, pueden tener un efecto sobre la velocidad de salida de la dormición, la evidencia disponible en la bibliografía indica que indudablemente la temperatura explica, al menos en determinados genotipos, gran parte de la variabilidad observada en dicha variable de interés (Benech-Arnold, 2001; Benech-Arnold *et al.*, 2021; Patwa y Penning, 2020). Esto se condice con los resultados obtenidos en la presente tesis.

El hecho de que la sumatoria de grados día del modelo de tiempo térmico específico para cada cultivar tuvo que iniciarse cinco días previos a la polinización en las dos fechas de siembra más tardías (*i.e.* 2 de septiembre de 2015 y 22 de septiembre de 2016) para que el análisis sea consistente con el resto de las siembras, indica la necesidad de que los modelos de desarrollo utilizados sean específicos para cada proceso considerado. Como se mencionó previamente, los distintos procesos fisiológicos no necesariamente son regulados por los mismos factores ambientales, ni de la misma manera en todos los casos (ver capítulo 2).

Los modelos reportados en el presente capítulo permiten al productor llevar a cabo una sumatoria de tiempo térmico, ubicar la ventana de sensibilidad correspondiente y, a partir de la temperatura media explorada durante dicho intervalo, predecir la susceptibilidad al brotado precosecha que presentará el cultivo. Combinando esta predicción con un pronóstico meteorológico, frente a un escenario de riesgo de brotado, el productor puede optar por minimizar las pérdidas de calidad mediante la aplicación de

un desecante luego de madurez fisiológica, con la consiguiente cosecha anticipada del cultivo.

### **3.5 Conclusión**

En tres de los cuatro cultivares comerciales estudiados se encontró una ventana de sensibilidad a la temperatura para la definición de la susceptibilidad al brotado precosecha. En todos los casos, la temperatura media durante dicha ventana de sensibilidad explicó la variabilidad observada en la susceptibilidad al brotado precosecha mejor que la temperatura media correspondiente todo el período de llenado de granos. La ubicación relativa de las ventanas de sensibilidad varió con el genotipo, pero no con la disponibilidad de nitrógeno. Asimismo, se encontró un efecto positivo de la disponibilidad de nitrógeno sobre la susceptibilidad al brotado precosecha, reportado por primera vez para cebada cervecera. Queda en evidencia la importancia del genotipo para la determinación de las ventanas de sensibilidad a la temperatura que definen la susceptibilidad al brotado precosecha. Así, los modelos cuantitativos aquí presentados pueden utilizarse para caracterizar la susceptibilidad al brotado precosecha en distintos cultivares y escenarios de manejo. Combinar esta información con datos de pronóstico climático permite calcular el riesgo al brotado precosecha, y tomar las medidas de manejo necesarias para asegurar una calidad comercial adecuada.

**Capítulo 4: Determinación de ventanas  
de sensibilidad a la temperatura  
durante el llenado de los granos, para  
la definición del extracto de malta en  
cebada cervecera**





## CAPÍTULO 4

### **Determinación de ventanas de sensibilidad a la temperatura durante el llenado de los granos, para la definición del extracto de malta en cebada cervecera**

#### **Resumen**

El extracto de malta es el parámetro más relevante que describe la calidad maltera en cebada. Las diferencias observadas en el extracto de malta de cultivos de cebada que se desarrollaron en diferentes ambientes son complejas de explicar, y su interpretación podría representar una oportunidad para mejorar la calidad maltera resultante. Aunque el efecto de algunos atributos del grano sobre el extracto de malta es generalmente reconocido en la bibliografía (*e.g.* contenido de proteína y tamaño de grano), otros son menos comprendidos y son difíciles de replicar experimentalmente, con poca evidencia de cómo son controlados por el ambiente durante el llenado del grano (*e.g.* contenido y tipo de hordeínas y propiedades de pastificación). Cuatro cultivares comerciales de cebada maltera fueron sembrados en once fechas de siembra a lo largo de cuatro años para explorar un amplio rango de condiciones térmicas durante el llenado de granos. Disponibilidades contrastantes de nitrógeno fueron incluidas para promover la variabilidad en el contenido de proteína. El calibre, el contenido de proteína, la temperatura de pastificación y la cantidad de hordeínas D y  $\gamma$ , mostraron un efecto significativo sobre el extracto de malta. El contenido de proteína mostró un efecto negativo sobre el extracto de malta solo cuando estuvo por encima de un valor umbral de aprox. 10%, aunque dicho umbral varió entre cultivares. La temperatura de pastificación presentó una interacción significativa con el contenido de proteínas. La hordeína D mostró un efecto negativo sobre el extracto de malta solo cuando el contenido de proteína estuvo por debajo del umbral, lo que explica algunos de los resultados contradictorios reportados en la literatura. También se encontró evidencia de un efecto negativo de las

hordeínas  $\gamma$  en el extracto de malta. Debido a altos niveles de correlación entre grupos de hordeínas, las fracciones B, C y la relación D/B, no pudieron ser evaluadas. El período entre la polinización y la madurez fisiológica se dividió arbitrariamente en intervalos de tiempo térmico, y se realizaron análisis de correlación entre la temperatura media durante cada uno de dichos períodos y los atributos del grano que afectaron el extracto de malta. Para todos los cultivares, se encontró que solo dos atributos fueron modulados por el ambiente térmico explorado por el cultivo durante el llenado de granos: la temperatura de pastificación se correlacionó positivamente con la temperatura media explorada por el cultivo durante la mitad del llenado del grano, mientras que el calibre se correlacionó negativamente con la temperatura media durante la segunda mitad del llenado de granos. Los modelos cuantitativos reportados en el presente estudio, además de ofrecer una explicación de cómo se configura la calidad maltera en el campo, constituyen una herramienta útil para la zonificación agroclimática para la idoneidad de la producción de cebada cervecera de alta calidad.

#### 4.1 Introducción

El extracto de malta, una medida general de la proporción de materiales solubles obtenidos de la maceración de la malta en el mosto (Emebiri *et al.*, 2004) es el parámetro más relevante para evaluar la calidad maltera en cebada (Briggs, 1998). Este parámetro se ve afectado por muchas características del grano, de las cuales el contenido de proteína y el tamaño del grano son probablemente las más estudiadas. En los granos de cebada, los gránulos de almidón se encuentran incrustados en una matriz proteica que, cuando está presente en grandes cantidades, se convierte en una barrera física que evita que las enzimas amilolíticas de la malta hidrolicen el almidón en carbohidratos solubles durante la maceración (Bathgate y Palmer, 1973; Brennan *et al.*, 1996; Palmer, 1991; Slack *et al.*, 1979). Asimismo, debido a la correlación negativa entre contenido de proteína y almidón (Bishop, 1930b), el contenido de proteína del grano generalmente se correlaciona negativamente con el extracto de malta (Bishop, 1930a; Eagles *et al.*, 1995; Edney, 1996; Molina-Cano *et al.*, 2000). El tamaño del grano, un parámetro importante en cebada cervecera hace referencia a las características morfológicas del grano -más precisamente a su ancho- y se evalúa pasando una muestra de grano por una serie de tamices con diferentes tamaños de ranura, y registrando la proporción en peso que retiene cada tamiz. (Briggs, 1978). El calibre, a menudo definido como el porcentaje de grano por peso que queda retenido por encima de un tamiz de 2.5 mm (Cozzolino *et al.*, 2014), es un indicador de la homogeneidad del tamaño del grano. La alta variabilidad en el tamaño del grano determina una absorción de agua diferencial durante el malteado y, por lo tanto, desuniformidad en el proceso de germinación. Esto a su vez provoca una modificación desigual del endosperma y, en consecuencia, una disminución del extracto de malta (Edney, 1996). Además, el tamaño de grano pequeño generalmente se asocia a un bajo contenido de almidón y un alto contenido de proteína (Arends *et al.*, 1995; Burger y

LaBerge, 1985; Yu *et al.*, 2017), aunque los granos pequeños no necesariamente contienen más proteína que los granos más grandes (Magliano *et al.*, 2014).

A pesar de que estos atributos explican parte de la variabilidad observada en la calidad de la malta, a menudo se encuentran diferencias en el extracto de malta entre lotes de granos obtenidos de cultivos que se desarrollaron en diferentes campañas o ubicaciones (*i.e.* en diferentes ambientes), pero con contenido de proteína y tamaño de grano similares (Eagles *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 1996; Molina-Cano *et al.*, 2004). Esto sugiere que (i) otros atributos además del contenido de proteína y el tamaño del grano están afectando el desempeño del malteado medido como extracto de malta, y (ii) que estos otros atributos están influenciados por el ambiente explorado por los cultivos en el campo, muy probablemente durante el período de formación de los granos.

Las hordeínas, principales proteínas de almacenamiento de los granos de cebada, son parte de la matriz que rodea los gránulos de almidón en el endosperma. Por este motivo, se cree que están directamente involucrados en la relación negativa que existe entre el contenido de proteína y el extracto de malta (Slack *et al.*, 1979). Estas proteínas solubles en etanol se clasifican en hordeínas B, C, D y  $\gamma$ , según su movilidad electroforética en SDS-PAGE (Finnie y Svensson, 2014). A pesar de que se han realizado muchos estudios para comprender cómo se relacionan tanto el contenido como la composición de hordeínas con la calidad maltera, aún existen incertidumbres y contradicciones respecto a este tema (Savin, 2004; Shewry y Darlington, 2002). Si bien en la literatura puede encontrarse evidencia de la influencia negativa de las hordeína B (Baxter y Wainwright, 1979; Molina-Cano *et al.*, 2000a), C (Ferrari *et al.*, 2010; Janes y Skerritt, 1993; Peltonen *et al.*, 1994) y D (Howard *et al.*, 1996) sobre el extracto de malta, otros estudios ponen en duda dichas asociaciones (Brennan *et al.*, 1998; Prystupa *et al.*, 2019; Riggs y Gothard, 1976). Por ejemplo, Howard *et al.* (1996) recomendaron usar la

proporción de hordeína D, en lugar del contenido de proteína, para predecir la calidad maltera, luego de que encontraron que la relación negativa entre esta fracción de hordeína y el extracto de malta era consistente entre cultivares, campañas y disponibilidades de nitrógeno. Sin embargo, Brennan *et al.* (1998) no encontraron ninguna asociación entre el contenido de hordeína D y el extracto de malta cuando evaluaron líneas casi-isogénicas (NIL) que diferían solo en la presencia o ausencia de hordeína D.

Los azúcares fermentables obtenidos de la degradación del almidón contribuyen a la producción de extracto de malta. Por lo tanto, el rendimiento del malteado se ve afectado directamente por las propiedades del almidón (Evans *et al.*, 2009). En los granos maduros, el almidón representa hasta el 60-70% del peso del grano (Briggs, 1978; Harris, 1962) y se presenta en forma granular con una distribución de tamaño bimodal: (i) los gránulos tipo A son grandes y en forma de disco, y (ii) los gránulos tipo B son pequeños y esféricos (Trafford y Fincher, 2014). Las propiedades de pastificación del almidón, que se pueden medir observando cambios en la viscosidad según principios reológicos, se emplean a menudo para evaluar indirectamente la calidad maltera (Balet *et al.*, 2019). La proporción de los diferentes tipos de gránulos, su composición (*i.e.* la proporción de amilosa y amilopectina), su estructura y la asociación con otros compuestos, como lípidos y proteínas, son algunas de las características que afectan el comportamiento de pastificación del almidón de cebada (Ao y Jane, 2007; Juhász y Salgó, 2008; Tester y Morrison, 1990; Yalçın, 2010; Yanagisawa *et al.*, 2006).

A pesar de la relevancia de la composición de hordeínas y las propiedades de pastificación del almidón en la determinación de la calidad maltera, hasta donde sabemos, no existen estudios en la literatura que evalúen el efecto combinado de estos atributos, junto con el contenido de proteína y el tamaño de grano, sobre la calidad maltera. La consideración de todos estos factores en un mismo estudio permitiría evaluar posibles

interacciones en su efecto sobre la calidad maltera, explicando así resultados contradictorios entre reportes anteriores.

Tanto la composición de hordeínas (Molina-Cano *et al.*, 2001) como las características del almidón (Jaiswal *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 1994) varían entre genotipos y se ven fuertemente afectadas por el ambiente (Griffiths, 1987; Thitisaksakul *et al.*, 2012). Se demostró que la proporción de hordeínas B/C se correlaciona negativamente con la disponibilidad de nitrógeno (Griffiths, 1987; Kirkman *et al.*, 1982; Qi *et al.*, 2006; Savin *et al.*, 2006). Wei *et al.* (2009) encontraron que la temperatura posterior a antesis afectó significativamente la composición proteica y el número y morfología de los gránulos de almidón. Además, Passarella *et al.* (2008) encontraron que el nitrógeno interactúa con la temperatura explorada por el cultivo durante el llenado de granos, afectando la composición proteica del grano. La temperatura afecta la calidad maltera principalmente durante el período de formación del grano (Holm *et al.*, 2018; Mahalingam y Bregitzer, 2019). Sobre la base de que las diferentes fracciones de hordeínas (Rahman *et al.*, 1982) y componentes del almidón (Karlsson *et al.*, 1983; McDonald *et al.*, 1991) se forman en diferentes etapas de llenado de granos, la forma en que la temperatura explorada por el cultivo en el campo afecta cada uno de estos atributos relacionados con la calidad, dependería de la etapa de desarrollo del grano considerada. Por ejemplo, Rodríguez *et al.* (2001) y Gualano y Benech-Arnold (2009a) encontraron que la tasa de salida de la dormición del grano (y, concomitantemente, la susceptibilidad a sufrir brotado previo a cosecha, así como el momento de malteado después de la misma) depende, para muchos cultivares de cebada, de la temperatura media del aire explorada por la planta madre inmediatamente antes de la madurez fisiológica y dentro de una “ventana” de tiempo térmico delimitada con precisión.

Identificar aquellos períodos durante los cuales el ambiente térmico puede afectar la calidad maltera resultante, daría información sobre cómo se forma la calidad en el campo. Asimismo, una vez establecidas estas “ventanas de sensibilidad”, y conociendo la fecha de antesis y la temperatura media diaria durante el llenado de granos, los efectos negativos sobre la calidad podrían atenuarse mediante un adecuado manejo agronómico en el campo. En este sentido en el Capítulo 2 de la presente tesis se ha presentado un modelo de tiempo térmico preciso para el llenado de granos en cebada, que se puede utilizar para anclar las “ventanas de sensibilidad” dentro del llenado de granos (ver Capítulo 2).

Los objetivos de este capítulo fueron (i) detectar los atributos del grano determinantes de la calidad maltera medida como extracto de malta, (ii) determinar cuáles de esos atributos son susceptibles de ser modulados por el ambiente, específicamente, por la temperatura durante el llenado del grano, y (iii) identificar “ventanas de sensibilidad” a la temperatura dentro del llenado de granos, durante de las cuales el ambiente térmico afecta esos atributos y, en consecuencia, la calidad maltera. Sobre la base de estos hallazgos, se desarrollaron relaciones cuantitativas simples que pueden usarse para explicar en detalle cómo se determina el extracto de malta combinando datos fenológicos e información meteorológica.

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Generalidades y tratamientos**

Con el objetivo de generar variabilidad ambiental durante el llenado de granos, cuatro cultivares comerciales de cebada cervecera se sembraron en nueve fechas de siembra (desde óptima a subóptimas) a lo largo de tres campañas y bajo disponibilidades de nitrógeno contrastantes. Las fechas de siembra fueron las descritas en los capítulos 2

y 3 de la presente tesis, con dos adiciones: una siembra el 16 de septiembre de 2015 y otra el 12 de septiembre de 2018 (**Cuadro 2.1**).

Tal como fue descrito en los capítulos anteriores, con el objetivo de promover la variabilidad en el contenido de proteico de los granos, se asignaron disponibilidades de nitrógeno contrastantes. En las siembras de 2015, 2016 y 2017 las disponibilidades fueron de 85 (N1) y 170 (N2) kg N ha<sup>-1</sup>, mientras que en la siembra de 2018 se aplicó un único tratamiento de 200 kg N ha<sup>-1</sup> (N3) con el fin de cubrir de manera más completa el rango de contenido proteico logrado.

Debido a la ocurrencia de días consecutivos de fuertes lluvias durante la temporada de cosecha en 2015, las parcelas de los cultivares ABI Balster (1°, 2°, 3°-N1 y 5°-N1 siembras de 2015) y Andreia (1° y 5°-N2 siembras de 2015) sufrieron daños por pregerminado antes de la cosecha, por lo que no se realizaron los micromalteos y no se analizaron las propiedades de pastificación (**Cuadro 2.1**).

Los cultivares utilizados, el diseño experimental, el manejo del cultivo, las mediciones correspondientes al ambiente térmico explorado y a las determinaciones de fenología, se detallan en el capítulo 2 (ver sección 2.2.1).

## **4.2.2 Muestreos y mediciones**

### **4.2.2.1 Modelo de tiempo térmico**

El desarrollo del grano se evaluó mediante un modelo de tiempo térmico definido en el capítulo 2 de la presente tesis. Los parámetros correspondientes a dicho modelo se presentan en el **Cuadro 3.1**.

### **4.2.2.2 Cosecha y almacenamiento de muestras**

Las parcelas se cosecharon cuando los granos alcanzaron un contenido de humedad de aprox. 9% (base seca). Después de la cosecha, los granos se almacenaron a



ca. 4 °C hasta que se realizaron las correspondientes evaluaciones de calidad y el procedimiento de micromalteado.

#### **4.2.2.3 Contenido de proteína y tamaño de grano**

El contenido de nitrógeno de los granos se determinó al momento de la cosecha mediante el método Kjeldahl (Baethgen y Alley, 1989), y el contenido de proteína se calculó multiplicando el contenido de nitrógeno por un factor de 6.25 (Briggs, 1998). La proporción de las diferentes fracciones de tamaño de grano se determinaron mediante una zaranda eléctrica (Zonytest, Rey y Ronzoni, Argentina) con tres tamices de ranuras de 2.8, 2.5 y 2.2 mm de ancho, respectivamente. Se pasó una muestra de 100 g durante 1 min a través de los tamices. El calibre se calculó como la suma de las proporciones en peso retenidas por los tamices de 2.8 y 2.5 mm.

#### **4.2.2.4 Cuantificación de hordeínas**

La extracción de hordeínas se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por (Celus *et al.*, 2006). Brevemente, se molieron 300 mg de muestra de cebada liofilizada, se mezclaron enérgicamente con 1 ml de NaCl al 5% (p / v) durante 2 min a TA y se agitaron orbitalmente (200 rpm) durante 10 min a TA. La suspensión resultante se centrifugó (1500 G) durante 10 min a TA, y el sobrenadante (que contenía albúminas y globulinas) se descartó. La extracción se repitió dos veces más antes de que el sedimento se suspendiera en 1 ml de 1-propanol al 55% (v / v) con DTT al 0.75% (p / v) mediante mezclado durante 2 min a TA. La suspensión se colocó en un agitador orbital (200 rpm) durante 10 min a 55 °C y se centrifugó (1500 G) durante 10 min a TA. Se recogió el sobrenadante, que contenía las hordeínas, y se repitió la extracción dos veces más. Los sobrenadantes se combinaron, se filtraron a través de una membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm, y se almacenaron a -20 °C.

Para realizar la cuantificación de las hordeínas, se cargó una alícuota (80 µl) del extracto en una columna C8 (Zorbax SB C8 300 Å) en un equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento (fase inversa, Agilent serie 1100). El sistema de elución consistió en ácido trifluoroacético al 0.1% en agua desionizada (eluyente 1) y ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo (eluyente 2). Las proteínas se separaron en un gradiente de eluyente 2 (del 24% al 56%) durante 50 min y se detectaron a 214 nm con un detector de UV (Wieser *et al.*, 1998). Los resultados de los análisis de hordeínas quedan a disposición de quien los precise en el **Cuadro A.2**.

La cantidad de cada subunidad de hordeína se expresó tanto en unidades porcentuales con respecto al total de hordeínas, como en unidades arbitrarias (UA) por gramo de materia seca de grano.

#### **4.2.2.5 Propiedades de pastificación**

Las propiedades de pastificación se evaluaron con un Rapid Visco Analyzer (RVA-S4, Newport Scientific, Australia). Como la cantidad de muestra disponible para realizar el análisis de RVA era escasa, se combinaron muestras de subparcelas con el mismo tratamiento. Para realizar el análisis se molieron las muestras (4.0 g) en un molino Cyclotec y se suspendieron en una solución de AgNO<sub>3</sub> 0.2 mM (Glennie-Holmes, 1995; Zhou y Mendham, 2005). Se empleó el perfil estándar de RVA (STD1): temperatura inicial ajustada a 50 °C; mantenimiento a 50 °C durante 1 min; calentamiento a 95 °C durante 3.7 min; mantenimiento a 95 °C durante 2.5 min; enfriamiento a 50 °C durante 3.8 min; y, por último, mantenimiento a 50 °C durante 2 min. Las mediciones de RVA fueron: viscosidad máxima (viscosidad más alta durante el calentamiento); tiempo para alcanzar la viscosidad máxima; viscosidad de caída (viscosidad más baja después del inicio del enfriamiento); estabilidad (viscosidad máxima menos viscosidad de caída); viscosidad final (viscosidad máxima después de que la temperatura haya vuelto a 50 °C);

retrogradación (viscosidad final menos viscosidad de caída); temperatura de pastificación (temperatura cuando la tasa de aumento de la viscosidad alcanza 11.5 RVU en 0.2 min). Cada uno de los parámetros mencionados anteriormente se calcularon de acuerdo con la definición estándar RVA-S4, con la excepción de la temperatura de pastificación, que se redefinió siguiendo lo establecido por Zhou y Mendham (2005).

#### **4.2.2.6 Micromalteo y análisis de malta**

El micromalteo se realizó en Maltería y Cervecería Quilmes (Tres Arroyos, Argentina) en 2015, y en el Laboratorio de Calidad de Malta y Cebada de la Estación Experimental Agrícola Bordenave del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina) en 2016, 2017 y 2018. Una muestra de 250 g de grano de cebada retenidos por un tamiz de 2.5 mm fue malteada en un sistema automático de micromalteo (Phoenix Systems, Kingswood, Australia del Sur). Brevemente, la muestra se maceró durante 25 h (alternancia de maceración húmeda y seca) a 15 °C, germinaron durante 96 h a 15 °C y finalmente se secaron durante 18 h con un aumento gradual de temperatura de 50 a 82 °C. Después del malteado se eliminaron manualmente las raíces y los brotes. La malta se molió utilizando un molino de discos DLFU (Bühler GmbH, Alemania) y el extracto de malta se determinó de acuerdo con Analytica-EBC (1998), método 4.5.1. En las rutinas de micromalteo realizadas se midieron otras variables que complementan al extracto de malta a la hora de caracterizar la calidad maltera. Si bien los mismos no fueron objeto de análisis en la presente tesis, quedan a disposición de quien los precise en el **Cuadro A.1**.

#### **4.2.3 Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de regresión múltiple con el fin de desarrollar modelos cuantitativos para el extracto de malta considerando múltiples variables predictivas. Previo a la selección del modelo, se realizó un análisis exploratorio de datos, graficando

la relación entre el extracto y cada variable candidata por separado, para evaluar si alguna presentaba evidencia que sugiera una relación que no sea lineal. Siendo que el extracto mostró una respuesta bilineal frente a la proteína, se ajustó una regresión bilineal con mínimos cuadrados no lineales (similar la citada en la sección 2.2.2.2 para describir el llenado de granos; Ec. 2.1). Los parámetros de dichos modelos se dejaron variar o se fijaron para cada cultivar, y ambas opciones se compararon mediante pruebas de verosimilitud para detectar si alguno de los modelos presentó una diferencia significativa (valor  $p < 0.05$ ), indicando cuáles de los parámetros de la regresión difirieron entre cultivares.

La selección del modelo se realizó mediante pruebas de verosimilitud comparando diferentes las variables candidatas y considerando un valor  $p$  de 0.05. Se partió de un modelo incluyendo solo el efecto de la proteína y el cultivar, y secuencialmente se fueron agregando el resto de las variables, evaluando efectos simples e interacciones con el resto, siguiendo el siguiente orden: contenido de proteína, cultivar, calibre, propiedades de pastificación, hordeínas en valores absolutos y proporciones. Al llegar al modelo final, el mismo se evaluó con el Criterio de Información de Akaike (AIC) bidireccional, confirmando que no correspondía retirar ni reemplazar ninguna variable del modelo. Finalmente, siendo que es de interés el efecto de las atributos del grano independientemente del cultivar, el modelo se reajustó como un modelo de efectos mixtos, con el cultivar como efecto aleatorio, para obtener los coeficientes de la regresión promedio de todos los cultivares.

Los valores de las subparcelas se promediaron en una sola observación para cada combinación de tratamiento específica. Dado que en el análisis exploratorio de datos se encontraron altos niveles de correlación entre las mediciones de RVA dentro de cada muestra, se realizó una preselección considerando un umbral de  $|r| > 0.7$  para el

coeficiente de correlación entre variables (Dormann *et al.*, 2013). Se aplicó un criterio de preselección similar para el análisis de hordeínas, que también presentó cierto nivel de correlación. Asimismo, siendo que inicialmente algunas de las variables explicativas candidatas presentaban algún grado de asociación, se evaluó el Factor de Inflación de Varianza (VIF, por sus siglas en inglés) del modelo final, confirmando la ausencia de multicolinealidad entre las variables seleccionadas.

Para evaluar el efecto de la temperatura explorada por los cultivos durante el llenado de granos sobre los atributos del grano que afectan la calidad maltera, se realizó un análisis de correlación siguiendo la metodología utilizada por Rodríguez *et al.* (2001) y Gualano y Benech-Arnold (2009a). Brevemente, para cada cultivar, el tiempo térmico desde la polinización y hasta la madurez fisiológica se dividió arbitrariamente en intervalos de 50, 75, 100, 125, 150 y 200 °Cd. Se realizaron análisis de correlación y regresión entre la temperatura media de cada intervalo y aquellos atributos del grano para los que se encontró un efecto significativo sobre el extracto de malta. Un intervalo con sensibilidad a la temperatura para la determinación de la calidad maltera (*i.e.* una ventana de sensibilidad) sería el que muestra una correlación significativa entre la temperatura y cualquier atributo del grano relacionado con la calidad. En concordancia con Rodríguez *et al.* (2001), y considerando las múltiples comparaciones realizadas a lo largo del análisis, se utilizó un alfa de 0.0001 para evitar cometer un error de Tipo I. Para evaluar la conveniencia de considerar intervalos acotados de tiempo térmico, en lugar del período de llenado de granos completo, también se realizó el análisis de correlación empleando la temperatura media para toda la fase. Dado que el desarrollo de un modelo general para la cebada cervecera fue un objetivo principal de este trabajo, para aquellas ventanas de sensibilidad comunes a todos los cultivares, los modelos se reajustaron considerando el tratamiento del cultivar como un efecto aleatorio, con el fin de obtener pendientes

promedio. Cabe aclarar que no se analizó la existencia de ventanas de sensibilidad durante el llenado de granos para la determinación del contenido de proteína, ya que se asumió que es un atributo del grano altamente dependiente de otros factores (fundamentalmente la relación entre disponibilidad de nitrógeno y el rendimiento, y el momento en que el nitrógeno se hace disponible; Prystupa y Ferraris, 2011). Hay modelos publicados de fácil aplicación y muy buen ajuste que permiten explicar el contenido de proteína a partir de dichos factores (Prystupa y Ferraris, 2011).

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de sendero considerando el cultivar como un efecto aleatorio, con el fin de construir un modelo general de causa-efecto entre la temperatura media explorada durante las ventanas de sensibilidad, los atributos del grano determinantes de la calidad maltera y el extracto de malta.

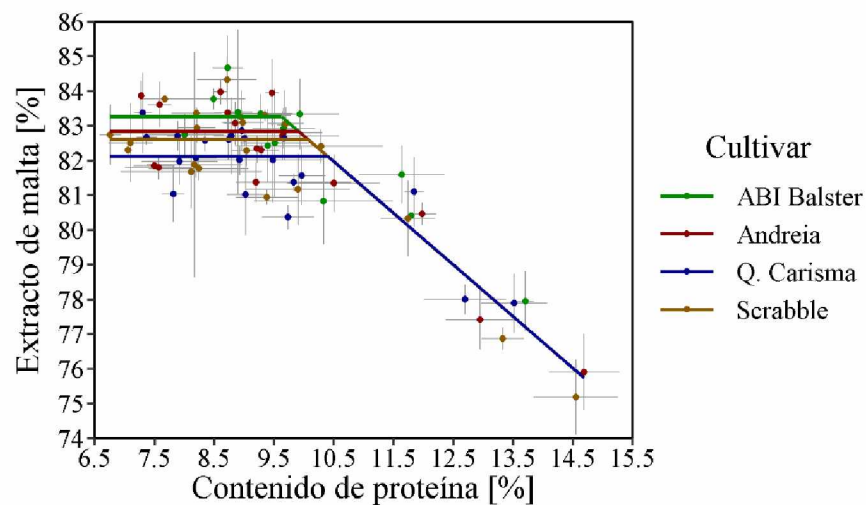
Todos los cálculos y análisis se realizaron utilizando el lenguaje de programación y el entorno R (R Core Team, 2018).

### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Análisis exploratorio de los atributos del grano que determinan el extracto de malta.**

Considerando todas las combinaciones de tratamientos, el extracto de malta varió entre 75.2% y 84.8% (**Cuadro 4.1**). El cultivar tuvo un efecto significativo en el extracto de malta en 5 de las 11 fechas de siembra, aunque la variedad que mostró el mejor desempeño varió dependiendo de la fecha de siembra considerada (**Cuadro 4.1**). Por otro lado, la disponibilidad de nitrógeno tuvo un efecto significativo en 5 de las 10 fechas de siembra (**Cuadro 4.1**). Haciendo un promedio de esas siembras, y considerando todos los cultivares, el extracto de malta fue un 1% más alto en las parcelas del tratamiento N1, en comparación con aquellas del tratamiento N2 (**Cuadro 4.1**). La interacción cultivar por nitrógeno no fue significativa para ninguna fecha de siembra (**Cuadro 4.1**).

Al promediar entre fechas de siembra, y considerando sólo los niveles N1 y N2 del tratamiento de nitrógeno (el nivel N3 sólo se incluyó en una fecha de siembra, y sin los otros dos niveles de referencia), el contenido de proteína aumentó significativamente junto con la disponibilidad de nitrógeno (**Cuadro 4.2**). El calibre, por otro lado, solo dependió del cultivar, con Q. Carisma presentando los mayores valores (**Cuadro 4.2**). La cantidad de todas las fracciones de hordeínas aumentaron significativamente con la disponibilidad de nitrógeno, y solo la cantidad de hordeínas gamma dependió también del cultivar, con Scrabble y ABI Balster presentando los mayores y menores valores, respectivamente (**Cuadro 4.2**). La proporción de cada fracción de hordeína, así como la relación de hordeínas B/C, dependieron solo del cultivar, con la excepción del porcentaje de hordeína C, que, al igual que la relación D/B, fue independiente tanto de la



**Figura 4.1.** Extracto de malta en función del contenido de proteína de los granos para los cuatro cultivares evaluados en el presente estudio. Se ajustó una función bilineal con un punto de quiebre diferente para cada cultivar. Cada punto es el promedio de tres subparcelas. Las barras de error muestran las desviaciones estándar.

disponibilidad de nitrógeno como del cultivar (**Cuadro 4.2**). Por otro lado, también considerando el promedio de todas las siembras, todas las propiedades de pastificación medidas con RVA fueron afectadas únicamente por el cultivar, con la excepción de la estabilidad, que no dependió de este factor ni de la disponibilidad de nitrógeno (**Cuadro 4.3**).

Se encontró una asociación negativa entre el contenido de proteína y el extracto de malta. Dicha relación se describió con mayor precisión utilizando una función bilineal con un *plateau*, en lugar de un ajuste lineal (**Figura 4.1**). La pendiente y la ordenada al origen de la regresión fueron comunes a todos los cultivares. Sin embargo, el punto de quiebre varió significativamente entre cultivares ( $p < 0.05$ ) y correspondió a un contenido de proteína de 9.6, 9.9, 10.1 y 10.4% para ABI Balster, Andreia, Scrabble y Q. Carisma, respectivamente (**Figura 4.1**). Este tipo de respuesta sugiere que el contenido de proteínas explicó una gran parte de la variación observada en el extracto de malta por encima del punto de quiebre, pero tuvo poco o ningún efecto por debajo del mismo. Para dar cuenta de esta relación no lineal en el análisis, se creó una variable indicadora con dos niveles, de manera que se discriminaran los datos ubicados por debajo del umbral proteico de aquellos ubicados por encima del mismo. Así, el contenido de proteínas se incluyó en el modelo como variable cuantitativa e indirectamente como variable indicadora. En lo que respecta al resto de las variables candidatas, no se observó una tendencia que sugiera una respuesta que no sea lineal. Algunas fracciones de hordeína presentaron una alta correlación entre sí y con el contenido de proteína (**Cuadro 4.4**). Para evitar la multicolinealidad, solo se consideraron en el análisis las fracciones de hordeínas D y  $\gamma$  (ambas medidas en unidades arbitrarias y en unidades porcentuales), y la relación B/C. Se encontró un comportamiento similar para algunas de las variables RVA (**Cuadro 4.5**); por lo tanto, solo la viscosidad máxima, la temperatura de pastificación y el tiempo hasta la viscosidad máxima se consideraron como variables candidatas en el procedimiento de selección del modelo. De esta forma, las variables explicativas candidatas iniciales fueron: cultivar, contenido de proteína, calibre, temperatura de pastificación, viscosidad máxima, tiempo hasta viscosidad máxima, cantidad de hordeínas D y  $\gamma$ , proporción de hordeínas D y  $\gamma$ , y relación de hordeínas B/C.



**Cuadro 4.1.** Extracto de malta para cultivares (C) de cebada sembrados en diferentes fechas (FS) y cultivadas bajo disponibilidades de nitrógeno (N) contrastantes. El resultado del análisis de varianza realizado para cada fecha de siembra por separado se muestra en la parte inferior de la tabla. Las letras, obtenidas mediante la prueba de Tukey, indican la comparación de medias de la combinación de cultivar por disponibilidad de nitrógeno para cada fecha de siembra.

C	N	FS										
		02/06/2015	24/06/2015	17/07/2015	02/09/2015	16/09/2015	24/06/2016	16/08/2016	22/09/2016	04/07/2017	18/08/2017	12/09/2018
		[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
ABI Balster	N1				82.7 b		83.3 a	82.4 a	80.9 c	84.8 b	83.4 a	
	N2			83.8 b	82.5 ab	80.8 a	82.9 a	81.5 a	77.9 bc	82.9 ab	83.3 a	
	N3											81.6 a
Andreia	N1		83.9 c	83.6 ab	81.8 ab	81.7 a	82.8 a	82.3 a	77.4 ab	83.1 ab	83.5 a	
	N2		83.4 bc	84.0 b	81.4 ab		82.7 a	81.4 a	75.9 ab	82.3 a	83.9 a	
	N3											80.5 a
Q. Carisma	N1	81.0 a	82.7 ab	82.7 a	82.0 ab	82.1 a	81.0 a	82.0 a	78.0 bc	82.6 ab	82.9 a	
	N2	83.4 a	82.6 ab	82.6 a	80.4 a	81.4 a	82.0 a	81.6 a	77.9 bc	82.8 a	82.6 a	
	N3											81.1 a
Scrabble	N1	82.7 a	82.3 a	83.8 b	81.7 ab	81.8 a	81.9 a	83.2 a	76.9 ab	83.4 ab	84.3 a	
	N2	82.5 a	82.9 ac	83.3 ab	80.9 ab	81.2 a	83.1 a	82.4 a	75.2 a	82.3 a	83.1 a	
	N3											80.3 a
	Bloque	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	C	ns	**	**	*	ns	ns	ns	**	*	ns	ns
	N	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	**	**	ns	ns
	C*N	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

\* p < 0.05; \*\* p < 0.01, ns: no significativo

**Cuadro 4.2.** Efecto del cultivar (C) y la disponibilidad de nitrógeno (N) sobre el contenido de proteína (P), el calibre (CA) y la cantidad de cada fracción de hordeína, expresada en término absolutos (UA g<sup>-1</sup>) y relativos (%). Las letras, obtenidas mediante la prueba de Tukey, indican la comparación de medias de la combinación de cultivar por disponibilidad de nitrógeno. Se omitió el nivel de disponibilidad de nitrógeno N3 por no incluirse junto con los otros dos niveles en la siembra correspondiente. HB a HG: contenido de hordeína B, C, D y  $\gamma$  medido en unidades arbitrarias, respectivamente; PB a PG: contenido de hordeína B, C, D y  $\gamma$  medido en unidades porcentuales, respectivamente; BC: relación de hordeínas B/C; DB: relación de hordeínas D/B.

C	N	P	CA	HB	HC	HD	HG	PB	PC	PD	PG	BC	DB
		[%]	[%]	[UA g <sup>-1</sup> ]	[UA g <sup>-1</sup> ]	[UA g <sup>-1</sup> ]	[UA g <sup>-1</sup> ]	[%]	[%]	[%]	[%]		
ABI Balster	N1	8.7 ab	82.4 ab	31515 ab	11822 ab	1587 ab	970 a	69.3 a	24.9 c	3.6 a	2.2 ab	3.0 ab	0.052 a
	N2	10.1 b	79.9 a	41873 c	16739 ab	1980 b	942 a	69.0 a	26.0 c	3.4 a	1.6 a	2.9 a	0.049 a
Andreia	N1	8.8 ab	89.2 ac	30096 a	10616 a	1387 a	1474 ab	71.3 a	21.9 ac	3.3 a	3.6 c	4.1 ab	0.047 a
	N2	9.7 ab	90.4 bc	37935 ac	14323 ab	1943 ab	1647 b	70.1 a	23.1 bc	3.6 a	3.2 bc	3.6 ab	0.051 a
Q. Carisma	N1	8.8 ab	94.1 c	34773 ac	10692 ab	1599 ab	1081 ab	73.7 a	20.5 ac	3.5 a	2.3 ab	4.1 ab	0.047 a
	N2	9.6 ab	91.4 bc	41337 c	12916 b	1999 b	1237 ab	73.6 a	20.6 ac	3.6 a	2.2 ab	4.7 ab	0.049 a
Scrabble	N1	8.4 a	85.3 ac	30390 a	7858 a	1597 ab	2532 c	72.7 a	17.1 a	3.9 a	6.3 d	5.0 b	0.054 a
	N2	9.7 ab	85 ab	40480 bc	11290 ab	1938 ab	3180 d	72.6 a	17.9 ab	3.6 a	5.9 d	4.9 b	0.049 a
Bloque		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C		ns	**	ns	*	ns	**	**	**	ns	**	**	ns
N		**	ns	**	**	**	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C*N		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

\* p < 0.05; \*\* p < 0.01, ns: no significativo

**Cuadro 4.3.** Efecto del cultivar (C) y la disponibilidad de nitrógeno (N) sobre los parámetros obtenidos del análisis de RVA. Las letras, obtenidas mediante la prueba de Tukey, indican la comparación de medias de la combinación de cultivar por disponibilidad de nitrógeno. Se omitió el nivel de disponibilidad de nitrógeno N3 por no incluirse junto con los otros dos niveles en la siembra correspondiente. VM: Viscosidad máxima; VC: Viscosidad de caída; VF: Viscosidad final; ES: Estabilidad; RE: Retrogradación; TVM: Tiempo hasta alcanzar la viscosidad máxima; TP: Temperatura de pastificación.

C	N	VM	VC	VF	ES	RE	TVM	TP
		[cP]	[cP]	[cP]	[cP]	[cP]	[min]	[°C]
ABI Balster	N1	4021 b	2351 c	4612 c	1670 a	2261 b	5.9 a	66.98 a
	N2	3950 b	2316 c	4500 c	1635 a	2184 b	5.98 a	67.01 a
Andreia	N1	3832 ab	2116 ac	4139 bc	1716 a	2024 ab	5.82 a	67.58 a
	N2	3758 ab	2161 bc	4111 ac	1596 a	1950 ab	5.98 a	67.51 a
Q. Carisma	N1	3534 ab	1910 ab	3856 ab	1623 a	1946 ab	5.76 a	67.78 a
	N2	3633 ab	1983 ab	3951 ab	1650 a	1968 ab	5.78 a	67.79 a
Scrabble	N1	3455 a	1869 a	3594 a	1586 a	1725 a	5.87 a	68.18 a
	N2	3500 ab	1951 ab	3668 ab	1549 a	1717 a	5.94 a	68.26 a
C		**	**	**	ns	**	*	*
N		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C*N		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

\* p < 0.05; \*\* p < 0.01, ns: no significativo

**Cuadro 4.4.** Matriz de correlación entre el contenido de proteína, el contenido total de hordeínas, el contenido de fracciones de hordeínas expresado en términos absolutos (AU g<sup>-1</sup>) y relativos (%), y proporciones entre hordeínas. P: contenido de proteína; HT: contenido total de hordeína; HB a HG: contenido de hordeína B, C, D y  $\gamma$  medido en unidades arbitrarias, respectivamente; PB a PG: contenido de hordeína B, C, D y  $\gamma$  medido en unidades porcentuales, respectivamente; BC: relación de hordeínas B/C; DB: relación de hordeínas D/B.

	P	HT	HB	HC	HD	HG	PB	PC	PD	PG	BC	DB
P	1.00											
HT	0.98**	1.00										
HB	0.94**	0.98**	1.00									
HC	0.95**	0.95**	0.86**	1.00								
HD	0.65**	0.70**	0.75**	0.54**	1.00							
HG	0.22	0.22	0.23	0.09	0.27*	1.00						
PB	-0.73**	-0.70**	-0.55**	-0.85**	-0.32**	-0.14	1.00					
PC	0.75**	0.73**	0.59**	0.88**	0.28*	-0.09	-0.96**	1.00				
PD	-0.50**	-0.47**	-0.40**	-0.57**	0.27*	0.02	0.55**	-0.64**	1.00			
PG	-0.34**	-0.33**	-0.32**	-0.41**	-0.16	0.78**	0.25*	-0.50**	0.28*	1.00		
BC	-0.59**	-0.57**	-0.44**	-0.72**	-0.18	0.12	0.86**	-0.90**	0.57**	0.46**	1.00	
DB	-0.29*	-0.27*	-0.25*	-0.32**	0.43**	0.09	0.21	-0.35**	0.93**	0.23*	0.30*	1.00

\* p < 0.05; \*\* p < 0.01, ns: no significativo

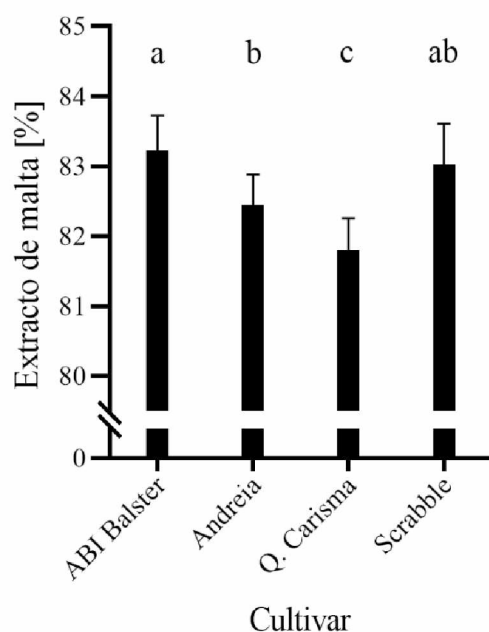
**Cuadro 4.5.** Matriz de correlación entre los parámetros obtenidos del análisis de RVA. VM: Viscosidad máxima; VC: Viscosidad de caída; VF: Viscosidad final; ES: Estabilidad; RE: Retrogradación; TVM: Tiempo hasta alcanzar la viscosidad máxima; TP: Temperatura de pastificación.

	VM	VC	VF	ES	RE	TVM	TP
VM	1.00						
VC	0.84**	1.00					
VF	0.86**	0.92**	1.00				
ES	0.78**	0.31**	0.44**	1.00			
RE	0.75**	0.71**	0.93**	0.49**	1.00		
TVM	-0.29*	0.13	-0.13	-0.64**	-0.35**	1.00	
TP	-0.63**	-0.54**	-0.72**	-0.47**	-0.78**	0.48**	1.00

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , ns: no significativo

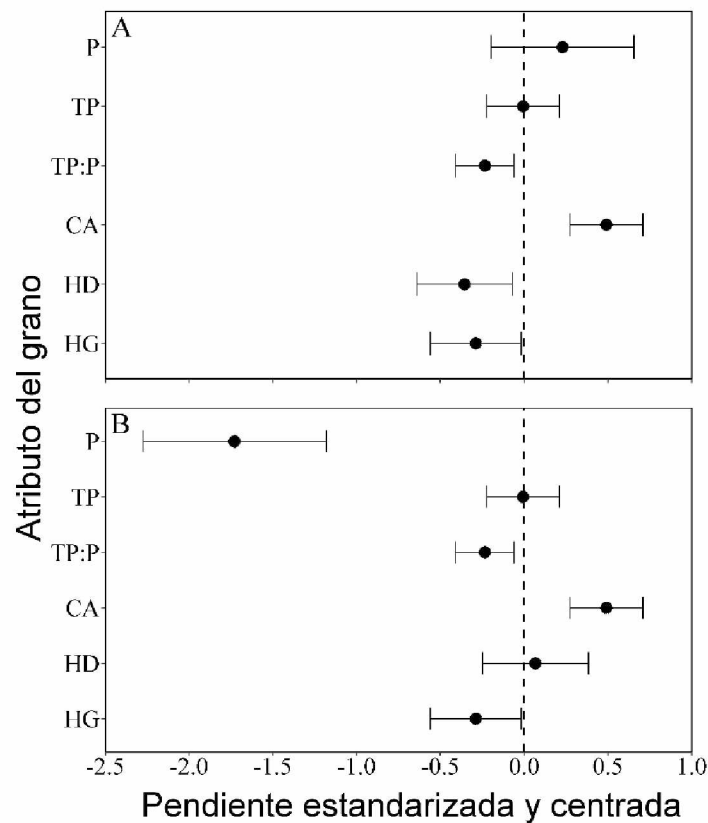
#### 4.3.2 Atributos del grano que afectan al extracto de malta

Según el análisis de regresión múltiple, las diferencias entre cultivares fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ), con ABI Balster presentando el extracto de malta promedio más alto, seguido por Scrabble, Andreia y Q. Carisma, respectivamente (**Figura 4.2**).



**Figura 4.2.** Extracto de malta promedio para cada uno de los cultivares evaluados en el presente estudio. Las barras de error muestran el intervalo de confianza (95%). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey.

El procedimiento de selección resultó en un modelo de regresión que incluyó múltiples atributos de granos, algunos de los cuales presentaron un efecto significativo solo en un rango específico de contenido de proteína (**Figura 4.3**). Por debajo del umbral de proteína, el calibre tuvo un efecto positivo significativo sobre el extracto de malta, mientras que las cantidades de hordeínas D y  $\gamma$  se correlacionaron negativamente con dicha variable (**Figura 4.3A**). El contenido de proteína y la temperatura de pastificación, por otro lado, no mostraron efectos principales significativos sobre el extracto de malta, aunque se encontró una interacción significativa entre estas dos variables ( $p < 0.05$ ; **Figura 4.3A**). Cabe señalar que los coeficientes de regresión presentados en la **Figura 4.3** están estandarizados y centrados, por lo que los efectos principales cuando la interacción es significativa deben interpretarse como el efecto de una variable cuando la otra se encuentra en su valor medio.



**Figura 4.3.** Pendientes estandarizadas del análisis de regresión múltiple que describe el extracto de malta en función de una serie de atributos del grano, por debajo (A) y por encima (B) del valor umbral de contenido de proteína. Las barras muestran el intervalo de confianza (95%) de cada estimación. La línea de puntos vertical indica el cero (*i.e.* no estadísticamente significativo). P: Contenido de proteína; TP: Temperatura de pastificación; CA: Calibre; HD: Hordeína D; HG: Hordeína  $\gamma$ .

Por otro lado, por encima del umbral proteico el efecto de la hordeína D no fue significativo, mientras que el contenido proteico presentó un efecto significativo sobre el extracto de malta ( $p < 0.01$ ; **Figura 4.3B**). El efecto del resto de las variables, así como la interacción entre el contenido de proteína y la temperatura de pastificación, se mantuvo sin cambios con respecto a lo encontrado por debajo del umbral de proteína (**Figura 4.3B**).

En general, el modelo explicó el 92% de la variabilidad observada en el extracto de malta (*i.e.*  $r^2$  condicional). Si se consideran solo los efectos fijos (*i.e.*  $r^2$  marginal, teniendo en cuenta todas las variables del modelo final menos el cultivar, que se consideró

un efecto aleatorio), el modelo explicó el 85% de la variabilidad observada en el extracto de malta. Cabe señalar que las tres variables candidatas analizadas por RVA presentaron un efecto significativo cuando se incluyeron en el modelo individualmente, pero no cuando se incluyeron juntas (lo que indica cierto grado de multicolinealidad entre dichas variables). Sin embargo, la temperatura de pastificación fue la única variable candidata del RVA que no presentó interacción con el tratamiento del cultivar y, en consecuencia, se seleccionó en lugar de las demás. Cuando las hordeínas D y  $\gamma$  se midieron en unidades porcentuales, no presentaron ningún efecto significativo sobre el extracto de malta. La relación de hordeínas B/C tampoco presentó un efecto significativo sobre el extracto de malta. El VIF del modelo final indica que no ninguna de las variables explicativas incluidas presentó multicolinealidad (*i.e.* VIF < 5 para todas las variables).

#### **4.3.3 Ventanas de sensibilidad para la modulación ambiental de los atributos del grano que afectan el extracto de malta**

Para determinar si la temperatura durante el período de formación de los granos tiene un efecto significativo en las variables que definen el extracto de malta, se realizó un análisis de correlación entre la temperatura media explorada por los cultivos durante una serie de ventanas de tiempo térmico definidas arbitrariamente dentro del llenado de granos, y aquellos atributos del grano que demostraron tener un efecto significativo sobre el extracto de malta.

Se encontró una correlación negativa entre el calibre y la temperatura media, especialmente durante la segunda mitad del llenado de granos (**Figura 4.4; Cuadro 4.6**). Dicha correlación fue consistente en los cuatro cultivares, con poca variación en la ubicación relativa de la ventana de tiempo térmico (**Cuadro 4.6**). Asimismo, se encontró una asociación positiva entre la temperatura de pastificación y la temperatura media explorada por el cultivo para los cuatro cultivares, particularmente alrededor de la mitad

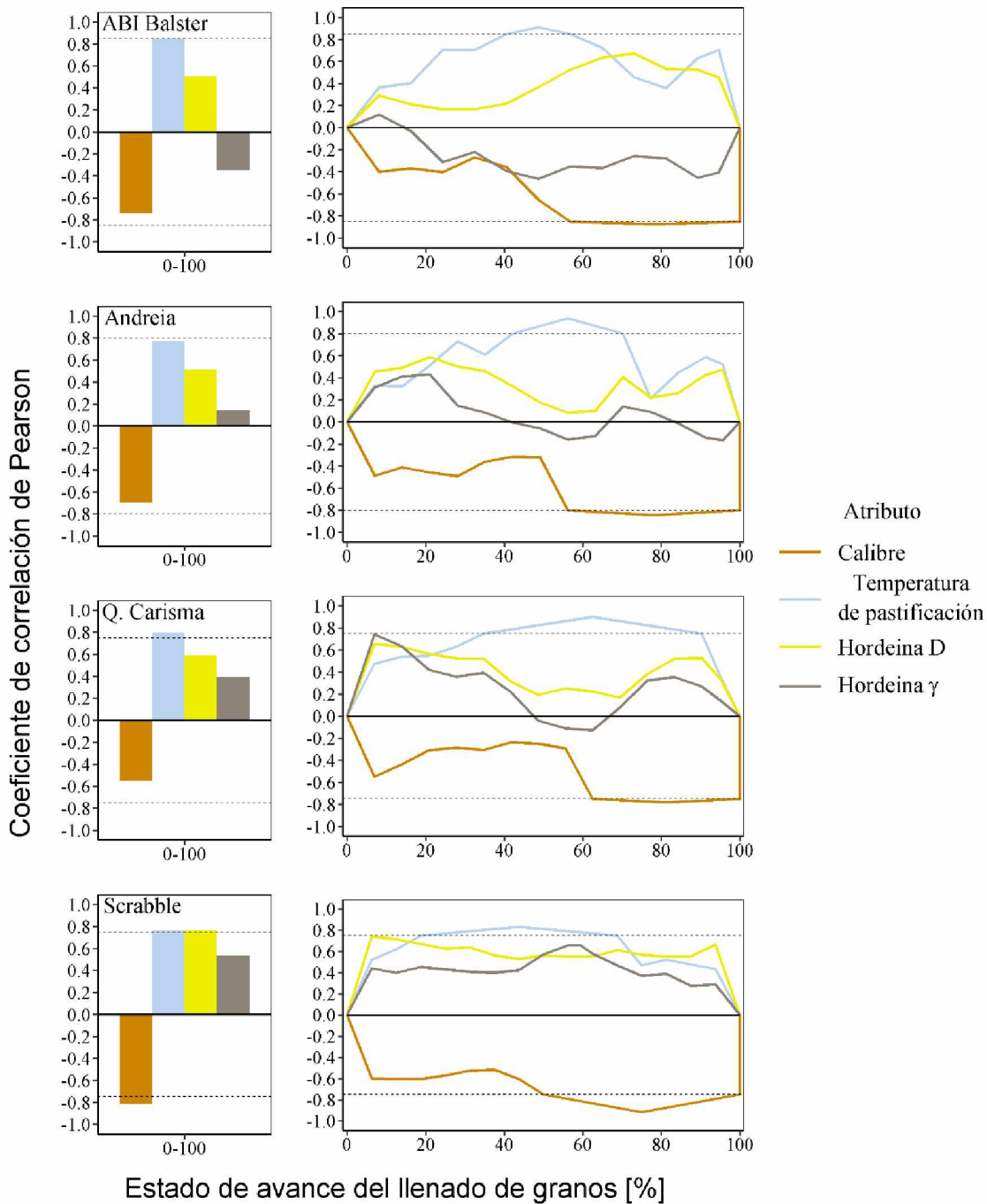
del llenado del grano (**Figura 4.4; Cuadro 4.6**). Haciendo un promedio de los cultivares, las ventanas de sensibilidad para la determinación de temperatura de pastificación y del calibre se ubicaron entre *ca.* 35 y 70%, y entre *ca.* 55 y 100% de estado de avance de desarrollo de los granos hacia madurez fisiológica, respectivamente. No se encontraron correlaciones significativas para las hordeínas D y  $\gamma$ .

Cuando se utilizó la temperatura media correspondiente a todo el período de llenado de granos como variable independiente para calcular los coeficientes de correlación, hubo una asociación negativa con calibre. Sin embargo, la asociación fue significativa solo para el cultivar Scrabble, y fue más débil que la encontrada para la ventana de sensibilidad correspondiente (**Figura 4.4; Cuadro 4.6**). Asimismo, se encontró una correlación con la temperatura de pastificación al considerar el período completo de llenado de granos, pero la misma fue significativa solo para los cultivares Scrabble y Q. Carisma. En ambos casos, la temperatura media durante sus respectivas ventanas de sensibilidad presentó un mejor ajuste que la temperatura media del período completo de llenado de granos. Por otro lado, se encontró para el cultivar Scrabble una asociación positiva significativa entre la cantidad de hordeína D y la temperatura media del período completo de llenado de granos (**Figura 4.4; Cuadro 4.6**).

El efecto de la temperatura explorada durante la ventana de sensibilidad sobre la temperatura de pastificación varió entre cultivares ( $p < 0.05$ ), con pendientes de regresión de 0.63, 0.58, 0.50 y 0.39 °C °C<sup>-1</sup> para Q. Carisma, Andreia, ABI Balster y Scrabble, respectivamente (**Figura 4.5A**). En general, el modelo de regresión explicó el 81% de la variabilidad observada en la temperatura de pastificación. Cabe señalar que, debido a la interacción entre la temperatura de pastificación y el contenido de proteína sobre el extracto de malta, la magnitud del efecto de la temperatura explorada por el cultivo durante esta ventana de sensibilidad sobre el extracto de malta debe evaluarse



considerando el contenido de proteína correspondiente (**Figura 4.6**). Así, valores más altos de temperatura de pastificación, que se explican por temperaturas más altas durante la ventana de sensibilidad correspondiente, resultaron en mayores o menores caídas en el extracto de malta, dependiendo del contenido de proteína considerado (**Figura 4.6**).

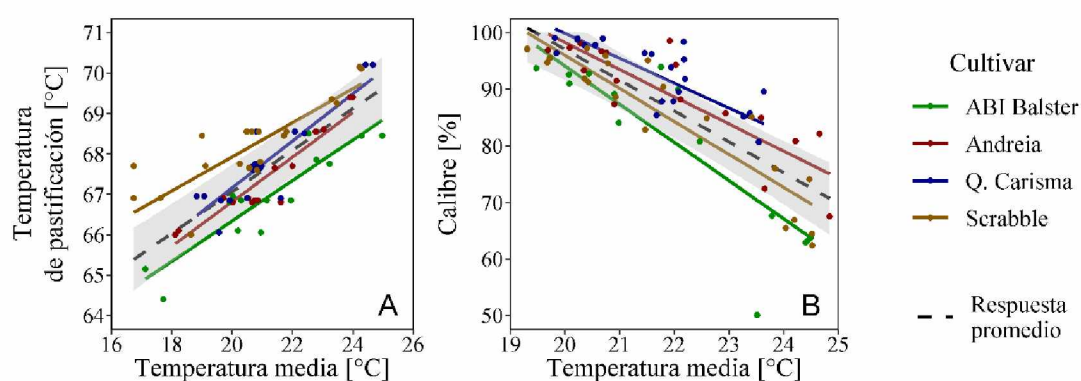


**Figura 4.4.** Coeficiente de correlación de Pearson del análisis de correlación entre los atributos del grano y la temperatura media explorada por los cuatro cultivares durante el llenado de granos completo (izquierda) y breves intervalos de tiempo térmico ubicados a lo largo del llenado de granos (derecha). Con el objetivo de realizar comparaciones entre cultivares, se muestra el estado de desarrollo del grano en una escala relativa, donde 0% es polinización y 100% es madurez fisiológica. Las líneas horizontales discontinuas muestran el coeficiente mínimo para que la asociación sea significativa ( $p < 0.0001$ ).

**Cuadro 4.6.** Intervalo de tiempo térmico desde polinización que presentó la mayor correlación entre cada atributo del grano y la temperatura media, junto con la ubicación relativa y el coeficiente de correlación para dicho intervalo, y considerando la temperatura media del período completo de llenado de granos. CA: Calibre; HD: Hordeína D; HG: Hordeína  $\gamma$ ; TP: Temperatura de pastificación.

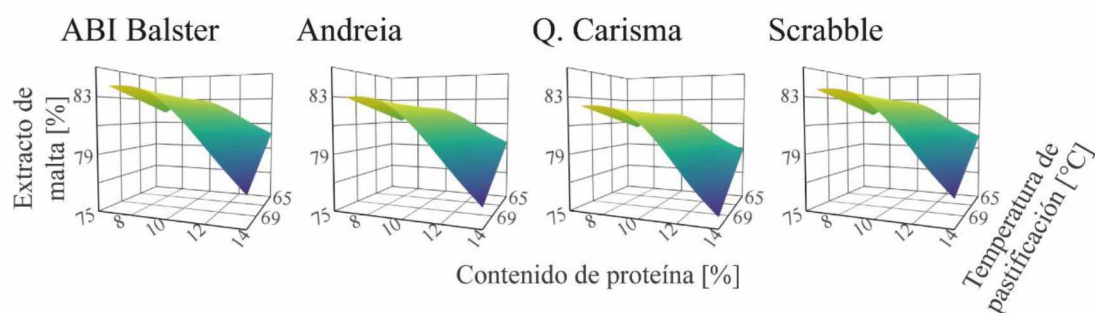
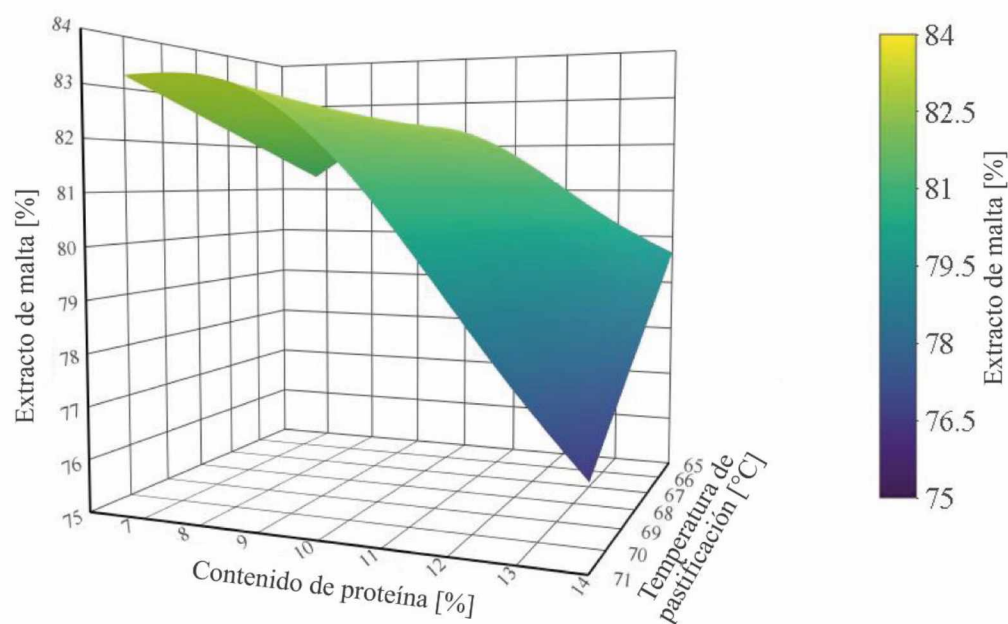
Cultivar	Atributo	Intervalo de tiempo térmico [°Cd]	Ubicación relativa del intervalo [%]	Coeficiente de correlación (r)	
				Considerando el intervalo de tiempo térmico	Considerando todo el llenado de granos
ABI Balster	CA	175-308	57-100	-0.87*	-0.75
	HD	175-275	57-89	0.67	0.51
	HG	125-175	41-57	-0.46	-0.35
	TP	125-175	41-57	0.91*	0.85
Andreia	CA	200-356	56-100	-0.85*	-0.70
	HD	50-100	14-28	0.59	0.52
	HG	50-100	14-28	0.43	0.14
	TP	150-250	42-70	0.94*	0.77
Q. Carisma	CA	225-360	62-100	-0.78*	-0.55
	HD	0-50	0-14	0.66	0.59
	HG	0-50	0-14	0.74	0.40
	TP	125-325	35-90	0.90*	0.80*
Scrabble	CA	200-400	50-100	-0.92*	-0.82*
	HD	0-50	0-12	0.74	0.76*
	HG	200-275	50-69	0.66	0.54
	TP	75-275	19-69	0.83*	0.76*

\* p < 0.0001



**Figura 4.5.** Temperatura de pastificación (izquierda) y calibre del grano (derecha) en función de la temperatura media explorada por los cuatro cultivares durante las ventanas de sensibilidad de cada atributo, respectivamente. Las líneas sólidas y la línea entrecortada indican la regresión para cada cultivar y para la respuesta promedio, respectivamente. El área sombreada muestra el intervalo de confianza (95%) para la respuesta promedio.

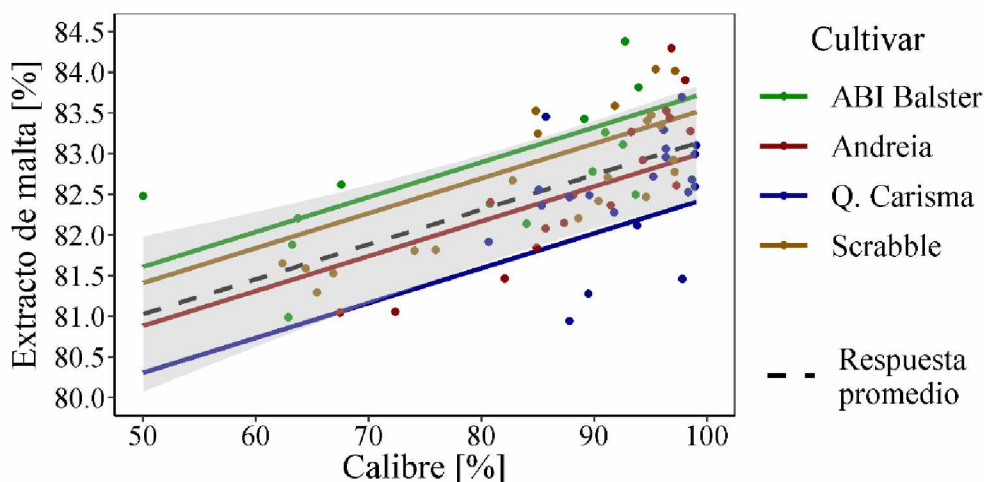
Promedio



**Figura 4.6.** Extracto de malta en función del contenido de proteína y la temperatura de pastificación para el promedio de los cuatro cultivares evaluados en el presente estudio. Los valores del extracto de malta se obtuvieron fijando todas las variables que se muestran en la Figura 4.3 en sus valores medios y permitiendo que solo varíen el contenido de proteína y la temperatura de pastificación.

El efecto de la temperatura durante la ventana de sensibilidad para la determinación del calibre sobre dicho atributo varió dependiendo del cultivar considerado ( $p < 0.05$ ), con pendientes de regresión de  $-7.27$ ,  $-5.93$ ,  $-4.57$  y  $-3.73\% \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  para ABI Balster, Scrabble, Andreia y Q. Carisma, respectivamente (**Figura 4.5B**). En general, la temperatura durante la ventana de sensibilidad junto con el cultivar explicaron el 79% de la variación observada en el calibre (**Figura 4.5B**). De esta manera, las temperaturas más

elevadas durante esta ventana de sensibilidad dieron como resultado calibres más bajos y, en consecuencia, un menor extracto de malta (**Figura 4.7**).

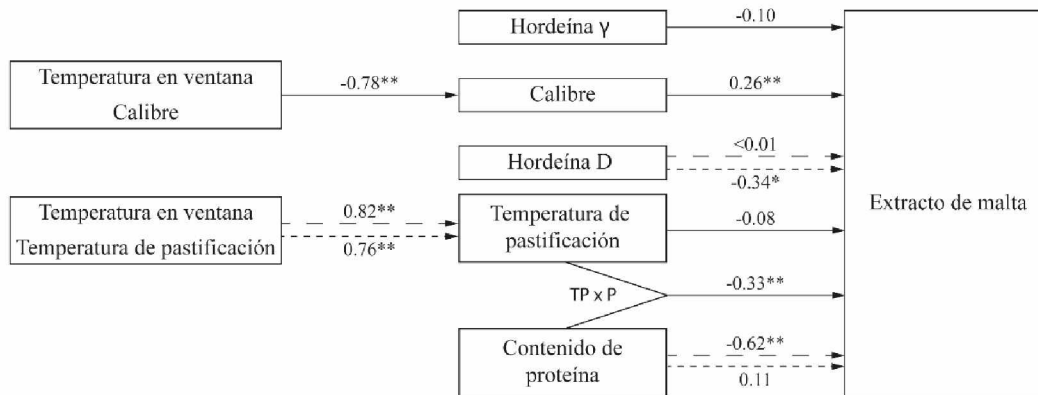


**Figura 4.7.** Relación entre el extracto de malta y el calibre del grano para los cuatro cultivares evaluados en el presente estudio y para el valor promedio. Las líneas sólidas y la línea entrecortada indican la regresión para cada cultivar y para la respuesta promedio, respectivamente. El área sombreada muestra el intervalo de confianza (95%) para la respuesta promedio.

#### 4.3.4 Análisis de sendero

Dado que se encontraron ventanas de sensibilidad para la determinación del calibre y de la temperatura de pastificación para los cuatro cultivares, se realizó un análisis de sendero considerando tanto la temperatura durante dichas ventanas, como los otros atributos del grano que afectan el extracto de malta. Para identificar si algunos coeficientes de sendero varían dependiendo del rango de contenido de proteína considerado, se llevó a cabo un análisis multigrupo utilizando estimación local y comparando los dos rangos (es decir, por encima y por debajo del umbral de proteína). Los resultados fueron similares a los del análisis de regresión mostrado en la **Figura 4.3**, ya que tanto el contenido de proteína como el de hordeína D presentaron efectos diferenciales sobre el extracto de malta dependiendo del rango de contenido de proteína considerado (**Figura 4.8**). El efecto de la temperatura ambiente durante la ventana de sensibilidad sobre la temperatura de pastificación también dependió del rango de contenido de proteína considerado, aunque su efecto fue pequeño (0.76 versus 0.82,

**Figura 4.8).** La cantidad de hordeína  $\gamma$  no presentó un efecto significativo sobre el extracto de malta, de acuerdo con este análisis (**Figura 4.8**).



**Figura 4.8.** Esquema de análisis de sendero con los correspondientes coeficientes de sendero. Las flechas entrecortadas con guiones cortos y largos indican asociaciones por debajo y por encima del umbral proteico, respectivamente. Las flechas sólidas indican asociaciones con un único efecto independiente del rango de contenido de proteína. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

#### 4.4 Discusión

El extracto de malta es el parámetro más relevante a la hora de describir la calidad maltera en cebada. El contenido de proteína y el tamaño del grano se utilizan a menudo para explicar las diferencias observadas en extracto de malta. Sin embargo, estos atributos no explican la variación en el extracto de malta cuando los cultivos se desarrollan en ambientes contrastantes. El presente estudio se realizó con el fin de identificar otros atributos del grano que puedan explicar estas variaciones en el extracto de malta, y determinar cómo son modulados por el ambiente, específicamente por la temperatura, cuando el cultivo se desarrolla en diferentes condiciones de campo. La composición proteica y las propiedades de pastificación (un indicador indirecto de las características del almidón) se consideraron atributos candidatos a tener un efecto sobre el extracto de malta, mientras que la temperatura media durante intervalos de tiempo térmicos específicos ubicados dentro del período de llenado de granos se midió para evaluar el efecto del ambiente térmico sobre dichos atributos.



Las condiciones ambientales contrastantes exploradas por los cultivos como consecuencia de la variación de la fecha de siembra y la disponibilidad de nitrógeno, dieron como resultado un amplio rango de variabilidad en los atributos del grano evaluados, así como en los valores del extracto de malta (**Cuadro 2.2, Cuadro 4.1, Cuadro 4.2 y Cuadro 4.3**). Se encontró una asociación negativa significativa entre el contenido de proteína y el extracto de malta (**Figura 4.1**), como se informó anteriormente en varios estudios (Bishop, 1930b, 1930a; Howard *et al.*, 1996; Molina-Cano *et al.*, 2000). A pesar de que la mayoría de los reportes en la literatura asumen una relación lineal entre estas variables, en el presente estudio se encontró que un modelo bilineal fue el que tuvo un mejor ajuste para la relación entre extracto de malta y proteína (**Figura 4.1**). El modelo bilineal demostró que por debajo de un valor umbral, que varió con el cultivar, el contenido de proteína no tuvo un efecto significativo sobre el extracto de malta (**Figura 4.1**). Molina-Cano *et al.* (2000b) estudiaron la relación entre el contenido de proteína y el extracto de malta en varias regiones y estaciones, y para muchos cultivares de cebada. Estos autores, encontraron que la relación entre el contenido de proteína y el extracto de malta se describía en general mediante una ecuación cuadrática, aunque los parámetros de las curvas variaban según la región considerada, con algunas regiones que mostraban una respuesta casi lineal (Molina-Cano *et al.*, 2000b). De esta forma, Molina-Cano *et al.* (2000b) llegaron a una conclusión similar a la alcanzada en el presente estudio: cuanto menor es el valor del contenido de proteína, más débil es el efecto de este atributo sobre el extracto de malta. Asimismo, en un estudio anterior Molina-Cano *et al.* (1995) encontraron que los contenidos de proteína por debajo de *ca.* 12% no logró explicar las diferencias en la absorción de agua durante el malteado, parámetro que afecta la calidad de la malta obtenida, y plantearon la hipótesis de que por debajo de dicho umbral las diferencias observadas podrían explicarse por otros atributos del grano. La diferencia

entre el valor umbral del 12% de contenido de proteína reportado por Molina-Cano *et al.* (1995) y el encontrado en este estudio (10% promediando entre cultivares; **Figura 4.1**) probablemente se deba al hecho de que la calidad maltera se evaluó a través de diferentes parámetros (*i.e.* absorción de agua o extracto de malta), así como debido a diferencias genotípicas, ya que se encontró que el punto de quiebre en la regresión es específico para cada cultivar. Sobre esta base, se planteó la hipótesis de que los atributos del grano que afectan la calidad maltera podrían no tener el mismo efecto por debajo o por encima de dicho valor umbral de contenido de proteína. Considerar interacciones entre atributos, junto con la no-linealidad del efecto que esos atributos tienen sobre el extracto de malta, explicaría algunos de los resultados contrastantes obtenidos en aquellas investigaciones que evalúan la determinación de la calidad maltera en cebada.

Si bien hay consenso entre investigadores respecto al hecho de que las hordeínas tienen un efecto sobre la calidad maltera, aún existe incertidumbre sobre la naturaleza de la relación entre cada subunidad de hordeína y el rendimiento del malteado, siendo que los resultados presentados en algunos informes fueron difíciles de replicar en estudios posteriores. Tanto las complejas interacciones con el ambiente, como los fondos genéticos contrastantes, hacen que sea difícil sacar conclusiones firmes sobre este tema (Shewry y Darlington, 2002). En el presente estudio, se encontró que la cantidad de hordeínas D y  $\gamma$  presentó una asociación negativa significativa con el extracto de malta (**Figura 4.3**). Sin embargo, el efecto de la Hordeína D estuvo acotado a un rango específico de contenido de proteína (*i.e.* por debajo del umbral específico de cada cultivo; **Figura 4.3**). Howard *et al.* (1996) encontraron que la proporción de hordeína D, a diferencia del contenido de proteína, puede usarse para predecir con éxito el extracto de malta en diferentes ambientes y cultivares. Por el contrario, Brennan *et al.* (1998) no encontraron ninguna relación entre la composición de hordeínas y el extracto de malta



trabajando con líneas casi isogénicas (NIL) que diferían solo en la presencia o ausencia de hordeína D. Sin embargo, el rango de contenido de proteína explorado en el estudio de Brennan estuvo restringido a valores superiores a 11.8% y hasta 16.2%. Por lo tanto, de acuerdo con el presente estudio, no se exploró el rango de contenido de proteína para el cual el efecto negativo de la hordeína D sobre el extracto de malta es significativo (*i.e.* por debajo de 10%). Por otro lado, el efecto de las hordeínas  $\gamma$  sobre el extracto de malta ha sido mucho menos estudiado. Recientemente, Prystupa *et al.* (2019) encontraron que la proporción de hordeínas  $\gamma$ , que se asoció inversamente con la concentración de nitrógeno del grano, y se correlacionó positivamente con el extracto de malta. Sin embargo, en dicho estudio la concentración de nitrógeno o la cantidad total de hordeínas describieron con mayor precisión la variación observada en el extracto de malta (Prystupa *et al.*, 2019). A diferencia de lo reportado por Molina-Cano *et al.* (1995), en el presente estudio no se encontró una relación entre la relación de hordeínas B/C y el extracto de malta. Siendo que muchas de las fracciones de hordeínas presentaron altos niveles de correlación entre sí (**Cuadro 4.4**), las fracciones B y C, así como la relación D/B no se incluyeron como variables candidatas para evitar multicolinealidad en el modelo. Sería de gran valor que las relaciones aquí presentadas se validen con un set de datos que no presente dichas características (en caso de que lo hubiese), y se consideren las fracciones de hordeínas no incluidas en el proceso de selección utilizado en la presente tesis (*i.e.* hordeínas B, C y la relación D/B).

La temperatura durante el llenado de granos no afectó la cantidad de hordeínas D y  $\gamma$ , con la excepción de una correlación positiva para Scrabble cuando se consideró la temperatura media del período completo de llenado de granos (**Cuadro 4.6; Figura 4.4**). Estos resultados sugieren que otros factores ambientales, como la nutrición de los cultivos (Prystupa *et al.*, 2019), regularían la cantidad de estas subunidades de hordeína presentes

en el grano, aunque parece existir cierto grado de variación entre cultivares con respecto al efecto de la temperatura. Como se comentó, la mayor disponibilidad de nitrógeno resultó en un aumento significativo del contenido absoluto de todas las fracciones de hordeínas (**Cuadro 4.2**), de forma coincidente con lo reportado en la bibliografía (Baxter y Wainwright, 1979). La cantidad de hordeínas  $\gamma$ , a su vez, varió marcadamente con el cultivar (**Cuadro 4.2**), lo cual denota la estrecha asociación entre el contenido de hordeínas y el genotipo, ya reportada previamente (Baxter y Wainwright, 1979). Si bien hay una correlación directa casi perfecta entre el contenido de proteína y las cantidades de hordeínas B y C, los coeficientes de correlación son más bajos para las fracciones D y  $\gamma$ , indicando que dichas fracciones pueden verse afectadas por otros factores no considerados (de hecho, la correlación con la cantidad de hordeínas  $\gamma$  no fue significativa; **Cuadro 4.4**). Por otro lado, recientemente se descubrió que la tasa de deposición de estas subunidades de hordeínas durante el llenado de granos depende de la disponibilidad de nitrógeno (Peton, 2017). Por lo tanto, al buscar ventanas de sensibilidad para dicho atributo debe considerarse el uso de un modelo de desarrollo de los granos que tenga en cuenta el efecto del nitrógeno en la dinámica de la deposición de hordeínas.

El calibre presentó una asociación positiva significativa con el extracto de malta independientemente del rango de contenido de proteína considerado (**Figura 4.3** y **Figura 4.7**), como se informó en estudios que abordaron este tema tempranamente (Bishop, 1930a). Este atributo se vio afectado negativamente por la temperatura explorada por el cultivo entre *ca.* 55 y 100% del desarrollo de los granos hacia la madurez fisiológica (contando desde de la polinización), de manera consistente en los cuatro cultivares (**Figura 4.4** y **Figura 4.5**; **Cuadro 4.6**). Passarella *et al.* (2002) generaron incrementos leves de temperatura en diferentes períodos durante el llenado de granos. Cuando se consideró el promedio de los tratamientos, no se encontró ningún efecto significativo

sobre el calibre. Sin embargo, cuando los tratamientos se consideraron por separado, las temperaturas elevadas durante el llenado tardío de los granos (*i.e.* 25 días después de la floración) redujo significativamente el calibre en uno de los dos cultivares evaluados en dicho estudio. Por otro lado, Passarella *et al.* (2005) encontraron que la exposición a altas temperaturas durante el llenado de granos redujo el peso del grano y el calibre independientemente del momento en que ocurrió. Savin *et al.* (1997) encontraron que las temperaturas moderadamente altas (20 días a 30/25 °C) durante el llenado de granos no afectaron el calibre, y solo tuvieron un pequeño efecto en el peso del grano, sin afectar la proporción de granos pequeños. El presente estudio es la primera evidencia que reporta un período de sensibilidad a la temperatura para la determinación del tamaño de grano sobre la base de un modelo de tiempo térmico. Cabe señalar que las condiciones térmicas inmediatamente antes de la espigazón, que no fueron consideradas en el presente estudio, pueden afectar el peso del grano (y presumiblemente, el calibre) en cebada (Ugarte *et al.*, 2007). Asimismo, se ha demostrado el peso promedio de los granos provenientes de espigas de macollos es generalmente menor que el de los granos provenientes de la espiga principal de cada planta (Kennedy *et al.*, 2017). Siendo que el macollaje es un fenómeno altamente dependiente de los recursos disponibles por planta, puede verse también se ve afectado por la fecha de siembra (Kirby, 1969; Photiades y Hadjichristodoulou, 1984). Teniendo en cuenta la relevancia del calibre sobre el extracto de malta, surge la necesidad de comprender con mayor precisión el aporte relativo de distintos factores en la determinación de este atributo. En la presente tesis se plantea la temperatura media explorada durante la ventana de sensibilidad indicada como uno de los factores para tener en cuenta en dicho análisis.

La asociación entre la temperatura de pastificación y el extracto de malta (**Figura 4.4** y **Figura 4.6**) ha sido reportada previamente por Zhou y Mendham (2005), quienes

encontraron que, si bien muchas mediciones de RVA tienen una correlación significativa con el extracto de malta (presumiblemente debido a las elevadas correlaciones entre los parámetros; **Cuadro 4.5**), la temperatura de pastificación es el parámetro con el mejor ajuste. Dado que la temperatura óptima para la actividad de la enzima amilasa durante el macerado es más baja que la temperatura de gelatinización del almidón (Greenwood y MacGregor, 1965; Kang *et al.*, 1985), se planteó la hipótesis de que menores temperaturas de pastificación dan como resultado una mayor actividad de amilolítica y, por lo tanto, un mayor extracto de malta. En el presente estudio, aunque se encontró un efecto significativo de la temperatura de pastificación sobre el extracto de malta, también se encontró una interacción con el contenido de proteína (**Figura 4.4** y **Figura 4.6**). De esta manera, el efecto negativo de mayores contenidos de proteína sobre el extracto de malta se ve incrementado por un aumento en la temperatura de pastificación, y viceversa (**Figura 4.4**). Esta interacción implica que existe un mecanismo a través del cual se puede mitigar el fuerte efecto negativo del contenido de proteína sobre el extracto de malta. La temperatura de pastificación se correlacionó positivamente con la temperatura media explorada por el cultivo entre *ca.* 35% y 70% del desarrollo de los granos hacia la madurez fisiológica, y a partir de la polinización (**Figura 4.4** y **Figura 4.5**; **Cuadro 4.6**). Se sabe que las propiedades de pastificación están determinadas por una serie de atributos fisicoquímicos del grano, incluyendo las proporciones de gránulos de almidón de tipo A y B, las proporciones y características de la amilosa y amilopectina que constituyen el almidón, la interacción con otras moléculas como lípidos y proteínas, e incluso la acción de enzimas amilolíticas (Balet *et al.*, 2019). La solución de  $\text{AgNO}_3$  0.2 mM utilizada en el presente estudio para realizar las determinaciones de RVA inactiva las enzimas amilolíticas (Glennie-Holmes, 1995), por lo que debe descartarse cualquier posible efecto de una actividad enzimática contrastante entre muestras en dichas mediciones. Aunque la

composición del almidón no se evaluó en el presente estudio, existe evidencia en la literatura que sugiere que la asociación entre la temperatura media durante el medio del llenado del grano y la resultante temperatura de pastificación podría explicarse a través de cambios en la proporción amilosa/amilopectina. Se sabe que la temperatura de pastificación aumenta con el contenido de amilosa del almidón en cebada (Naguleswaran *et al.*, 2013; Yangcheng *et al.*, 2016) y en otros cereales (Juhász y Salgó, 2008; Tziotis *et al.*, 2005). El contenido aparente de amilosa se redujo en menor medida que el contenido total de almidón (*i.e.* aumentó la proporción amilosa/ amilopectina) cuando se aplicó un tratamiento térmico al llenado de granos temprano e intermedio, pero no se encontró ningún efecto significativo cuando el tratamiento se aplicó en el llenado de granos tardío en cebada (Savin y Nicolas, 1999). Yangcheng *et al.* (2016) encontraron que los genotipos de cebada cultivados en condiciones más frías presentaban contenidos de amilosa más bajos y, concomitantemente, temperaturas de pastificación más bajas, en comparación con aquellos genotipos cultivados en regiones más cálidas. Resultados similares se reportaron para trigo (Zahedi *et al.*, 2004). Estas diferencias en el contenido de amilosa y amilopectina se pueden explicar a través de la respuesta diferencial a la temperatura de las enzimas involucradas en la síntesis de dichos compuestos durante el llenado de granos. Wallwork *et al.* (1998b) encontraron que la almidón-sintasa soluble, una enzima involucrada en la síntesis de amilopectina, mostró una pérdida inmediata de actividad con incrementos moderados de la temperatura media durante el llenado del grano. Por otro lado, la almidón-sintasa unida a gránulos de almidón, una enzima relacionada con la síntesis de amilosa, aumentó su actividad con temperaturas moderadas (28-32 °C) y disminuyó solo con temperaturas más elevadas. Resultados similares se encontraron para trigo (Jenner, 1994). Es importante resaltar que se requiere una mayor investigación para dilucidar los mecanismos subyacentes que relacionan la temperatura explorada durante la

mitad del llenado de granos y la temperatura de pastificación, donde la relación amilosa/amilopectina parece ser de relevancia.

Se encontraron múltiples diferencias entre cultivares a lo largo del análisis. ABI Balster y Scrabble presentaron los valores promedio más altos de extracto de malta, seguidos de Andreia y Q. Carisma (**Figura 4.2**). Curiosamente, el rendimiento general de extracto de malta para cada cultivar fue consistente con la sensibilidad que dichos cultivares presentaron en su respuesta del tamaño de grano a la temperatura explorada durante la ventana de sensibilidad para la determinación de dicho atributo (*i.e.* los cultivares con el extracto de malta promedio más alto presentaron la respuesta más marcada del calibre a la temperatura, y viceversa; **Figura 4.5**). Por otro lado, también se encontró variabilidad en la respuesta de la temperatura de pastificación a la temperatura explorada durante la ventana de sensibilidad correspondiente, con Q. Carisma mostrando la respuesta más alta a la temperatura (**Figura 4.5**). Estos resultados concuerdan con informes de la industria, que indican una baja estabilidad del tamaño de grano para Scrabble, así como una alta influencia del ambiente en la calidad maltera para Q. Carisma (Antonio Aguinaga, comunicación personal). El hecho de que se detectaran diferencias entre cultivares a lo largo de la amplia gama de ambientes térmicos, y para las disponibilidades de nitrógeno explorados en el presente estudio, indica que también existe un fuerte componente genotípico en la determinación del extracto de malta, lo que respalda hallazgos previos (Eagles *et al.*, 1995).

Al igual que se mencionó en los capítulos previos de la presente tesis, el uso de fechas de siembra como método para generar variabilidad térmica durante el llenado de granos, resulta a su vez en la variación de otros factores ambientales. Algunos de dichos factores podrían estar afectando indirectamente el extracto de malta, enmascarando o complementando los efectos encontrados en lo referido a la temperatura explorada

durante las ventanas de sensibilidad detectadas. La radiación y el fotoperíodo son dos de los factores que presumiblemente más varían junto con la temperatura al cambiar la fecha de siembra. Grashoff y d'Antuono (1997) encontraron que disminuciones en la cantidad de radiación durante el llenado de los granos en cebada, resultaron en granos más pequeños, desparejos, y con mayor concentración de proteína. Estos resultados se condicen con los obtenidos más recientemente por Kennedy *et al.* (2018). Dicho tratamiento resultó en valores de extracto de malta inadecuados aun al maltar solo las fracciones de granos más grandes (Duynhouwer *et al.*, 1993), lo cual sugiere que el efecto negativo de la radiación sobre este parámetro de calidad maltera se explicó mayormente por el aumento en la concentración de proteína, y no por el tamaño de grano *per se*. Respecto al fotoperíodo, no se encontraron reportes en la bibliografía de un efecto directo o indirecto sobre el extracto de malta (u otro atributo relacionado con la calidad maltera). El análisis de esta variable de forma independiente a otros factores permitiría reforzar y ampliar las conclusiones obtenidas en el presente trabajo de investigación.

Los resultados presentados en este capítulo se pueden utilizar para mejorar la producción de cebada cervecera directamente en el campo. La zonificación agroclimática para la producción de cebada cervecera se puede lograr combinando información de las condiciones climáticas regionales con datos fenológicos y utilizando las relaciones cuantitativas descritas en este capítulo. Presentar la ubicación de las ventanas de sensibilidad en términos relativos (**Cuadro 4.6**), como fue detallado en el marco de esta tesis, permite que estos modelos se apliquen fácilmente cuando se trabaja con cultivares distintos a los utilizados en el presente estudio. Asimismo, el uso de modelos de tiempo térmico precisos (**Cuadro 3.1**) para anclar las ventanas de sensibilidad dentro del llenado de granos permite la aplicación inequívoca de estos modelos en condiciones de campo, y en un amplio rango de condiciones agronómicas.

#### **4.5 Conclusión**

El tamaño del grano, el contenido de proteínas, la temperatura de pastificación y la cantidad de hordeínas D y  $\gamma$  mostraron un efecto significativo sobre el extracto de malta en cebada. Sin embargo, el extracto de malta es un parámetro complejo, por lo que es necesario tener en cuenta las interacciones entre dichos atributos, así como las relaciones no-lineales existentes. La temperatura explorada por los cultivos durante períodos de tiempo térmico específicos dentro del llenado de granos explicó la mayor parte de la variación observada en el tamaño del grano y la temperatura de pastificación. La ubicación de estas ventanas de sensibilidad fue similar entre cultivares para el atributo correspondiente, aunque se encontraron diferentes respuestas a la temperatura. Es necesario continuar investigando esta temática para identificar claramente los mecanismos fisiológicos detrás de estas asociaciones.



## Capítulo 5: **Discusión general**



## 5.1 Introducción

La demanda de cebada cervecera por parte de la industria maltera está atada al cumplimiento de una serie de requerimientos de calidad altamente específicos. Dichos requerimientos se asocian a atributos físicos, químicos y fisiológicos del grano que determinan, junto con un procesamiento industrial adecuado, la obtención de malta con características de calidad adecuadas para la elaboración de cerveza. Algunos de los atributos del grano que presentan un efecto sobre la calidad maltera están claramente identificados en la literatura científica (*e.g.* Arends *et al.*, 1995; Bamforth, 1985, 1999; Bishop, 1930a, 1930b; Burger y LaBerge, 1985; Hayter y Riggs, 1973; Li *et al.*, 2008; Molina-Cano *et al.*, 2000). Sin embargo, las variaciones observadas en la calidad maltera de lotes de grano similares en lo que a dichos atributos respecta, indican claramente que existen otras características del grano con efectos no estudiados sobre la calidad industrial (Eagles *et al.*, 1995). Identificar dichas características es fundamental para comprender cuál es la mejor estrategia para obtener lotes de grano adecuados para el malteado. Existen reportes tanto de efectos genotípicos como ambientales sobre la calidad industrial en cebada cervecera (Aguinaga, 2004; Arends *et al.*, 1995; Benech-Arnold, 2001; Eagles *et al.*, 1995; Molina-Cano *et al.*, 2000; Molina-Cano *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2006). Entre ellos, el ambiente térmico explorado durante el período de formación de los granos ha demostrado tener un efecto directo sobre distintos atributos del grano asociados a la calidad maltera (Gualano y Benech-Arnold, 2009a; Passarella *et al.*, 2008, 2002; Rodríguez *et al.*, 2001; Savin *et al.*, 1997; Savin y Nicolas, 1999, 1996). Entender de qué forma el ambiente materno modula los atributos relacionados con la calidad maltera permitiría ajustar el manejo del cultivo de forma tal que se asegure la obtención de cebada cervecera con una calidad industrial óptima. Siendo que los distintos atributos se determinan en momentos específicos durante el llenado de granos, es esperable que el

efecto de la temperatura no sea continuo a lo largo del mismo, sino que varíe dependiendo del intervalo considerado, de acuerdo con los distintos procesos fisiológicos que ocurran en ese momento.

La presente tesis se llevó a cabo con el objetivo de (i) identificar aquellos atributos del grano asociados a la calidad maltera, (ii) determinar en qué momento del llenado de granos se dan ventanas de sensibilidad a la temperatura para la definición de dichos caracteres, y (iii) elaborar modelos cuantitativos que permitan comprender las relaciones entre la temperatura explorada durante las ventanas de sensibilidad, los atributos del grano y la calidad maltera obtenida.

## **5.2 Implicancias de los aportes derivados de esta tesis y consideraciones para investigaciones futuras: la importancia de identificar ventanas de sensibilidad a la temperatura**

El primer paso para detectar ventanas de sensibilidad es la generación de un modelo que permita describir con precisión la dinámica de formación del grano a lo largo de un amplio rango de condiciones ambientales. Los modelos de tiempo térmico desarrollados y validados en la presente tesis (**Cuadro 5.1**) permitieron describir con exactitud el desarrollo de los granos. La variación en los parámetros del modelo (*i.e.* temperatura base, óptima, y sumatoria de tiempo térmico) entre cultivares, denota la importancia de que estos modelos sean, en la medida de lo posible, específicos para cada genotipo. Por otro lado, la metodología para la determinación de dichos parámetros también demostró ser relevante. Estos modelos de desarrollo permitieron anclar ventanas de sensibilidad a la temperatura para la definición de distintos atributos asociados a la calidad industrial. La velocidad de salida de la dormición y, en forma concomitante, la susceptibilidad a sufrir brotado precosecha, se definió de manera diferencial dependiendo el cultivar considerado (**Cuadro 5.2**). Tres cultivares presentaron una ventana de

sensibilidad para la definición de este atributo, mientras que el cuarto se mostró siempre susceptible a brotado precosecha, independientemente de la temperatura durante el llenado de granos (**Cuadro 5.2**). Por otro lado, de los tres cultivares que presentaron una ventana de sensibilidad, en uno de ellos la misma se ubicó justo antes de madurez fisiológica, mientras que para los otros dos se ubicó cerca del primer tercio del llenado de granos. La relevancia del genotipo no solo aplica al ajuste del modelo de desarrollo, sino también a la presencia y ubicación relativa de la ventana de sensibilidad, en lo que a susceptibilidad a brotado precosecha respecta.

El principal indicador de la calidad maltera de un lote de granos es el extracto de malta, medida de la capacidad de provisión de azúcares solubles para las levaduras durante la fermentación en las cervecerías. El efecto del contenido de proteínas y del tamaño del grano sobre el extracto de malta ya había sido abordado previamente en la literatura (Bishop, 1930b, 1930a; Molina-Cano *et al.*, 2000). Sin embargo, en la presente tesis se encontró que las hordeínas D y  $\gamma$ , así como la temperatura de pastificación, también presentaron una asociación con el extracto de malta (**Cuadro 5.3**). Más aún, dichos factores presentaron interacciones que vuelven más compleja su interpretación, y explican resultados contrastantes en la literatura (e.g. Brennan *et al.*, 1998). Tanto para la temperatura de pastificación como para el tamaño de grano, se encontraron ventanas de sensibilidad que, a diferencia de lo observado para la susceptibilidad a brotado precosecha, presentaron la misma ubicación relativa dentro del llenado de granos (**Cuadro 5.3**). Sin embargo, es necesario remarcar que los modelos presentados en el **Cuadro 5.3** aun no fueron validados con datos independientes, lo cual debe tenerse en cuenta al momento de determinar el alcance de los mismos.

Los hallazgos presentados en los capítulos 3 y 4 permiten que la hipótesis planteada originalmente respecto al hecho de que el efecto de la temperatura sobre los atributos determinantes de la calidad maltera no es continuo a lo largo del llenado, se acepte.

**Cuadro 5.1.** Ecuaciones correspondientes a los modelos de tiempo térmico para el llenado de granos, para los cuatro cultivares evaluados. Los parámetros fueron estimados en el capítulo 2 de la presente tesis. Se incluye también un modelo de aplicación general en cebada cervecera, formulado a partir de los cuatro cultivares evaluados. GD: Grados-día diarios;  $t_m$ : Temperatura media diaria; GDA: Grados-día acumulados; DG: Duración de llenado de granos; c: duración del llenado en días.

Cultivar	Ecuaciones
General	$GD = \begin{cases} 0 & \text{si } t_m \leq 8.4 \text{ } ^\circ\text{C} \\ t_m - 7.7 \text{ } ^\circ\text{C} & \text{si } t_m > 8.4 \text{ } ^\circ\text{C} \end{cases}$ $GDA = \sum_{i=1}^c GD_i$ $DG = 352 \text{ } ^\circ\text{C}d$
ABI Balster	$GD = \begin{cases} 0 & \text{si } t_m \leq 9.6 \text{ } ^\circ\text{C} \\ t_m - 9.6 \text{ } ^\circ\text{C} & \text{si } 9.6 \text{ } ^\circ\text{C} < t_m < 24.7 \text{ } ^\circ\text{C} \\ 24.7 \text{ } ^\circ\text{C} - 9.6 \text{ } ^\circ\text{C} & \text{si } t_m \geq 24.7 \text{ } ^\circ\text{C} \end{cases}$ $GDA = \sum_{i=1}^c GD_i$ $DG = 308 \text{ } ^\circ\text{C}d$
Andreaia	$GD = \begin{cases} 0 & \text{si } t_m \leq 8.3 \text{ } ^\circ\text{C} \\ t_m - 8.3 \text{ } ^\circ\text{C} & \text{si } t_m > 8.3 \text{ } ^\circ\text{C} \end{cases}$ $GDA = \sum_{i=1}^c GD_i$ $DG = 356 \text{ } ^\circ\text{C}d$
Q. Carisma	$GD = \begin{cases} 0 & \text{si } t_m \leq 7.7 \text{ } ^\circ\text{C} \\ t_m - 7.7 \text{ } ^\circ\text{C} & \text{si } t_m > 7.7 \text{ } ^\circ\text{C} \end{cases}$ $GDA = \sum_{i=1}^c GD_i$ $DG = 360 \text{ } ^\circ\text{C}d$
Scrabble	$GD = \begin{cases} 0 & \text{si } t_m \leq 7.4 \text{ } ^\circ\text{C} \\ t_m - 7.4 \text{ } ^\circ\text{C} & \text{si } t_m > 7.4 \text{ } ^\circ\text{C} \end{cases}$ $GDA = \sum_{i=1}^c GD_i$ $DG = 400 \text{ } ^\circ\text{C}d$

**Cuadro 5.2.** Ecuaciones para el cálculo del índice de germinación cercano a madurez comercial (indicador del nivel de susceptibilidad a sufrir brotado pre-cosecha) para los cuatro cultivares evaluados. Los parámetros se estimaron en el capítulo 3. Nótese que ABI Balster es el único cultivar cuyo índice de germinación es independiente de la temperatura, ya que no se halló una ventana de sensibilidad para dicho atributo en ese cultivar.  $IG_{cmc}$ : Índice de germinación cercano a madurez fisiológica;  $T_m$ : Temperatura media para el intervalo de tiempo térmico indicado. N: Nivel de disponibilidad nitrogenada (N=0 cuando la disponibilidad es de 85 kg N ha<sup>-1</sup>, N=1 cuando la disponibilidad es de 170 kg N ha<sup>-1</sup>).

Cultivar	Ecuación
ABI Balster	$IG_{cmc} = 100.3 - 11.8N$
Andreia	$IG_{cmc} = -139.5 - 7.5N + 7.8 T_m^{325-356^\circ Cd}$
Q. Carisma	$IG_{cmc} = -92.9 - 7.5N + 7.1 T_m^{0-100^\circ Cd}$
Scrabble	$IG_{cmc} = -111.4 - 7.5N + 7.2 T_m^{75-150^\circ Cd}$

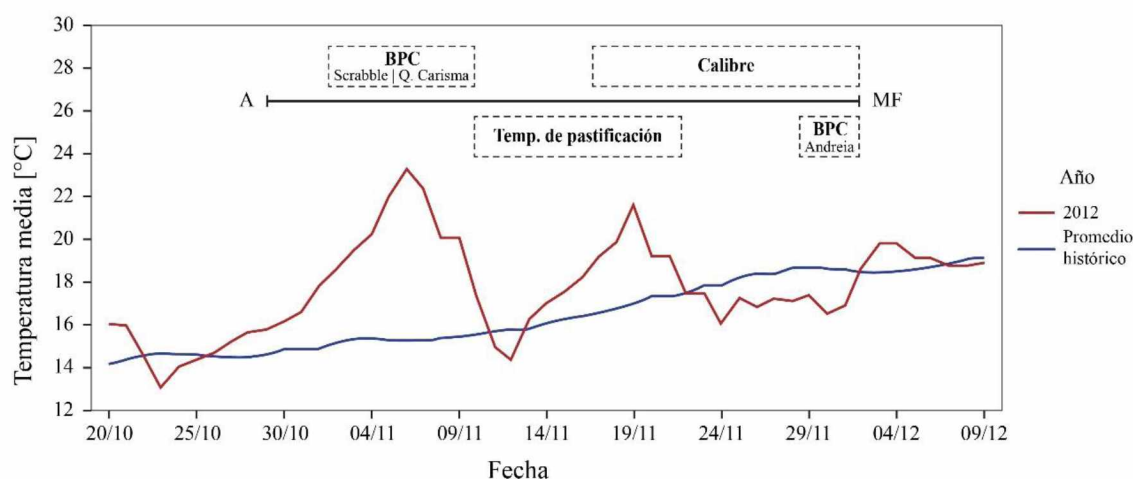
**Cuadro 5.3.** Ecuaciones para el cálculo de la temperatura de pastificación, el calibre y, a partir de ellos, el extracto, para los cuatro cultivares evaluados. Se incluye también un modelo de aplicación general en cebada cervecera. Los parámetros de los modelos, que están estandarizados, se estimaron en el capítulo 4. TP: Temperatura de pastificación; CA: Calibre; E: Extracto; P: Contenido de proteína; HG: Cantidad de hordeína  $\gamma$ . HD: Cantidad de hordeína D.  $T_m$ : Temperatura media para el intervalo de tiempo térmico indicado (salvo en el modelo general, que se expresa en porcentaje de avance de llenado de granos desde polinización hacia madurez

Cultivar	Ecuaciones
General	$TP = -0.08 + 0.85T_m^{35-70\%}$ $CA = -0.03 - 0.77T_m^{55-100^\circ Cd}$ $E = \begin{cases} 82.6 + 0.23P + 0.49CA - 0.001TP - 0.29HG - 0.36HD - 0.24TP P & si P \leq 10.0\% \\ 82.6 - 1.73P + 0.49CA - 0.001TP - 0.29HG - 0.07HD - 0.24TP P & si P > 10.0\% \end{cases}$
ABI Balster	$TP = -0.72 + 0.83T_m^{125-175^\circ Cd}$ $CA = -0.49 - 0.96T_m^{175-308^\circ Cd}$ $E = \begin{cases} 83.2 + 0.23P + 0.49CA - 0.001TP - 0.29HG - 0.36HD - 0.24TP P & si P \leq 9.6\% \\ 83.2 - 1.73P + 0.49CA - 0.001TP - 0.29HG - 0.07HD - 0.24TP P & si P > 9.6\% \end{cases}$
Andreia	$TP = -0.26 + 0.91T_m^{150-250^\circ Cd}$ $CA = 0.18 - 0.68T_m^{200-356^\circ Cd}$ $E = \begin{cases} 82.4 + 0.23P + 0.49CA - 0.001TP - 0.29HG - 0.36HD - 0.24TP P & si P \leq 9.9\% \\ 82.5 - 1.73P + 0.49CA - 0.001TP - 0.29HG - 0.07HD - 0.24TP P & si P > 9.9\% \end{cases}$
Q. Carisma	$TP = 0.06 + 0.96T_m^{125-325^\circ Cd}$ $CA = 0.39 - 0.62T_m^{225-360^\circ Cd}$ $E = \begin{cases} 81.9 + 0.23P + 0.49CA - 0.001TP - 0.29HG - 0.36HD - 0.24TP P & si P \leq 10.4\% \\ 81.9 - 1.73P + 0.49CA - 0.001TP - 0.29HG - 0.07HD - 0.24TP P & si P > 10.4\% \end{cases}$
Scrabble	$TP = 0.60 + 0.70T_m^{75-275^\circ Cd}$ $CA = -0.18 - 0.83T_m^{200-400^\circ Cd}$ $E = \begin{cases} 83.0 + 0.23P + 0.49CA - 0.001TP - 0.29HG - 0.36HD - 0.24TP P & si P \leq 10.1\% \\ 83.0 - 1.73P + 0.49CA - 0.001TP - 0.29HG - 0.07HD - 0.24TP P & si P > 10.1\% \end{cases}$

Las implicancias de las ventanas de sensibilidad a la temperatura para la determinación de atributos del grano relacionados con la calidad maltera pueden comprenderse más claramente con un ejemplo práctico. A modo de ejemplo, en la **Figura 5.1** puede observarse la ubicación de las ventanas de sensibilidad en un escenario real correspondiente a la localidad de Coronel Suarez, Provincia de Buenos Aires para el año 2012. Siendo que la temperatura media explorada durante la ventana de sensibilidad para la determinación de la temperatura de pastificación fue superior al promedio histórico, es esperable que se hayan cosechado lotes de granos con una calidad inferior en lo que a dicho atributo respecta (**Figura 5.1**). Más aún, debido a la interacción que existe entre la temperatura de pastificación y el contenido de proteína (ver capítulo 4), aquellos lotes de producción que hayan orientado su manejo a aumentar el contenido de proteína van a haber visto reducido el extracto de malta de manera aún más marcada respecto de aquellos que cosecharon granos con menor contenido proteico. Por otro lado, si bien la temperatura media fue elevada al comienzo de la ventana de sensibilidad para la definición del tamaño de grano, esta terminó por descender por debajo del promedio histórico hacia fines del mes de noviembre (**Figura 5.1**). Con una temperatura media explorada durante dicha ventana similar al promedio histórico, no se esperarían cambios en el calibre logrado. Respecto a la determinación de la velocidad de salida de la dormición (y, por ende, de la susceptibilidad a brotado precosecha), el resultado varía según el cultivar considerado (**Figura 5.1**). Si el cultivo correspondiera a Q. Carisma o Scrabble, se hubiese observado un aumento en la velocidad de salida de la dormición como consecuencia de la elevada temperatura explorada durante la ventana de sensibilidad ubicada alrededor del primer tercio del llenado de granos (**Figura 5.1**). Por otro lado, si el cultivar considerado fuese Andreia, las temperaturas relativamente bajas exploradas durante la breve ventana de sensibilidad previa a madurez fisiológica hubiesen determinado una baja velocidad de



salida de la dormición (**Figura 5.1**). De esta forma, realizando una suma térmica a partir de antesis y contando con datos meteorológicos, el productor podría haber optado por aplicar un desecante y cosechar anticipadamente frente a un pronóstico certero de precipitaciones en el caso de Scrabble o Q. Carisma, evitando así exponer al cultivo al brotado precosecha y/o pre-germinado. En cambio, si el cultivar fuese Andreia, el productor podría tener cierta seguridad de que, al menos en lo que respecta al efecto de la temperatura durante la ventana de sensibilidad correspondiente, no se espera un alto grado de susceptibilidad a brotado precosecha.



**Figura 5.1.** Temperatura media en función de la fecha para la campaña 2012 y promedio histórico, en Coronel Suarez, Provincia de Buenos Aires. El esquema superior indica la ubicación aproximada del llenado de granos. Los recuadros indican la ubicación relativa de las ventanas de sensibilidad encontradas en la presente tesis. A: Antesis; MF: Madurez fisiológica. BPC: Brotado precosecha.

En relación con el ejemplo práctico de la **Figura 5.1**, es importante destacar que de haberse considerado la temperatura promedio durante todo el llenado de granos, las predicciones que se hubieran hecho sobre los atributos del grano hubiesen sido erróneas. De esta forma, el ejemplo citado demuestra cómo puede variar la dinámica de temperatura dentro del período de llenado: Así, la posibilidad de ocurrencia de períodos cálidos (por encima del promedio) y frescos (por debajo del promedio) durante el llenado de los granos es un aspecto relevante a considerar en el marco de los modelos de predicción desarrollados, y que no se tomaría en cuenta si se considerase solo el promedio de

temperatura durante todo el llenado. En este punto radica la importancia de considerar las ventanas de sensibilidad para abordar el efecto del ambiente sobre los atributos relevantes del grano.

Estos modelos serían aún de mayor utilidad al ensamblarse con herramientas que permitan evaluar el riesgo a distintas adversidades (*e.g.* heladas, golpes de calor). Este es el caso de Cronocebada® (<http://cronocebada.agro.uba.ar/>), un software desarrollado sobre la base de modelos termo-fotoperiódicos específicos para los distintos cultivares, que permite predecir el momento en el que ocurren los distintos estados fenológicos y, a partir de series históricas de registros climáticos, estimar la probabilidad de que ocurran eventos extremos que comprometan el rendimiento alcanzable. Los hallazgos de esta tesis sientan las bases para desarrollar una herramienta de este tipo, que permitirá optimizar el manejo de la calidad comercial e industrial resultante, satisfaciendo de esta manera las necesidades conjuntas de productores e industriales. Los resultados de la presente tesis podrían incorporarse a la herramienta Cronocebada® lo que permitirá ampliar el potencial de la herramienta ya que no solo podría ser usada para predecir la fenología sino también para estimar los riesgos de reducción de la calidad comercial e industrial del cultivo de cebada.

Al realizar el análisis de correlación en la determinación de la ventana de sensibilidad para la susceptibilidad al brotado precosecha en las dos fechas de siembra más tardías, la sumatoria de grados-día tuvo que iniciarse 5 días previos a la polinización del cultivo (ver sección 3.2.2.3). Los modelos elaborados en la presente tesis surgen de evaluar la tasa de desarrollo del llenado de granos, definida a partir de la duración de dicha etapa. Si bien los modelos han demostrado ser de utilidad para el propósito y alcance de esta tesis, es fundamental que, en el futuro, además de ser específicos para cada cultivar, sean específicos para el proceso fisiológico considerado. Con respecto a

este tema, recientemente se demostró cómo el contenido de humedad puede marcar límites que resulten en la falta de linealidad del efecto de la temperatura sobre el metabolismo del ABA, durante la formación de semillas en otras especies (Chen *et al.*, 2021). Incluso en aquellos casos en que los factores que regulan la dinámica de los procesos tengan un efecto constante, los parámetros que definen la respuesta pueden variar dependiendo del proceso considerado (*e.g.* distintas temperaturas cardinales). Esto aplica incluso al considerar procesos que se dan de forma simultánea (Slafer y Rawson, 1995b). Para ajustar modelos de desarrollo que sean específicos para cada atributo de interés, es necesario identificar los mecanismos fisiológicos detrás de las ventanas de sensibilidad. Dichos modelos de desarrollo específicos permitirán aumentar la precisión en la determinación de las ventanas de sensibilidad, y con ella, la proporción de la variabilidad en la calidad maltera explicada. Asimismo, para que los modelos cuantitativos adquieran robustez para su uso como predictivos es necesario llevar a cabo una validación con datos independientes. En el presente trabajo, se validaron los modelos de desarrollo utilizados para fijar las ventanas de sensibilidad. Sin embargo, las relaciones entre la temperatura ubicada en dichas ventanas y los atributos del grano evaluados deben también ser validados con datos independientes y obtenidos a campo.

Teniendo en cuenta los antecedentes en la literatura, en la presente tesis se abordó exclusivamente el ambiente explorado durante el llenado de los granos. Sin embargo, para lograr una comprensión exhaustiva del modo en que el ambiente modula la calidad maltera, es necesario considerar también otras etapas del cultivo. De esta forma, Flavier (1995) encontró que la temperatura luego de la madurez fisiológica tuvo un efecto significativo en la velocidad de salida de la dormición en cebada cervecera, directamente ligada a la susceptibilidad a brotado precosecha. Asimismo, Ugarte *et al.* (2007) encontraron que el peso de los granos (variable correlacionada con el calibre) cayó un

23% al aumentar la temperatura durante la etapa inmediatamente anterior a la espigazón en trigo y cebada. Si bien es esperable que los efectos del ambiente más allá del llenado de granos sobre los atributos determinantes de la calidad maltera sean de una magnitud menor respecto a aquellos considerados durante el llenado de granos, es necesario abordarlos y estudiarlos para lograr entender en qué medida aportan nuevas oportunidades de intervenir mediante prácticas de manejo para regular favorablemente la calidad maltera resultante.

Como ya se mencionó, comprender las bases fisiológicas de las ventanas de sensibilidad debería ser uno de los siguientes temas a investigar. Siendo que la temperatura de gelatinización es una medición indirecta asociada al comportamiento reológico de la cebada al molerse, mezclarse con agua y calentarse, resulta de particular interés determinar qué característica del grano (y presumiblemente del almidón) está siendo afectada durante la ventana de sensibilidad correspondiente. Asimismo, los mecanismos fisiológicos detrás de la ventana de sensibilidad para la determinación de la velocidad de salida de la dormición en cebada cervecera también restan ser esclarecidos. El hallazgo de ventanas de sensibilidad para dicho carácter ubicadas en etapas más tempranas del llenado, respecto a las reportadas previamente en la literatura, es un llamado de atención sobre la necesidad de identificar los procesos fisiológicos que están siendo afectados.

Por último, el efecto de la proporción de hordeína D (y en menor medida de la hordeína  $\gamma$ ), y su interacción con el contenido de proteína, esclarecen algunos de los interrogantes en torno a la asociación entre hordeínas y calidad maltera (Savin, 2004; Shewry y Darlington, 2002). Resulta entonces de gran interés comprender ahora cómo el ambiente afecta la proporción de estas dos fracciones de hordeínas. En la presente tesis no se encontraron ventanas de sensibilidad a la temperatura para dichas proteínas. Sin

embargo, siendo conscientes del efecto del nitrógeno sobre la dinámica de acumulación de hordeínas (Peton, 2017), sería interesante elaborar un modelo de desarrollo que considere dicho efecto, y que funcione como base para la determinación de ventanas de sensibilidad para la definición de este atributo. Asimismo, la disponibilidad de nitrógeno ha demostrado ser relevante en la determinación de la calidad maltera, tanto por su asociación directa con el contenido de proteína (y, a su vez, por la interacción que dicho atributo presenta con otros de igual interés), como por su aparente efecto sobre la susceptibilidad a brotado precosecha. Por este motivo, la predicción del contenido de proteína que tendrán los granos a cosecha, en un momento en el que aún es posible corregirlo en el campo mediante el manejo de la fertilización nitrogenada, representa una oportunidad de mejora de la calidad maltera que no debería ser pasada por alto.

### **5.3 Consideraciones finales**

La presente tesis contribuyó a comprender, a través de la determinación de ventanas de sensibilidad a la temperatura, de qué manera el ambiente durante el llenado de granos modula la calidad maltera en cebada cervecera. La determinación de estas ventanas implica una oportunidad de mejora de la calidad maltera en el campo, mediante prácticas comunes de manejo, al mismo tiempo que representa un aporte a la ciencia básica, logrando una mayor comprensión del rol que cumple el genotipo, el ambiente y su interacción sobre la determinación de la calidad maltera en el cultivo de cebada cervecera.



## REFERENCIAS

- Aguinaga, A.A., 2004. Análisis de las relaciones entre proteínas de reserva, calidad maltera y ambiente de cultivo de cebada cervecera. Bahía Blanca.
- Álvarez 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. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.12.013>
- Álvarez Prado, S., Gallardo, J.M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.12.018>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2014.05.011>
- Angus, J.F., Mackenzie, D.H., Morton, R., Schafer, C.A., 1981. Phasic development in field crops II. Thermal and photoperiodic responses of spring wheat. *Field Crops Research* 4, 269–283. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(81\)90078-2](https://doi.org/10.1016/0378-4290(81)90078-2)
- Ao, Z., Jane, J. lin, 2007. Characterization and modeling of the A- and B-granule starches of wheat, triticale, and barley. *Carbohydrate Polymers* 67, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.04.013>
- Arends, A.M., Fox, G.P., Henry, R.J., Marschke, R.J., Symons, M.H., 1995. Genetic and environmental variation in the diastatic power of Australian barley. *Journal of Cereal Science* 21, 63–70. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(95\)80009-3](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(95)80009-3)
- Arisnabarreta, S., Miralles, D.J., 2004. The influence of fertiliser nitrogen application on development and number of reproductive primordia in field-grown two- and six-rowed barleys. *Australian Journal of Agriculture Research* 55, 357–366. <https://doi.org/10.1071/AR03066>
- 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. <https://doi.org/10.1080/00103628909368129>
- Balet, S., Guelpa, A., Fox, G., Manley, M., 2019. Rapid Visco Analyser (RVA) as a Tool for Measuring Starch-Related Physiochemical Properties in Cereals: a Review. *Food Analytical Methods* 12, 2344–2360. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12161-019-01581-w>
- Bamforth, C.W., 2009. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. *Journal of Cereal Science* 50, 353–357. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.03.001>
- Bamforth, C.W., 1999. Beer Haze. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57, 81–90. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-57-0081>

- Bamforth, C.W., 1985. The foaming properties of beer. *Journal of the Institute of Brewing* 91, 370–383. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1985.tb04359.x>
- Bathgate, B.G.N., Palmer, G.H., 1973. The in vivo and in vitro degradation of barley and malt starch granules. *Journal of the Institute of Brewing* 79, 402–406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03557.x>
- Bathgate, G.N., Palmer, G.H., 1972. A Reassessment of the Chemical Structure of Barley and Wheat Starch Granules. *Starch* 24, 336–341. <https://doi.org/10.1002/star.19720241004>
- Baxter, E.D., Wainwright, T., 1979. Hordein and malting quality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 37, 8–12. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-37-0008>
- Benech-Arnold, R.L., 2001. Bases of preharvest sprouting resistance in barley: physiology, molecular biology, and environmental control of dormancy in the barley grain, in: Benech-Arnold, R.L. (Ed.), *Barley Science: Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality*. Food Product Press, New York, pp. 481–502.
- Benech-Arnold, R.L., Giallorenzi, M.C., Frank, J., Rodríguez, V., 1999. Termination of hull-imposed dormancy in developing barley grains is correlated with changes in embryonic ABA levels and sensitivity. *Seed Science Research* 9, 39–47. <https://doi.org/10.1017/S0960258599000045>
- Benech-Arnold, R.L., Rodríguez, M.V., Batlla, D., Fernández-Farnocchia, R., 2021. Understanding the effects of maternal environment in controlling seed dormancy.
- Benech-Arnold, R.L., Sánchez, R.A., Forcella, F., Kruk, B.C., Ghersa, C.M., 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research* 67, 105–122.
- Bewley, J.D., Black, M., 1994. *Seeds, Seeds*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1002-8>
- Bhatt, G.M., Paulsen, G.M., Kulp, K., Heyne, E.G., 1981. Preharvest sprouting in hard winter wheats. Assessments of methods to detect genotypic and nitrogen effects and interaction. *Cereal Chemistry* 58, 300–302.
- Bishop, L.R., 1930a. The prediction of extract. *Journal of the Institute of Brewing* 36, 421–434. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1930.tb05275.x>
- Bishop, L.R., 1930b. The nitrogen content and “quality” of barley. *Journal of the Institute of Brewing* 36, 352–369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1930.tb05271.x>
- Bonhomme, R., 2000. Bases and limits to using ‘degree.day’ units. *European Journal of Agronomy* 13, 1–10.
- Borrás, L., Slafer, G.A., Otegui, M.E., 2004. Seed dry weight response to source-sink manipulations in wheat, maize and soybean: A quantitative reappraisal. *Field Crops Research* 86, 131–146. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2003.08.002>



- Bray, R.H., Kurtz, L.T., 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59, 39–45.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1097/00010694-194501000-00006>
- Brennan, C.S., Harris, N., Smith, D., Shewry, P.R., 1996. Structural differences in the mature endosperms of good and poor malting barley cultivars. *Journal of Cereal Science* 24, 171–177. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1996.0050>
- Brennan, C.S., Smith, D.B., Harris, N., Shewry, P.R., 1998. The production and characterisation of Hor 3 null lines of barley provides new information on the relationship of D hordein to malting performance. *Journal of Cereal Science* 28, 291–299. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(98\)90009-1](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(98)90009-1)
- Briggs, D.E., 1998. *Malts and Malting*, First edit. ed. Blackie Academic & Professional.
- Briggs, D.E., 1978. Grain Quality and Germination, in: *Barley*. Chapman and Hall Ltd., London, pp. 174–221. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5715-2>
- Briggs, D.E., 1972. Enzyme formation, cellular breakdown and the distribution of gibberellins in the endosperm of barley. *Planta* 108, 351–358.  
<https://doi.org/10.1007/BF00389312>
- Brookes, P.A., 1980. The significance of pre-harvest sprouting of barley in maing and brewing. *Cereal Research Communications* 8, 29–38.
- Brookes, P.A., Lovett, D.A., MacWilliam, I.C., 1976. The steeping of barley. a review of the metabolic consequences of water uptake, and their practical implications. *Journal of the Institute of Brewing* 82, 14–26. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1976.tb03716.x>
- Brown, D.M., 1960. Soybean Ecology. I. Development-Temperature Relationships from Controlled Environment Studies. *Agronomy Journal* 52, 493–496.
- Burger, W.C., LaBerge, D.E., 1985. Malting and Brewing Quality, in: Rasmusson, D.C. (Ed.), *Barley*, Agronomy Monograph 26.  
<https://doi.org/10.2134/agronmonogr26.c13>
- Cao, W., Moss, D.N., 1989. Temperature effect on leaf emergence and phyllochron in wheat and barley. *Crop Science* 29, 1018–1021.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900040038x>
- Cattáneo, M., 2011. Los mercados de cebada cervecera en la Argentina y en el mundo, in: Miralles, D.J., Benech-Arnold, R.L., Abeledo, L.G. (Eds.), *Cebada Cervecera*. Edi, Argentina, pp. 275–288.
- Celus, I., Kristof, B., Delcour, J.A., 2006. The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *Journal of Cereal Science* 44, 203–211.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.003>
- Chen, X., Yoong, F.Y., O'Neill, C.M., Penfield, S., 2021. Temperature during seed maturation controls seed vigor through ABA breakdown in the endosperm and causes a passive effect on DOG1 mRNA levels during entry into quiescence. *New Phytologist* 232, 1311–1322. <https://doi.org/10.1111/nph.17646>

- Cozzolino, D., Degner, S., Eglinton, J., 2016. The use of the rapid visco analyser (RVA) to sequentially study starch properties in commercial malting barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Food Measurement and Characterization*.  
<https://doi.org/10.1007/s11694-016-9326-z>
- Cozzolino, D., Roumeliotis, S., Eglinton, J., 2014. Grain and endosperm biophysical characteristics of barley malting, in: *Barley: Physical Properties, Genetic Factors and Environmental Impacts on Growth*. pp. 107–124.
- Del Pozo, A.H., Garcia-Huidobro, J., Novoa, R., Villaseca, S., 1987. Relationship of base temperature to development of spring wheat. *Experimental Agriculture* 23, 21–30.
- Detje, H., 1992. Effects of Varying Nitrogen Rates on Pre-Harvest Sprouting and  $\alpha$ -Amylase Activity in Cereals. *Journal of Agronomy & Crop Science* 169, 38–45.
- Dofing, S.M., 1997. Ontogenetic evaluation of grain yield and time to maturity in barley. *Agronomy Journal* 89, 685–690.  
<https://doi.org/10.2134/agronj1997.00021962008900040023x>
- Dormann, C.F., Elith, J., Bacher, S., Buchmann, C., Carl, G., Carré, G., Marquéz, J.R.G., Gruber, B., Lafourcade, B., Leitão, P.J., Münkemüller, T., McClean, C., Osborne, P.E., Reineking, B., Schröder, B., Skidmore, A.K., Zurell, D., Lautenbach, S., 2013. Collinearity: A review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography* 36, 27–46.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07348.x>
- Duynhouwer, I.D.C., Grashoff, C., Angelino, S.A.G.F., 1993. Kernel filling and malting barley quality, in: *European Brewery Convention: Proceedings of the 24th Congress*. Oxford University Press, Oslo, Norway, pp. 121–128.
- Eagles, H.A., Bedggood, A.G., Panozzo, J.F., Martin, P.J., 1995. Cultivar and environmental effects on malting quality in barley. *Australian Journal of Agricultural Research* 46, 831–844. <https://doi.org/10.1071/AR9950831>
- Edney, M.J., 1996. Barley, in: Henry, R.J., Kettlewell, P.S. (Eds.), *Cereal Grain Quality*. Chapman and Hall, pp. 113–151. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1513-8>
- Ellis, R.H., Qi, A., Summerfield, R.J., Roberts, E.H., 1993. Rates of leaf appearance and panicle development in rice (*Oryza sativa* L.): a comparison at three temperatures. *Agricultural and Forest Meteorology* 66, 129–138. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(93\)90066-Q](https://doi.org/10.1016/0168-1923(93)90066-Q)
- Ellis, R.H., Roberts, E.H., Summerfield, R.J., Cooper, J.P., 1988. Environmental Control of Flowering in Barley (*Hordeum vulgare* L.). II. Rate of Development as a Function of Temperature and Photoperiod and its Modification by Low-temperature Vernalization. *Annals of Botany* 62, 145–158.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087645>
- Emebiri, L.C., Moody, D.B., Panozzo, J.F., Read, B.J., 2004. Mapping of QTL for malting quality attributes in barley based on a cross of parents with low grain

- protein concentration. *Field Crops Research* 87, 195–205.  
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2003.11.002>
- Evans, D.E., Li, C., Eglinton, J.K., 2009. The Properties and Genetics of Barley Malt Starch Degrading Enzymes, in: Zhang, G., Li, Chengdao (Eds.), *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality*. Springer, pp. 143–189.
- FAOSTAT, 2018. Statistics of farming production [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Fawcett, R.S., Slife, F.W., 1978. Effects of Field Applications of Nitrate on Weed Seed Germination and Dormancy. *Weed Science* 26, 594–596.  
<https://doi.org/10.1017/s0043174500064626>
- Fenner, M., 1992. Environmental influences on seed size and composition, in: Janick, J. (Ed.), *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 183–213.
- Ferrari, B., Baronchelli, M., Stanca, A.M., Gianinetti, A., 2010. Constitutive differences between steely and mealy barley samples associated with endosperm modification. *Journal of Science of Food and Agriculture* 90, 2105–2113.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.4058>
- Finnie, C., Svensson, B., 2014. Barley Grain Proteins, in: Shewry, P.R., Ullrich, S.E. (Eds.), *Barley: Chemistry and Technology*. AACCC International, pp. 123–168.  
<https://doi.org/10.1016/B978-1-891127-79-3.50004-4>
- Flavier, J.F., 1995. A model for germination rate during dormancy loss in *hordeum vulgare*. *Annals of Botany* 76, 631–638. <https://doi.org/10.1006/anbo.1995.1141>
- Frank, A.B., Bauer, A., 1995. Phyllochron Differences in Wheat, Barley, and Forage Grasses. *Crop Science* 35, 19–23.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183x003500010004x>
- Gallagher, J.N., 1979. Field studies of cereal leaf growth: I. Initiation and expansion in relation to temperature and ontogeny. *Journal of Experimental Botany* 30, 625–636. <https://doi.org/10.1093/jxb/30.4.625>
- Gallagher, J.N., Biscoe, P. V, Dennis-Jones, R., 1983. Environmental influences on the development, growth and yield of barley., *Barley: production and marketing*. Agronomy Society of New Zealand Special Publication No. 2.
- García Del Moral, L.F., Ramos, J.M., García Del Moral, M.B., Jiménez-Tejada, M.P., 1991. Ontogenetic approach to grain production in spring barley based on path-coefficient analysis. *Crop Science* 31, 1179–1185.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100050021x>
- Garcia-Huidobro, J., Monteith, J.L., Squire, G.R., 1982. Time, temperature and germination of pearl millet (*Pennisetum typhoides* S. & H.). *Journal of Experimental Botany* 33, 288–296.
- Gibbons, G.C., 1981. On the relative role of the scutellum and aleurone in the production of hydrolases during germination of barley. *Carlsberg Research Communications* 46, 215–225. <https://doi.org/10.1007/BF02906499>

- Glennie-Holmes, M., 1995. Studies on barley and malt with the rapid viscoanalyser: [I] The effect of variations in physical and chemical parameters. *Journal of the Institute of Brewing* 101, 11–18. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1995.tb00844.x>
- Goyne, P.J., Meinke, H., Milroy, S.P., Hammer, G.L., Hare, J.M., 1996. Development and use of a barley crop simulation model to evaluate production management strategies in north-eastern Australia. *Australian Journal of Agriculture Research* 47, 997–1015. <https://doi.org/10.1071/AR9960997>
- Grashoff, C., d'Antuono, L.F., 1997. Effect of shading and nitrogen application on yield, grain size distribution and concentrations of nitrogen and water-soluble carbohydrates in malting spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *European Journal of Agronomy* 6, 275–293. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(97\)00001-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1161-0301(97)00001-4)
- Greenwell, B.M., Schubert Kabban, C.M., 2014. *investr: An R Package for Inverse Estimation*. *R J* 6, 90–100.
- Greenwood, C.T., MacGregor, A.W., 1965. The Isolation of  $\alpha$ -amylase form Barley and Malted Barley, and a Study of the Properties and the Action-Patterns of the Enzymes. *Journal of the Institute of Brewing* 71, 405–417. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1965.tb06366.x>
- Griffiths, D.W., 1987. The ratio of B to C hordeins in barley as estimated by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 38, 229–235. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740380306>
- Gualano, N.A., 2011. Brotado precosecha y pre-germinado en cebada cervecera: Predicción de la susceptibilidad del cultivo basada en el ambiente y manejo pos-cosecha de los granos dañados (Doctoral thesis). Escuela Para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano, Universidad de Buenos Aires.
- Gualano, N.A., Benech-Arnold, R.L., 2009a. Predicting pre-harvest sprouting susceptibility in barley: Looking for “sensitivity windows” to temperature throughout grain filling in various commercial cultivars. *Field Crops Research* 114, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.06.016>
- Gualano, N.A., Benech-Arnold, R.L., 2009b. The effect of water and nitrogen availability during grain filling on the timing of dormancy release in malting barley crops. *Euphytica* 168, 291–301. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9948-x>
- Gualano, N.A., del Fueyo, P.A., Benech-Arnold, R.L., 2014. Potential longevity ( $K_i$ ) of malting barley (*Hordeum vulgare* L.) grain lots relates to their degree of pre-germination assessed through different industrial quality parameters. *Journal of Cereal Science* 60, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.03.003>
- Hall, A.J., Savin, R., Slafer, G.A., 2014. Is time to flowering in wheat and barley influenced by nitrogen? A critical appraisal of recent published reports. *European Journal of Agronomy* 54, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2013.11.006>

- Harris, G., 1962. The Structural Chemistry of Barley and Malt, in: Cook, A.H. (Ed.), *Barley and Malt: Biology, Biochemistry, Technology*. p. 434.
- Hayter, A.M., Riggs, T.J., 1973. Environmental and varietal differences in diastatic power and four associated characteristics of spring barley. *Journal of Agricultural Science* 80, 297–302. <https://doi.org/10.1017/S0021859600057762>
- He, H., Willems, L.A.J., Batushansky, A., Fait, A., Hanson, J., Nijveen, H., Hilhorst, H.W.M., Bentsink, L., 2016. Effects of parental temperature and nitrate on seed performance are reflected by partly overlapping genetic and metabolic pathways. *Plant and Cell Physiology* 57, 473–487. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv207>
- Ho, K.M., Jui, P.Y., 1989. Duration and rate of kernel filling in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Cereal Research Communications* 17, 69–76. <https://doi.org/https://www.jstor.org/stable/23783058>
- Holm, L., Hafeez, A., Johansson, E., 2018. Optimizing yield and quality in malting barley by the governance of field cultivation conditions. *Journal of Cereal Science* 82, 230–242. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.07.003>
- Holzworth, D.P., Huth, N.I., DeVoil, P.G., Zurcher, E.J., Herrmann, N.I., McLean, G., Chenu, K., Al., E., 2014. APSIM – Evolution towards a New Generation of Agricultural Systems Simulation. *Environmental Modelling and Software* 62, 327–.
- Hoover, M.W., 1955. Some effects of temperature on the growth of southern peas, in: *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* pp. 308–312.
- Howard, K.A., Gayler, K.R., Eagles, H.A., Halloran, G.M., 1996. The relationship between D hordein and malting quality in barley. *Journal of Cereal Science* 24, 47–53. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1996.0036>
- Hunt, L.A., Poorten, G. van der, Pararajasingham, S., 1991. Postanthesis temperature effects on duration and rate of grain filling in some winter and spring wheats. *Canadian Journal of Plant Science* 71, 609–617. <https://doi.org/10.4141/cjps91-092>
- Jaiswal, S., Baišga, M., Ahuja, G., Rosnagel, B.G., Chibbar, R.N., 2014. Development of barley (*Hordeum Vulgare* L.) lines with altered starch granule size distribution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 2289–2296. <https://doi.org/10.1021/jf405424x>
- Janes, P.W., Skerritt, J.H., 1993. High performance liquid chromatography of barley proteins: relative quantities of hordein fractions correlate with malt extract. *Journal of the Institute of Brewing* 99, 77–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1993.tb01151.x>
- Jenner, C., 1994. Starch Synthesis in the Kernel of Wheat Under High Temperature Conditions. *Functional Plant Biology* 21, 791–806. <https://doi.org/10.1071/pp9940791>
- Jones, B.L., 2005. Endoproteases of barley and malt. *Journal of Cereal Science* 42, 139–156. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.03.007>

- Jones, J.W., Hoogenboom, G., Porter, C.H., Boote, K.J., Batchelor, W.D., Hunt, L.A., Wilkens, P.W., Singh, U., Gijsman, A.J., Ritchie, J.T., 2003. The DSSAT cropping system model, *European Journal of Agronomy*. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(02\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(02)00107-7)
- Juhász, R., Salgó, A., 2008. Pasting behavior of amylose, amylopectin and their mixtures as determined by RVA curves and first derivatives. *Starch* 60, 70–78. <https://doi.org/10.1002/star.200700634>
- Kang, M.Y., Sugimoto, Y., Kato, I., Sakamoto, S., Fuwa, H., 1985. Some properties of large and small starch granules of barley (*Hordeum vulgare* L) endosperm. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 1291–1297. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866907>
- Karlsson, R., Olered, R., Eliasson, A.-C., 1983. Changes in Starch Granule Size Distribution and Starch Gelatinization Properties During Development and Maturation of Wheat, Barley and Rye. *Starch* 35, 335–340. <https://doi.org/10.1002/star.19830351002>
- Kennedy, S.P., Bingham, I.J., Spink, J.H., 2017. Determinants of spring barley yield in a high-yield potential environment. *Journal of Agricultural Science* 155, 60–80. <https://doi.org/10.1017/S0021859616000289>
- Kennedy, S.P., Lynch, J.P., Spink, J., Bingham, I.J., 2018. Grain number and grain filling of two-row malting barley in response to variation in post-anthesis radiation: Analysis by grain position on the ear and its implications for yield improvement and quality. *Field Crops Research* 225, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.06.004>
- Kindred, D.R., Gooding, M.J., Ellis, R.H., 2005. Nitrogen fertilizer and seed rate effects on Hagberg falling number of hybrid wheats and their parents are associated with  $\alpha$ -amylase activity, grain cavity size and dormancy. *Journal of Science of Food and Agriculture* 85, 727–742. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2025>
- Kirby, E.J.M., 1969. The effect of sowing date and plant density on barley. *Annals of Applied Biology* 63, 513–521. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1969.tb02847.x>
- Kirkman, M.A., Shewry, P.R., Milfin, B.J., 1982. The Effect of Nitrogen Nutrition on the Lysine Content and Protein Composition of Barley Seeds. *Journal of Science of Food and Agriculture* 33, 115–127. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740330203>
- Le Gouis, J., 1993. Grain filling and shoot growth of 2-row and 6-row winter barley varieties. *Agronomie* 13, 545–552. <https://doi.org/10.1051/agro:19930612>
- Li, Y., Schwarz, P.B., Barr, J.M., Horsley, R.D., 2008. Factors predicting malt extract within a single barley cultivar. *Journal of Cereal Science* 48, 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.12.004>
- Loss, S.P., Kirby, E.J.M., Siddique, K.H.M., Perry, M.W., 1989. Grain growth and development of old and modern Australian wheats. *Field Crops Research* 21, 131–146. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(89\)90049-X](https://doi.org/10.1016/0378-4290(89)90049-X)

- Lyu, D., Doce, R.R., Juskiw, P., Zhou, G., Baron, V.S., 2018. Diverse Grain-Filling Dynamics Affect Harvest Management of Forage Barley and Triticale Cultivars 1027, 1017–1027. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.09.0549>
- Magliano, P.N., Prystupa, P., Gutiérrez-boem, F.H., 2014. Protein content of grains of different size fractions in malting barley. *Journal of the Institute of Brewing* 120, 347–352. <https://doi.org/10.1002/jib.161>
- MAGyP, 2019. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Argentina [WWW Document]. URL <https://www.argentina.gob.ar/agricultura-ganaderia-y-pesca>
- Mahalingam, R., Bregitzer, P., 2019. Impact on physiology and malting quality of barley exposed to heat, drought and their combination during different growth stages under controlled environment. *Physiologia Plantarum* 165, 277–289. <https://doi.org/10.1111/ppl.12841>
- Mäkelä, M.J., Korpela, T., Laakso, S., 1982. Studies of Starch Size and Distribution in 33 Barley Varieties with a Celloscope. *Starch* 34, 329–334. <https://doi.org/10.1002/star.19820341003>
- Manderscheid, R., Pacholski, A., Frühauf, C., Weigel, H.J., 2009. Effects of free air carbon dioxide enrichment and nitrogen supply on growth and yield of winter barley cultivated in a crop rotation. *Field Crops Research* 110, 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.08.002>
- Matakiadis, T., Alboresi, A., Jikumaru, Y., Tatematsu, K., Pichon, O., Renou, J.P., Kamiya, Y., Nambara, E., Truong, H.N., 2009. The Arabidopsis abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiology* 149, 949–960. <https://doi.org/10.1104/pp.108.126938>
- McDonald, A.M.L., Stark, J.R., Morrison, W.R., Ellis, R.P., 1991. The composition of starch granules from developing Barley genotypes. *Journal of Cereal Science* 13, 93–112. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(09\)80038-6](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(09)80038-6)
- Metzger, D.D., Czaplowski, S.J., Rasmusson, D.C., 1984. Grain-Filling Duration and Yield in Spring Barley. *Crop Science* 24, 1101–1105. <https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183x002400060022x>
- Miralles, D.J., Dominguez, C.F., Slafer, G.A., 1996. Relationship between grain growth and postanthesis leaf area duration in dwarf, semidwarf and tall isogenic lines of wheat. 177, 115–122. <https://doi.org/10.1177/0278364914532150>
- Miralles, D.J., Slafer, G.A., 1999. Wheat Development, in: Satorre, E.H., Slafer, G.A. (Eds.), *Wheat: Ecology and Physiology of Yield Determination*. Food Product Press, New York, pp. 14–43.
- Molina-Cano, J.L., Polo, J.P., Romagosa, I., MacGregor, A.W., 2004. Malting behaviour of barleys grown in Canada and Spain as related to hordein and enzyme content. *Journal of the Institute of Brewing* 110, 34–42. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00178.x>

- Molina-Cano, J.L., Polo, J.P., Romera, E., Araus, J.L., Zarco, J., Swanston, J.S., 2001. Relationships between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph I. Genotype by environment interaction of hordein content. *Journal of Cereal Science* 34, 285–294. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0415>
- Molina-Cano, J.-L., Polo, J.-P., Sopena, A., Voltas, J., Pérez, A.-M., Romagosa, I., 2000. Mechanisms of Malt Extract Development in Barleys from Different European Regions: II. Effect of Barley Hordein Fractions on Malt Extract Yield. *Journal of the Institute of Brewing* 106, 117–123. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2000.tb00047.x>
- Molina-Cano, J.L., Ramo, T., Ellis, R.P., Swanston, J.S., Bain, H., Uribe-Echeverria, T., Perez-Vendrell, A.M., 1995. Effect of Grain Composition on Water Uptake by Malting Barley: a Genetic and Environmental Study. *Journal of the Institute of Brewing* 101, 79–83. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1995.tb00851.x>
- Molina-Cano, J.L., Rubió, A., Igartua, E., Garcia, P., Montoya, J.L., 2000. Mechanisms of Malt Extract Development in Barleys from Different European Regions: I. Effect of Environment and Grain Protein Content on Malt Extract Yield. *Journal of the Institute of Brewing* 106, 111–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2000.tb00047.x>
- Molina-Cano, J.L., Sopena, A., Polo, J.P., Bergareche, C., Moralejo, M.A., Swanston, J.S., Glidewell, S.M., 2002. Relationships between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph. II. Genetic and environmental effects on water uptake. *Journal of Cereal Science* 36, 39–50. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2002.0440>
- Molitor, D., Junk, J., Evers, D., Hoffmann, L., Beyer, M., 2014. A high-resolution cumulative degree day-based model to simulate phenological development of grapevine. *American Journal of Enology Viticulture* 65, 72–80. <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.13066>
- Monteith, J.L., 1984. Consistency and convenience in the choice of units for agricultural science. *Experimental Agriculture* 20, 105–117. <https://doi.org/10.1017/S0014479700000946>
- Morris, C.F., Paulsen, G.M., 1985. Preharvest Sprouting of Hard Winter Wheat as Affected by Nitrogen Nutrition. *Crop Science* 25, 1028–1031. <https://doi.org/10.2135/cropsci1985.0011183x002500060032x>
- Morrison, M.J., McVetty, P.B.E., Shaykewich, C.F., 1989. The determination and verification of a baseline temperature for the growth of westar summer rape 464, 455–464.
- Naguleswaran, S., Vasanthan, T., Hoover, R., Bressler, D., 2013. The susceptibility of large and small granules of waxy, normal and high-amylose genotypes of barley and corn starches toward amylolysis at sub-gelatinization temperatures. *FRIN* 51, 771–782. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.057>



- O'Connor-Cox, E.S.C., Ingledew, W.M. (Mike), 1989. Wort Nitrogenous Sources— Their Use by Brewing Yeasts: A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 47, 102–108. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-47-0102>
- Oliveira, A.B., Rasmusson, D.C., Fulcher, R.G., 1994. Genetic aspects of starch granule traits in barley. *Crop Science* 34, 1176–1180. <https://doi.org/10.2135/cropsci1994.0011183X003400050006x>
- Otero, E.A., 2015. Predicción de la susceptibilidad a brotado precosecha en cebada cervecera. CABA, Argentina.
- Palmer, G.H., 1991. Ultrastructure of endosperm and quality, in: Molina-Cano, J.L., Brufau, J. (Eds.), *New Trends in Barley Quality for Malting and Feeding*. pp. 19–29.
- Palmer, G.H., 1972. Morphology of Starch Granules in Cereal Grains and Malts. *Journal of the Institute of Brewing* 78, 326–332. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1972.tb03456.x>
- Passarella, V.S., Savin, R., Slafer, G.A., 2008. Are temperature effects on weight and quality of barley grains modified by resource availability? *Australian Journal of Agricultural Research* 59, 510–516. <https://doi.org/10.1071/AR06325>
- Passarella, V.S., Savin, R., Slafer, G.A., 2005. Breeding effects on sensitivity of barley grain weight and quality to events of high temperature during grain filling. *Euphytica* 141, 41–48. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-5068-4>
- Passarella, V.S., Savin, R., Slafer, G.A., 2002. Grain weight and malting quality in barley as affected by brief periods of increased spike temperature under field conditions. *Australian Journal of Agricultural Research* 53, 1219–1227. <https://doi.org/10.1071/AR02096>
- Patwa, N., Penning, B.W., 2020. Environmental Impact on Cereal Crop Grain Damage from Pre-harvest Sprouting and Late Maturity Alpha-Amylase, in: Roychowdhury, R., Choudhury, S., Hasanuzzaman, M., Srivastava, S. (Eds.), *Sustainable Agriculture in the Era of Climate Change*. Springer, pp. 23–41.
- Paynter, B.H., Young, K.J., 2000. Environment influences rate of grain filling in barley - paper, in: *Proceedings of the 8th International Barley Genetics Symposium*. pp. 279–281.
- Peltonen, J., Rita, H., Aikasalo, R., Home, S., 1994. Hordein and Malting Quality in Northern Barleys. *Hereditas* 120, 231–239. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1994.00231.x>
- Peton, A., 2017. Dinámica de acumulación de hordeínas en granos de cebada cervecera y su relación con la fertilización azufrada y nitrogenada (Master's Thesis). EPG Alberto Soriano, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. 106.
- Photiades, I., Hadjichristodoulou, A., 1984. Sowing date, sowing depth, seed rate and row spacing of wheat and barley under dryland conditions. *Field Crops Research* 9, 151–162. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4290\(84\)90021-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4290(84)90021-2)

- Porter, J.R., Gawith, M., 1999. Temperatures and the growth and development of wheat: a review. *European Journal of Agronomy* 10, 23–36.
- Prystupa, P., Ferraris, G., 2011. Nutrición mineral y fertilización, in: Miralles, J.D., Benech-Arnold, R.L., Abeledo, L.G. (Eds.), *Cebada Cervecera*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina.
- Prystupa, P., Peton, A., Pagano, E., Gutierrez-Boem, F.H.G., 2019. Sulphur fertilization of barley crops improves malt extract and fermentability. *Journal of Cereal Science* 85, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.12.014>
- Qi, J.C., Chen, J.X., Wang, J.M., Wu, F.B., Cao, L.P., Zhang, G.P., 2005. Protein and hordein fraction content in barley seeds as affected by sowing date and their relations to malting quality. *Journal of Zhejiang University Science* 6 B, 1069–1075. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B1069>
- Qi, J.C., Zhang, G.P., Zhou, M.X., 2006. Protein and hordein content in barley seeds as affected by nitrogen level and their relationship to beta-amylase activity. *Journal of Cereal Science* 43, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.08.005>
- R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing.
- Radley, M., 1967. Site of production of gibberellin-like substances in germinating barley embryos. *Planta* 75, 164–171. <https://doi.org/10.1007/BF00387132>
- Rahman, S., Shewry, P.R., Mifflin, B.J., 1982. Differential protein accumulation during barley grain development. *Journal of Experimental Botany* 33, 717–728. <https://doi.org/https://doi.org/10.2134/agronj2001.9351071x>
- Rasmusson, D.C., McLean, I., Tew, T.L., 1979. Vegetative and Grain-Filling Periods of Growth in Barley 1. *Crop Science* 19, 5–9. <https://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183x001900010002x>
- Riggs, T.J., Gothard, P.G., 1976. The development of barley grain: Comparisons between cultivars for growth rate and  $\alpha$ -amylase activity. *Journal of Agricultural Science* 86, 603–608. <https://doi.org/10.1017/s0021859600061165>
- Ritchie, J.T., NeSmith, D.S., 1991. Temperature and Crop Development, in: Hanks, J., Ritchie, J.T. (Eds.), *Modeling Plant and Soil Systems*. pp. 5–29. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr31.c2>
- Rodríguez, M. v., Barrero, J.M., Corbineau, F., Gubler, F., Benech-Arnold, R.L., 2015. Dormancy in cereals (not too much, not so little): About the mechanisms behind this trait. *Seed Science Research*. <https://doi.org/10.1017/S0960258515000021>
- Rodríguez, M. v., Margineda, M., González-Martín, J.F., Insausti, P., Benech-Arnold, R.L., 2001. Predicting preharvest sprouting susceptibility in barley: A model based on temperature during grain filling. *Agronomy Journal* 93, 1071–1079.
- Ruml, M., Vuković, A., Milatović, D., 2010. Evaluation of different methods for determining growing degree-day thresholds in apricot cultivars. *International Journal of Biometeorology* 54, 411–422. <https://doi.org/10.1007/s00484-009-0292-6>

- Sadras, V., Dreccer, M.F., 2015. Adaptation of wheat, barley, canola, field pea and chickpea to the thermal environments of Australia. *Crop and Pasture Science* 1137–1150.
- Sánchez, R.A., Eyherabide, G., de Miguel, L., 1981. The influence of irradiance and water deficit during fruit development on seed dormancy in *Datura ferox* L. *Weed Research* 21, 127–132.
- Savin, R., 2004. The Malting Quality of Barley, in: Benech-Arnold, R.L., Sánchez, R.A. (Eds.), *Handbook of Seed Physiology*. Food Products Press, pp. 429–456. <https://doi.org/10.1201/9781482277944>
- Savin, R., Aguinaga, A.A., 2011. Los requerimientos de la industria: Calidad comercial e industrial y sus determinantes, in: Miralles, D.J., Benech-Arnold, R.L., Abeledo, L.G. (Eds.), *Cebada Cervecera*. Editorial Facultad de Agronomía, Argentina, pp. 205–241.
- Savin, R., Molina-Cano, J.L., 2002. Changes in malting quality in response to abiotic stresses, in: Slafer, G.A., Molina-Cano, J.L., Savin, Roxana, Araus, J.L., Romagnosa, I. (Eds.), *Barley Science: Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality*. Food Products Press, New York - London - Oxford, pp. 523–550.
- Savin, R., Nicolas, M.E., 1999. Effects of timing of heat stress and drought on growth and quality of barley grains. *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 357–364. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/A98080>
- 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. *Australian Journal of Plant Physiology* 23, 201–210. <https://doi.org/10.1071/PP9960201>
- Savin, R., Prystupa, P., Araus, J.L., 2006. Hordein composition as affected by post-anthesis source-sink ratio under different nitrogen availabilities. *Journal of Cereal Science* 44, 113–116. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.01.003>
- Savin, R., Stone, P.J., Nicolas, M.E., 1996. Responses of grain growth and malting quality of barley to short periods of high temperature in field studies using portable chambers. *Australian Journal of Agricultural Research* 47, 465–477. <https://doi.org/10.1071/AR9960465>
- Savin, R., Stone, P.J., Nicolas, M.E., Wardlaw, I.F., 1997. Grain growth and malting quality of barley 1. Effects of heat stress and moderately high temperature. *Australian Journal of Agricultural Research* 48, 615–624. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/A96064>
- Schopfer, P., Bajracharya, D., Plachy, C., 1979. Control of Seed Germination by Abscisic Acid I. I. Time course of action in *Sinapsis alba* L. *Plant Physiology* 64, 822–827.
- Scott, W.R., Appleyard, M., Fellowes, G., Kirby, E.J.M., 1983. Effect of genotype and position in the ear on carpel and grain growth and mature grain weight of spring

- barley. *Journal of Agricultural Science* 100, 383–391.  
<https://doi.org/10.1017/S0021859600033530>
- SENASA, 2013. Resolución 27/2013 - Norma V.
- Sexsmith, J., 1969. Dormancy of Wild Oat Seed Produced under Various Temperature and Moisture Conditions. *Weed Science* 17, 405–407.  
<https://doi.org/10.1017/s0043174500054394>
- Sharif-Zadeh, F., Murdoch, A.J., 2000. The effects of different maturation conditions on seed dormancy and germination of *Cenchrus ciliaris*. *Seed Science Research* 10, 447–457. <https://doi.org/10.1017/S0960258500000490>
- Sharratt, B., 1999. Thermal requirements for barley maturation and leaf development in interior Alaska. *Field Crops Research* 63, 179–184. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00035-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00035-0)
- Sharratt, B.S., Sheaffer, C.C., Baker, D.G., 1989. Base temperature for the application of the growing-degree-day model to field-grown alfalfa. *Field Crops Research* 21, 95–102. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(89\)90045-2](https://doi.org/10.1016/0378-4290(89)90045-2)
- Shaw, R.H., Loomis, W.E., 1950. Bases for the prediction of corn yield. *Plant Physiology* 25, 225–244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1104/pp.25.2.225>
- Shewry, P.R., Darlington, H., 2002. The Proteins of the Mature Barley Grain and Their Role in Determining Malting Performance, in: Slafer, G.A., Molina-Cano, J.L., Savin, R., Araus, J.L., Romagosa, I. (Eds.), *Barley Science Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality*. Food Products Press, New York - Oxford - London, pp. 503–521.
- Šimić, G., Sudar, R., Lalić, A., Jurković, Z., Horvat, D., Babić, D., 2007. Relationship between hordein proteins and malt quality in barley cultivars grown in Croatia. *Cereal Research Communications* 35, 1487–1496.  
<https://doi.org/10.1556/CRC.35.2007.3.13>
- Slack, P.T., Baxter, E.D., Wainwright, T., 1979. Inhibition By Hordein of Starch Degradation. *Journal of the Institute of Brewing* 85, 112–114.  
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1979.tb06837.x>
- Slafer, G.A., Rawson, H.M., 1995a. Base and optimum temperatures vary with genotype and stage of development in wheat. *Plant and Cell Environment* 18, 671–679.
- Slafer, G.A., Rawson, H.M., 1995b. Rates and cardinal temperatures for processes of development in wheat: Effects of temperature and thermal amplitude. *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 913–926. <https://doi.org/10.1071/PP9950913>
- Slafer, G.A., Rawson, H.M., 1994. Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: A re-examination of some assumptions made by physiologists and modellers. *Australian Journal of Plant Physiology* 21, 393–426.  
<https://doi.org/10.1071/PP9940393>

- Slafer, G.A., Savin, R., 1991. Developmental base temperature in different phenological phases of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Experimental Botany* 42, 1077–1082. <https://doi.org/10.1093/jxb/42.8.1077>
- Snyder, R.L., Spano, D., Cesaraccio, C., Duce, P., 1999. Determining degree-day thresholds from field observations. *International Journal of Biometeorology* 177–182.
- Sofield, I., Evans, L., Cook, M., Wardlaw, I., 1977. Factors Influencing the Rate and Duration of Grain Filling in Wheat. *Functional Plant Biology* 4, 785. <https://doi.org/10.1071/pp9770785>
- Sole, S.M., 1994. Effects of pregermination on germination properties of barley and resultant malt quality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 52, 73–86. <https://doi.org/10.1094/asbcj-52-0076>
- Steadman, K.J., Ellery, A.J., Chapman, R., Moore, A., Turner, N.C., 2004. Maturation temperature and rainfall influence seed dormancy characteristics of annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Australian Journal of Agricultural Research* 55, 1047–1057. <https://doi.org/10.1071/AR04083>
- Steinbach, H.S., Benech-Arnold, R.L., Kristof, G., Sanchez, R.A., Marcucci-Poltri, S., 1995. Physiological basis of pre-harvest sprouting resistance in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. ABA levels and sensitivity in developing embryos of sprouting-resistant and -susceptible varieties. *Journal of Experimental Botany* 46, 701–709.
- Steinbach, H.S., Benech-Arnold, R.L., Sánchez, R.A., 1997. Hormonal Regulation of Dormancy in Developing Sorghum Seeds. *Plant Physiology* 113, 149–154.
- Swanston, J.S., Ellis, R.P., Perez-Vendrell, A., Voltas, J., Molina-Cano, J.L., 1997. Patterns of barley grain development in Spain and Scotland and their implications for malting quality. *Cereal Chemistry* 74, 456–461. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1997.74.4.456>
- Tester, R.F., Morrison, W.R., 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose and lipids. *Cereal Chemistry* 67, 551–557.
- Tester, R.F., South, J.B., Morrison, W.R., Ellis, R.P., 1991. The effects of ambient temperature during the grain-filling period on the composition and properties of starch from four barley genotypes. *Journal of Cereal Science* 13, 113–127. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(09\)80029-5](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(09)80029-5)
- Thitisaksakul, M., Jiménez, R.C., Arias, M.C., Beckles, D.M., 2012. Effects of environmental factors on cereal starch biosynthesis and composition. *Journal of Cereal Science* 56, 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.04.002>
- Trafford, K., Fincher, G.B., 2014. Barley Grain Carbohydrates: Starch and Cell Walls, in: Shewry, P.R., Ullrich, S.E. (Eds.), *Barley: Chemistry and Technology*. AACC International, pp. 71–95.

- Tziotis, A., Seetharaman, K., Klucinec, J.D., Keeling, P., White, P.J., 2005. Functional properties of starch from normal and mutant corn genotypes. *Carbohydrate Polymers* 61, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.04.003>
- Ugarte, C., Calderini, D.F., Slafer, G.A., 2007. Grain weight and grain number responsiveness to pre-anthesis temperature in wheat, barley and triticale. *Field Crops Research* 100, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.07.010>
- Voltas, J., Van Eeuwijk, F.A., Araus, J.L., Romagosa, I., 1999. Integrating statistical and ecophysiological analyses of genotype by environment interaction for grain filling of barley II. Grain growth. *Field Crops Research* 62, 75–84. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00007-6)
- Vos, J., 1981. Effects of temperature and nitrogen supply on post-floral growth of wheat; measurements and simulations, *Agricultural Research Reports*. Wageningen, The Netherlands.
- Wallwork, M.A.B., Jenner, C.F., Logue, S.J., Sedgley, M., 1998a. Effect of high temperature during grain-filling on the structure of developing and malted barley grains. *Annals of Botany* 82, 587–599. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0721>
- Wallwork, M.A.B., Logue, S.J., MacLeod, L.C., Jenner, C.F., 1998b. Effect of high temperature during grain filling on starch synthesis in the developing barley grain. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 173–181. <https://doi.org/10.1071/PP97084>
- Wardlaw, I., Sofield, I., Cartwright, P., 1980. Factors Limiting the Rate of Dry Matter Accumulation in the Grain of Wheat Grown at High Temperature. *Functional Plant Biology* 7, 387. <https://doi.org/10.1071/pp9800387>
- Wei, K., Dai, F., Wu, F., Zhang, G., 2009. The Variation of  $\beta$ -amylase activity and protein fractions in barley grains as affected by genotypes and post-anthesis temperatures. *Journal of the Institute of Brewing* 115, 208–213. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00370.x>
- Wieser, H., Antes, S., Seilmeier, W., 1998. Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry* 75, 644–650. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1998.75.5.644>
- Willmott, C.J., Robeson, S.M., Matsuura, K., 2012. A refined index of model performance. *International Journal of Climatology* 32, 2088–2094. <https://doi.org/10.1002/joc.2419>
- Wurzbarger, J., Koller, D., 1976. Differential effects of the parental photothermal environment on development of dormancy in caryopses of *Aegilops Kotschyi*. *Journal of Experimental Botany* 27, 43–48. <https://doi.org/10.1093/jxb/27.1.43>
- Yalçın, E., 2010. Effect of partial removal of prolamins on some chemical and functional properties of barley flours. *Food Science and Biotechnology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10068-010-0103-1>

- Yanagisawa, T., Domon, E., Fujita, M., Kiribuchi-Otobe, C., Takayama, T., 2006. Starch pasting properties and amylose content from 17 waxy barley lines. *Cereal Chemistry* 83, 354–357. <https://doi.org/10.1094/CC-83-0354>
- Yang, S., Logan, J., Coffey, D.L., 1995. Mathematical formulae for calculating the base temperature for growing degree days. *Agricultural and Forest Meteorology* 74, 61–74. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(94\)02185-M](https://doi.org/10.1016/0168-1923(94)02185-M)
- Yangcheng, H., Gong, L., Zhang, Y., Jane, J.L., 2016. Physicochemical properties of Tibetan hull-less barley starch. *Carbohydrate Polymers* 137, 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.061>
- Yu, W., Tan, X., Zou, W., Hu, Z., Fox, G.P., Gidley, M.J., Gilbert, R.G., 2017. Relationships between protein content, starch molecular structure and grain size in barley. *Carbohydrate Polymers* 155, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.078>
- Zahedi, M., McDonald, G., Jenner, C.F., 2004. Nitrogen supply to the grain modifies the effects of temperature on starch and protein accumulation during grain filling in wheat. *Aust J Agric Res* 55, 551–564. <https://doi.org/10.1071/ar03195>
- Zapata, D., Salazar, M., Chaves, B., Keller, M., Hoogenboom, G., 2015. Estimation of the base temperature and growth phase duration in terms of thermal time for four grapevine cultivars. *International Journal of Biometeorology* 59, 1771–1781. <https://doi.org/10.1007/s00484-015-0985-y>
- Zhang, G.P., Chen, J.X., Dai, F., Wang, J.M., Wu, F.B., 2006. The effect of cultivar and environment on  $\beta$ -amylase activity is associated with the change of protein content in barley grains. *Journal of Agronomy and Crop Science* 192, 43–49. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2006.00181.x>
- Zhou, M.X., Mendham, N.J., 2005. Predicting barley malt extract with a Rapid Viscoanalyser. *Journal of Cereal Science* 41, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.04.003>





# ANEXO

**Cuadro A.1.** Resultados de análisis de micromaltes. Laboratorio de análisis A: Laboratorio de Cervecería y Maltería Quilmes S.A.I.C.A. y G. en Tres Arroyos; Laboratorio de análisis B: Laboratorio de Calidad del INTA EEA Bordenave. Los detalles de análisis se describen en la sección 4.2.2.6. Disponible en:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1axKC-11dlrmc4fMdIP9OE6CbNPxjxi2H/edit?usp=drivesdk&oid=107633607839423528213&rtpof=true&sd=true>

**Cuadro A.2.** Resultados de análisis de hordeínas. Los detalles de análisis se describen en la sección 4.2.2.4. Disponible en:

[https://docs.google.com/spreadsheets/d/1dxHB324\\_o8\\_SfpLqmZUYP1Ovio4vIEle/edit?usp=drivesdk&oid=107633607839423528213&rtpof=true&sd=true](https://docs.google.com/spreadsheets/d/1dxHB324_o8_SfpLqmZUYP1Ovio4vIEle/edit?usp=drivesdk&oid=107633607839423528213&rtpof=true&sd=true)