



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**Evaluación de diferentes dispositivos para la autopolinización
en maíz (*Zea mays*, L.)**

SANTIAGO IGNACIO AQUINO

**TRABAJO FINAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN PRODUCCIÓN DE
SEMILLAS DE CEREALES, OLEAGINOSAS Y FORRAJERAS**

DIRECTOR: Dra. Raquel Benavidez, Ing. Agr; M Sc.

CO- DIRECTOR: Dr. Vicente Kenny, Ing. Agr.

AÑO 2023

Evaluación de diferentes dispositivos para la autopolinización en maíz (*Zea mays*, L.)

Santiago Ignacio Aquino

Licenciado en Administración Agropecuaria – Universidad del Salvador

Este Trabajo Final es presentado como parte de los requisitos para optar al grado académico de Especialista en PRODUCCIÓN DE SEMILLAS DE CEREALES, OLEAGINOSAS Y FORRAJERAS, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentado para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. El mismo contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en Santa Isabel, Santa Fe en la campaña 2019/2020 y con la dirección de la Dra. Raquel Benavidez.

Nombre y firma del autor

Nombre y firma de la Directora

Nombre y firma del Co - Director

Defendida: Noviembre de 2023.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES.....	25
BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXO.....	27

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, quien seguramente estaría orgullosa de este logro, la persona que me brindó de las mejores herramientas para vivir la vida.

A mi familia, por el apoyo y la contención.

A la empresa Syngenta, la cual me permitió disponer de tiempo y recursos para lograr llevar a cabo el cursado de especialización y este trabajo.

A Raquel, mi directora en quien encontré siempre el apoyo profesional y personal, desde la parte técnica, pero en especial desde lo humano, acompañando y empujando a sus alumnos a lograr las metas.

A Vicente, mi codirector en quien siempre tuve una respuesta ante todas las consultas e inquietudes técnicas, en este trabajo y en el tiempo compartido en la empresa.

A Diego Seres, el responsable del área donde trabajo, por la libertad y el apoyo constante.

A Sebastián Colomé, mi amigo y compañero en este camino, en la empresa y la especialización, siempre juntos por un objetivo.

Al equipo de trabajo de campo, quienes colaboraron con las tareas operativas.

RESUMEN

La producción de híbridos de maíz (*Zea mays*, L.) se basa en la utilización de la heterosis que deviene de la superioridad de la generación F1, proveniente de la cruce entre dos líneas puras, las que se obtienen luego de sucesivas generaciones de autopolinizaciones. Para realizar las autofecundaciones se utiliza una metodología convencional que consiste en cubrir tanto la inflorescencia masculina, como la femenina de cada planta individualmente y en varios momentos de intervención. Para cubrir las inflorescencias, en este trabajo se usaron tres dispositivos alternativos diseñados y contruidos *ad hoc*: Papel (P), Friselina (F) y Nylon (N) que se colocaron en un solo momento en una única pieza de cobertura de las inflorescencias; se utilizó también la metodología convencional (C). Se sembraron dos líneas endocriadas de maíz pertenecientes a grupos heteróticos diferentes con relación al tipo de grano el 19 de octubre de 2019 en Santa Isabel, Santa Fe. En la distribución espacial del ensayo cada línea de parental tuvo una función específica; en una de ellas se realizaron las polinizaciones con los diferentes dispositivos, mientras que la otra funcionó como aporte de polen contaminante, rodeando totalmente a cada surco polinizado. Los dispositivos se colocaron antes que las plantas iniciaran el período reproductivo, previo a R1 (Ritchie y Hanway, 1982). Para comparar la utilidad potencial entre los dispositivos usados se evaluó el tiempo operativo (TO) demandado para su colocación, el peso de promedio (PProm) y el peso de 1000 semillas (P1000), el poder germinativo y el vigor (PG y VG, respectivamente), así como la Pureza genética (PGen). Con respecto a TO se observaron diferencias significativas entre los dispositivos ($F= 450,16$; $p < 0,0001$), donde el dispositivo F, debido al diseño y a la naturaleza del material del dispositivo fue la que menor tiempo operativo requirió y N el mayor tiempo, ya que se trató de un dispositivo de doble apertura, que deja las hojas expuestas al ambiente y así evitar la condensación. En cuanto al PProm y el P1000 tuvieron diferencias significativas entre los dispositivos, resultando N el de menor PProm y mayor P1000. ($F=133,75$; $p < 0,0001$ y $F= 30,36$; $p < 0,0001$ respectivamente). El PProm fue $F=75,13$; $C=76,05$ y $N=14,72$ debido al establecimiento de muy pocas y aisladas semillas. El P1000 fue de $N=250,25$, $C=243,5$ y $F=234,25$. Los valores promedios de PG y de VG obtenidos fueron similares para todos los dispositivos usados. La calidad genética disminuyó significativamente con el dispositivo de N, posiblemente debido a sus microperforaciones que podrían haber permitido el ingreso de polen contaminante. Los resultados de este trabajo final mostraron

que con el dispositivo Friselina se obtuvieron rendimientos similares a los obtenidos con el dispositivo Convencional. La pureza genética fue del 100% y similar al Convencional, mientras que el TO disminuyó significativamente. Los parámetros de calidad fisiológica fueron similares entre todos los dispositivos. Esto convertiría al uso de Friselina, como una alternativa instrumental y metodológica para el proceso de obtención de líneas endocriadas a campo, materialidad y diseño para ser explorado más profundamente a futuro.

ABSTRACT

The production of corn (*Zea mays*, L.) hybrids is based on the use of heterosis resulting from the superiority of the F1 generation, coming from the cross between two pure lines, which are obtained after successive generations of self-pollination. To carry out the self-pollinations, a conventional methodology is used, which consists of covering both the male and female inflorescence of each plant individually and at various times of intervention. To cover the inflorescences, three different designed and constructed *ad hoc* alternatives were used in this work: Paper (P), *Friselina* [non-woven fabric] (F) and Nylon (N), which were placed at single time on a single piece covering the inflorescences; the conventional methodology (C) was also used. Two corn inbred lines belonging to different heterotic groups in relation to grain type were sown on 19 October 2019 in Santa Isabel, Santa Fe. In the spatial distribution of the trial each parental line had a specific function; in one of them the pollinations were performed with the different alternative methods, while the other functioned as a contaminant pollen source, totally surrounding each pollinated row. These devices were placed before the plants began their reproductive period, prior to R1 (Ritchie and Hanway, 1982). To compare the potential usefulness of the methods used, the operative time (TO) required for their placement, the average weight (PProm) and 1000-seed weight (P1000), germination power and vigor (PG and VG, respectively), as well as Genetic Purity (PGen) were evaluated. With respect to TO, significant differences were observed among the devices (F= 450.16; $p < 0.0001$), where the F device, due to the design and the characteristics of the material was the one that required the shortest operating time and the N device the longest time, since it had a double opening, in order to leave the leaves exposed to the environment and thus avoid condensation inside. As regards the PProm and the P1000 there were significant differences among the devices, resulting N in a lower PProm and a higher P1000 (F=133.75; $p < 0.0001$ and F= 30.36; $p < 0.0001$ respectively). The PProm was F=75.13; C=76.05 and N=14.72 due to the development of very few and isolated seeds. The P1000 was N=250,25, C=243.5 and F=234.25. The average PG and VG values obtained were similar for all the devices used. The genetic quality decreased significantly with the N material, possibly due to its micro-perforations that could have allowed the entry of contaminant pollen. The results of this final work showed that similar yields to the Conventional device were obtained with the *Friselina* one. Genetic purity was 100% and similar to the Conventional method, while

TO decreased significantly. Physiological quality parameters were similar among all methods. This would make the use of *Friselina* an instrumental and methodological alternative for the process of obtaining inbred lines in the field, material and design to be further explored in the future.

INTRODUCCIÓN

La evolución del maíz (*Zea mays*, L.) a través del mejoramiento comenzó cuando los humanos descubrieron el potencial de la especie para alimento, forraje, fibra y combustible. En Argentina, el maíz comenzó a producirse e industrializarse desde finales del siglo XIX, por entonces la producción mostró un progresivo aumento del área sembrada y de los rendimientos, destacándose un incremento significativo a partir de 2010. Como consecuencia de estas tendencias, la República Argentina se posicionó, desde hace dos décadas, como el 3er exportador mundial de maíz (Di Yenno et al; 2021).

La disponibilidad de cuantiosos saldos exportables comienza desde la semilla de maíz de buena calidad destinada a la siembra hasta su posterior cosecha y exportación. El maíz híbrido explora una de las más conocidas y valiosas contribuciones prácticas del mejoramiento genético al ser humano y a la agricultura mundial, que es el vigor del híbrido, demostrado a principios del siglo XX por George H. Shull y Edward M. East. Ambos descubrieron que al hibridar líneas homocigotas de un maíz “dentado sureño” con un maíz “flint norteño” la descendencia presentaba mayor rendimiento que las líneas, mostrando “una fuerte heterosis”. Esta heterosis, devenida de la expresión del vigor híbrido e incremento de rendimiento que se manifiesta después de la hibridación entre dos progenitores, permite que la generación híbrida o primera generación filial manifieste superioridad para los caracteres de interés productivos. En la actualidad, alrededor del 94% del mercado de semilla de maíz que se comercializa en Argentina es semilla híbrida que corresponde a híbridos simples (INASE 2022), provenientes de la hibridación entre dos líneas puras.

La cantidad de bolsas de maíz híbrido que se comercializa actualmente en la Argentina permite disponer de semilla híbrida para abastecer la siembra de las más de siete millones de hectáreas sembradas durante las campañas 2020-2021 y 2021-2022. El valor de comercialización de una tonelada de maíz *commodity* es similar al costo de una bolsa de semilla híbrida (BCR, 2023). Esto permite estimar que el valor de la producción por hectárea en concepto de semilla híbrida es 50 veces superior al que se obtiene de la producción de maíz para *commodity*.

El maíz es una especie alógama, anemófila y monoica. La utilización de la heterosis propició la producción de híbridos y determinó la necesidad de obtener materiales parentales, líneas puras homocigotas, forzando el sistema reproductivo natural de la especie, lo que a veces genera el fenómeno de la “depresión endogámica”, disminuyendo el valor adaptativo de los individuos. Su posterior hibridación para obtener semilla híbrida permite recuperar la expresión de las características superiores.

Lograr la mayor heterosis dependerá de los orígenes genéticos de las líneas puras, así como de su capacidad de combinación –aptitud combinatoria- (Sprague y Tatum, 1946). En cuanto a los orígenes de las líneas, Melchinger y Gumber (1998) desarrollaron el concepto de grupos heteróticos; si ambas líneas progenitoras pertenecieran a distintos grupos heteróticos será posible lograr mejor desempeño de la F1 híbrida. Pueden establecerse grupos heteróticos simples, como es el caso de los endospermas *Flint* y *Dent*.

La producción de maíces híbridos simples se basa en la hibridación entre dos líneas endocriadas; una línea masculina polinizadora que produce gran cantidad de granos de polen llamada comúnmente progenitor o parental masculino, que aporta el polen y otra línea femenina pistilada, llamada progenitor o parental femenino, cuyos estigmas serán fecundados. La obtención de las líneas puras implica recurrir al uso de un sistema regular de endocria. En el caso del maíz, dada su condición de diclina monoica y su protandria es posible recurrir a la autofecundación. La autofecundación es la fecundación de las gametas masculinas y femeninas provenientes de un mismo individuo; se traduce en un incremento de la proporción de genotipos homocigotas a expensas de la disminución de la proporción de genotipos heterocigotas en una proporción del 50% por cada generación de autofecundación. De esta manera se pueden aumentar gradualmente las frecuencias génicas de los caracteres de interés hasta lograr que se fijen. Una vez fijadas las frecuencias génicas se pueden obtener posteriormente individuos con pureza genética total, correspondientes 100% al genotipo parental, sin contaminaciones.

En una especie alógama lograr la fecundación entre las propias gametas de la misma planta requiere aislamiento con barreras físicas para permitir que solo el propio polen sea dirigido a los estigmas del mismo individuo, impidiendo la presencia de polen extraño. La protandria facilita el aislamiento; existe un intervalo de tiempo entre la antesis y la emergencia de los estigmas. Distintos tipos de estrés pueden acentuar la asincronía entre la antesis (dispersión de polen) y la aparición de estigmas, ASI (*anthesis-silking interval*), etapa

llamada usualmente intervalo antesis-floración femenina. Por este motivo, el ASI es ampliamente reconocido como uno de los caracteres secundarios de selección más relevantes utilizados en la mejora genética del maíz. Un mayor sincronismo en el desarrollo entre la panoja y la espiga superior (menor ASI) mejora el número de granos por unidad de superficie debido a una mayor partición a estructuras reproductivas durante el periodo crítico y a un mayor factor de fertilidad (Andrade et al., 2023).

Cuando se intenta incrementar, por autofecundación, el volumen de semillas de las líneas endocriadas, donde el intervalo antesis-floración es prolongado, la producción de semilla se podría alterar debido a la posible menor disponibilidad de estigmas receptivos en el momento de liberación de polen. Si las líneas tuvieran intervalos más cortos, también se podría afectar el volumen de producción de semillas si hubiera alguna situación de estrés de alto impacto. Por el contrario, cuando el incremento de la cantidad de semillas de las líneas endocriadas se realice en condiciones panmícticas se ampliará la ventana de disponibilidad de polen y estigmas receptivos.

El aislamiento de gametas se realiza frecuentemente por medio de la colocación de bolsas: con una bolsa se cubre la inflorescencia masculina para luego recolectar su polen, con otra se cubre y aísla la inflorescencia femenina. Cuando los estigmas están receptivos, el polen recolectado de la inflorescencia masculina se lleva a los estigmas de la espiga. El aislamiento deberá realizarse antes del inicio de la actividad reproductiva de los individuos.

La producción de semilla de alta calidad es un punto de partida básico de la agricultura eficiente, capaz de satisfacer las crecientes demandas de alimentos. En el caso de la producción comercial de semilla híbrida, se considerará que la calidad es un atributo de excelencia, dinámico y lábil que se gestiona durante la producción a campo. La calidad fisiológica de las semillas garantizará su germinación y viabilidad en todas las etapas de producción, tanto de semillas parentales como en la producción comercial de semilla híbrida.

En la industria semillera es también muy relevante la calidad genética, entendida como la pureza genética de la semilla. La correspondencia de los individuos a campo con su patrón genotípico puede determinarse actualmente usando marcadores moleculares en análisis de laboratorio. El uso de los *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs, o polimorfismo de un solo nucleótido permitió detectar variantes genómicas en la posición de una base única en el ADN de los genes de cada genotipo. Los SNPs son marcadores simples de obtener y resolver en el laboratorio y tienen un costo relativo bajo, lo que sugiere que podrán ser una

fuerza importante de información genética y una herramienta más y de fácil acceso para el mejoramiento. El mejorador puede definir el patrón de marcadores SNPs de cada línea parental de su portafolio, caracterizándolas e identificándolas a través de un patrón único e irrepetible. Es factible conocer el grado de “estabilidad” – loci al estado homocigota, *true type* – para algún o algunos marcadores, establecer con certeza y precisión si hubo contaminación con polen de otro genotipo –*out cross*–, identificar si existió contaminación física o mezcla entre semillas que no pertenecieran a la línea –*off type*– como también y no menos importante, identificar la presencia de un evento transgénico, si la línea lo poseyera. Cualquier semilla que posea un patrón discordante del *true type* deberá ser eliminada para garantizar la pureza genética total del lote de semillas.

Las semillas parentales se originan en el área de investigación o área de parentales de esta industria. Durante su “ciclo de vida” pasan por sucesivas etapas en las que se logran incrementar sus cantidades, son las etapas de multiplicación, fundacionales del escalado de volúmenes para la posterior producción, tanto de las líneas parentales como de la semilla híbrida a producir. La pureza genética de la semilla parental juega un rol determinante en el resultado del proceso de producción exitosa de semilla de cualquier híbrido de maíz.

Las actividades productivas con fines económicos buscan maximizar la rentabilidad. Los costos de la estructura productiva son necesarios para poner en funcionamiento el circuito de la producción de semilla híbrida comercial y consisten en el costo de los recursos que se consumirán para lograr la obtención del producto final, la semilla híbrida de maíz para su comercialización. La tierra, la mano de obra, los insumos, la energía, los vehículos, la logística, el transporte, la enumeración no pretende ser exhaustiva. En el caso particular de la obtención y producción de semillas de las líneas progenitoras para producir los híbridos comerciales de maíz, el costo de producción de las llamadas “parentales” incide sustancialmente en la estructura de costos. Disponer de stocks de semillas parentales genéticamente puros permitirá reducir significativamente uno de los factores de los costos, el de mano de obra, reduciendo la purificación en los lotes de producción de semilla de parentales. Disponer además de semilla de alta calidad fisiológica, con elevado poder germinativo y viabilidad permitirá cosechar más unidades de semilla por unidad de superficie.

La identificación, producción y comercialización de semilla híbrida está reglamentada en el marco de la Ley 20247/73 en el Capítulo 3, Artículo 9 se indica la obligatoriedad de informar en el rótulo correspondiente, el porcentaje de poder germinativo y pureza físico-

botánica de la semilla envasada, así como el contenido neto de la unidad a comercializar (Infoleg, 2023). La obtención de un mayor número de unidades reproductivas por unidad de superficie, esto se traduciría en una reducción de costos e incremento del beneficio económico y ambiental. Encontrar alternativas al sistema convencional de autopolinización para lograr el aislamiento de las inflorescencias en un ambiente que facilite el flujo de polen y la autofecundación resultaría en una mejora operativa sustancial para el sistema de producción de semillas.

OBJETIVO

General

Evaluar alternativas operativas al proceso tradicional de autopolinización, conservando los parámetros de calidad genética, fisiológica y de rendimiento de las semillas parentales de maíz.

Específico

Diseñar y testear dispositivos *ad hoc* para simplificar la implementación operativa de la autofecundación en lotes aislados de producción de semilla de líneas parentales de híbridos de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en la localidad de Santa Isabel, provincia Santa Fe (33°52'28.20"S, 61°37'3.21"O). La siembra se realizó de forma manual con "escopeta" el 29 de octubre de 2019. Los surcos fueron de 15 m de largo, la densidad de siembra fue de 5 plantas m^{-1} , con un distanciamiento entre plantas de 0,20 m y la distancia entre surcos de 0,70 m.

El ensayo se fertilizó con 150 $kg\ ha^{-1}$ de fosfato di amónico a la siembra y 150 $kg\ ha^{-1}$ de N cuando el maíz estaba en V4 (4 hojas desplegadas, escala Ritchie et al., 1982). El cultivo creció sin deficiencia hídrica, se suministró agua con un riego artificial por goteo y sin impacto significativo de plagas, con un exhaustivo y equilibrado control químico.

Este ensayo consistió en la siembra de dos líneas endocriadas las cuales se utilizaron para producir híbridos comerciales, que por reglamentos de confidencialidad de la empresa a la cual pertenecen llamaremos línea X1 y X2. Sobre la X1 se realizaron las diferentes tratamientos y evaluaciones, la X2 fue utilizada como proveedora de polen contaminante, ya que ambas líneas pertenecen a grupos heteróticos diferentes con relación al tipo de endosperma de las semillas: tipo flint y tipo dentado.

En la Figura 1 se presenta un diagrama de la distribución espacial de las líneas X1 y X2 en el lote y se ejemplifica la disposición de la primera repetición del ensayo: cuatro surcos (s1, s2, s3 y s4) para los diferentes tratamientos en el genotipo X1 y cinco surcos intercalados del genotipo X2. La línea X2 se sembró rodeando a cada uno de los surcos de X1 para cada tratamiento, tal como si fueran "borduras individuales", con el objetivo de proveer polen contaminante en exceso y generar condiciones similares para cada surco de X1.

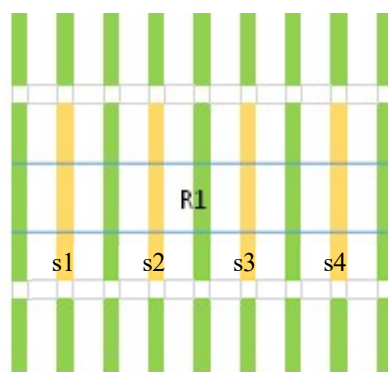


Figura 1. Diagrama de lote. Repetición 1.

- Línea parental x1, material a polinizar (15 m)
- Línea parental x2, material contaminante (15 m + 5 m)

Tratamientos

Los tratamientos realizados fueron:



Figura 2. Tratamiento convencional

CONVENCIONAL (C), que es el que se lleva a cabo habitualmente en la industria de semillas para realizar la autopolinización manual de la misma planta. Este procedimiento (método) convencional se realiza por etapas. La primera consiste en la colocación de una bolsa de papel o polietileno para espiga, antes que emerjan los estigmas R1. Posteriormente, cuando la última rama de la panoja es visible en la parte superior de la planta y las ramificaciones de la panoja tienen un $\frac{3}{4}$ de anteras visibles se coloca la bolsa de papel para panoja (Figura 2). Al día siguiente se retira la bolsa de panoja con el polen recolectado y se coloca sobre los estigmas receptivos para lo que previamente se retiró el sobre que cubría la espiga, evitando en todo momento dejar los estigmas expuestos a polen externo.

PAPEL (P), se diseñó un dispositivo de papel Kraft 80 gramos, de 22 cm de ancho y 120 cm de alto que se colocó en ambas inflorescencias (Figura 3). El dispositivo o capuchón de papel consistió en una bolsa de papel que cubrió la planta de maíz desde la panoja hasta la espiga. Las bolsas se sujetaron a las plantas con broches colocados con una engrapadora doméstica, para evitar que se desprendieran durante la ontogenia del cultivo, hasta la finalización de este experimento, cuando se cosecharon.



Figura 3. Tratamiento Papel



Figura 4. Tratamiento Tela

TELA (F), se diseñó un dispositivo de Friselina, tela no tejida de polipropileno, de 80 gramos de 22 cm de ancho y 120 cm de alto. El capuchón de tela consistió en una bolsa confeccionada a mano con la que se cubrió la planta de maíz desde la panoja hasta la espiga (Figura 4), antes de la emisión del primer estigma de la inflorescencia femenina. Las bolsas se sujetaron a las plantas, para evitar su desprendimiento, con broches colocados con una engrapadora doméstica, para lograr que se mantuvieran hasta la cosecha.

NYLON (N), se diseñó un dispositivo de polietileno de alta densidad 60 micrones microperforado, que consistió en un capuchón 20 cm de ancho y de 120 cm alto. A diferencia de C, P y F, este dispositivo tuvo que ser intervenido con micro-perforaciones, realizadas con alfileres de cabeza metálica de uso doméstico, para lograr el ingreso de oxígeno a la planta y tratar de evitar una excesiva condensación.



Figura 5. Tratamiento Nylon

Además, este dispositivo tuvo dos aperturas, una por donde se colocó la panoja y otra para poder dejar las hojas que se encontraban entre la panoja y la espiga, por fuera del dispositivo y recubriendo la espiga. Se intentó además lograr que la mayoría de las hojas estuvieran expuestas al ambiente y no dentro del nylon, para evitar condensación y dejar superficie fotosintéticamente activa (Figura 5). De esta manera se logró crear un ambiente similar a un “tubo” para lograr que el flujo de polen polinizara y fecundara a los estigmas receptivos. Las bolsas se sujetaron en ambas aperturas con broches de engrapadora doméstica, para lograr que se mantuvieran hasta la cosecha.

Para todos los casos mencionados los dispositivos se colocaron antes que se produjera la emisión del primer estigma de cada planta y los mismos permanecieron hasta fin de ciclo, para asegurar que cada planta autofecundada no recibiera polen externo.



Figura 6. Momento de colocación de dispositivos.

Los dispositivos se colocaron cuando el tamaño de la panoja superaba el tamaño de la hoja bandera, tal como lo muestra la Figura 6 y antes de iniciar el periodo reproductivo, previo a R1 (Ritchie et al., 1982) para evitar el ingreso de polen extraño en X1.

Dado que los ciclos de las líneas X1 y X2 son similares, la determinación del momento de colocación de los distintos dispositivos demandó recorridas diarias previas y durante el período antesis.

La línea X1 expresó poca protandria, el intervalo antesis-estigma fue muy reducido por lo cual el momento de colocación de los dispositivos se concentró entre el 6 y 10 de enero.

Los tratamientos C, P, F y N se realizaron siguiendo la distribución en el terreno de la aleatorización tal como se muestra en la tabla 1. Todos los tratamientos se efectuaron

simultáneamente durante el ASI, en 35 plantas en cada una de las cuatro repeticiones del experimento.

Repeticiones	Aleatorización
R1	C-P-N-F
R2	F-C-P-N
R3	N-P-C-F
R4	P-N-F-C

Tabla 1. Aleatorización de los tratamientos

Para el tratamiento convencional fue necesario colocar dos dispositivos mientras que los tratamientos P, N y F consistieron en la colocación de un único dispositivo diseñado *ad-hoc*. Esta estrategia se diferencia de la metodología convencional, en la que se utilizan dos bolsas, que cubren por separado e individualmente las inflorescencias femeninas y masculinas.

Las inflorescencia masculinas y femeninas se mantuvieron cubiertas desde la colocación de los dispositivos hasta el momento de cosecha en todos los tratamientos. La cosecha se realizó el 2 de marzo de 2020, con un valor de 33% de humedad \pm 2. La Humedad (H) se determinó con un humedímetro Dickey John calibrado.

Se cosecharon las espigas de todos los tratamientos y todas las repeticiones. La recolección de las espigas se realizó de forma manual; cada tratamiento se identificó y conservó individualmente. Las espigas se secaron a 30°C de temperatura en una secadora de cubos, hasta obtener una humedad de 12% \pm 1. Cada una de las espigas se desgranó individualmente.

Las variables que se midieron fueron:

Variables de operatividad

Tiempo Operativo (TO): Se cronometró el tiempo de la colocación de cada uno de los dispositivos durante cuatro días, la medición de tiempo se realizó en 10 plantas de cada repetición para cada tratamiento. La tarea fue realizada siempre por el mismo operario. El

tiempo se registró desde que el operario tomó cada dispositivo con su mano (tiempo cero) hasta que colocó el último broche para sujetar el dispositivo a la planta (tiempo final). El tiempo operativo se calculó como la diferencia entre el tiempo cero y tiempo final, ese valor se expresó en segundos. $TO = T_{\text{final}} - T_{\text{cero}}$.

Variables de rendimiento

El Peso Promedio (PProm): se pesaron los granos obtenidos de cada espiga para cada repetición y cada tratamiento se expresó en gramos, el peso se ajustó por humedad. Se separaron al azar 30 gr de semilla proveniente de cada espiga para conformar la muestra que se utilizó para obtener el dato de P1000 para cada tratamiento de cada repetición.

Se pesaron con una balanza de precisión calibrada (Figura 7).



Figura 7. Imagen de la balanza

Variables de calidad fisiológica

El ensayo de Poder Germinativo (PG) fue realizado bajo las normas ISTA, 2016. Se hicieron 4 repeticiones de 100 semillas cada una. La temperatura de germinación en la cámara de incubación fue $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ durante 7 días. Los resultados se expresaron en porcentaje (%) indicando el % de plántulas normales sobre el total.

Se realizó el ensayo de Cold Test para determinar el VIGOR (VG) de las muestras, se hicieron 2 repeticiones de 100 semillas cada una, que se incubaron en cámara de frío a 10°C durante 7 días, luego se trasladaron a la cámara de germinación a 25°C durante 4 días más, la duración total del test: 11 días. Se contabilizaron las plántulas normales emergidas. Los resultados se expresaron en porcentaje (%) indicando la relación de plántulas normales sobre el total.

Variables de pureza genética

Se remitió al laboratorio una muestra de 368 semillas por cada tratamiento y cada repetición para el análisis de SNPs. Este tamaño de muestra garantizó la precisión de los resultados. Los resultados de pureza genética (PGen) se expresaron en porcentaje (%)

promedio de las semillas cuyos perfiles SNPs, coinciden con los de referencia para ese genotipo, es decir semillas *On Type*.

Análisis estadístico

Los datos de las variables operativas, de rendimiento y de calidad fisiológica y genética se analizaron con el software estadístico Infostat (Grupo InfoStat, 2014). Se comprobó la distribución de los residuales de todas las variables por medio del test de Shapiro-Wilks. Cuando se distribuyeron como normales, se utilizaron análisis de varianzas y test de comparación de medias. Cuando los residuales de las variables no se distribuyeron normales, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó la distribución normal de las variables por medio del análisis de sus residuales estandarizados. Los resultados de la prueba de Shapiro-Wilks se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. W de Shapiro-Wilks para las variables TO, PProm, P1000, PG, VG y PGen y sus significados.

<u>Variable</u>	<u>n</u>	<u>W*</u>	<u>p(Unilateral D)</u>
RDUO TO	40	0,96	0,6281
RDUO PProm	12	0,91	0,3320
RDUO P1000	12	0,92	0,3965
RDUO PG	12	0,92	0,3972
RDUO VG	12	0,94	0,6113
RDUO PGen	12	0,70	0,0001

Los resultados que se muestran en la Tabla 2 del test de Shapiro-Wilks permitieron asumir que las variables TO, PProm, P1000, PG y VG provinieron de una distribución normal, por lo que se realizaron los análisis de varianza y los test de comparación de medias de DMS – Diferencia mínima significativa-. No se encontraron evidencias que la PGen proviniera de una distribución normal, por lo cual los datos se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis.

Variables de operatividad

Tabla 3.1. Análisis de la Varianza para TO y su significado.

<u>Fuente de Variación</u>	<u>Grados de Libertad</u>	<u>Cuadrado Medio</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Trat	3	9616,70	450,16	<0,0001
Error	36	21,36		

Tabla 3.2. Test de comparación de medias para TO, DMS y sus significados.

<u>Trat</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	
F	32,30	10	A
C	39,75	10	B
P	41,48	10	B
N	99,35	10	C

DMS=4,19; Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Los resultados de la Tabla 3.1 mostraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($F=450,16$; $p < 0,0001$). El TO fue significativamente menor cuando se usó la bolsa de Friselina (F) y el mayor TO lo insumió el tratamiento N. El TO demandado para colocar los dispositivos C y P fue intermedio y similar entre ambos. La colocación del dispositivo de Nylon, capuchón con doble apertura, fue la que demandó significativamente más TO. Lograr que ingresara la panoja por el primer orificio, bajar el capuchón, abrazar y sujetar la espiga por el segundo orificio, logrando que las hojas quedaran expuestas al ambiente, fue la maniobra más lenta de colocación de los dispositivos experimentales, incrementando la demanda de TO (figura 8C). Por el contrario, la colocación del dispositivo de Friselina fue el TO significativamente más corto, el material es flexible, no se embolsó con el viento, es una operación que puede realizarse con una única maniobra. Todas las hojas quedaron dentro del dispositivo y luego éste se sujetó a la planta (Figura 8B). El tratamiento Convencional y el de Papel tuvieron TO intermedios y fueron similares, difiriendo en menos de 2 segundos, a pesar de tratarse de distintos dispositivos. El Convencional demandó mayor TO ya que se sumaron los TO de las distintas etapas, a saber: aislamiento inferior (estigmas), aislamiento superior (panoja), recolección de polen y fecundación (Figura 8A).

Por el contrario, el tratamiento de Papel consistió en la colocación de un único dispositivo y por una única vez; este material fue más rígido por el gramaje y su manipulación podría haber sido más dificultosa que en el Convencional. Es remarcable que la colocación de dos dispositivos y la realización de la operación de recolección de polen y posterior fecundación, que sólo se realizó en el tratamiento Convencional, haya demandado casi el mismo tiempo que la colocación de un único dispositivo. Esto podría atribuirse a la extrema pericia y experiencia del personal de campo que realiza habitualmente las operaciones de autofecundaciones.



Figura 8. A: Tratamiento Convencional (C); B: Tratamiento Friselina (F); C: Tratamiento Nylon (N); D: Tratamiento Papel (P).

VARIABLES DE RENDIMIENTO

Los tratamientos se dispusieron a campo y permanecieron en el lote de ensayo, bajo las mismas condiciones ambientales durante la autopolinización y hasta la cosecha. El tratamiento P, que consistía en usar bolsas de papel, se deterioró durante la ontogenia del cultivo en la mayoría de las plantas. Solo en algunas plantas en las que las bolsas de papel perduraron, se pudieron recuperar enteras e indemnes en el momento de la cosecha. Sin embargo, no se pudieron cosechar suficiente cantidad de espigas y/o semillas. El papel posiblemente dado su opacidad, no haya permitido ingresar suficiente luz a la superficie fotosintéticamente activa de las plantas. No se obtuvieron suficientes datos para determinar las variables de rendimiento, calidad fisiológica y calidad genética.



Figura 9. Establecimiento de unidades reproductivas de las espigas cosechadas correspondientes a diferentes repeticiones de A- tratamiento Convencional, B- tratamiento Friselina, C-tratamiento Nylon (N) y D- tratamiento Papel (P).

El PProm y el P1000 mostraron diferencias significativas ($F=133,75$; $p < 0,0001$ y $F=30,36$; $p < 0,0001$; Tablas 4.1 y 5.1, respectivamente). Para PProm y P1000 los rendimientos registrados para N fueron significativamente menores que para el tratamiento C (Tablas 4.2 y 5.2, respectivamente).

Tabla 4.1. Tabla análisis de la Varianza para PProm y su significado.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p-valor
Trat	2	4940,66	133,75	<0,0001
Error	9	36,94		

Tabla 4.2. Test de comparación de medias para PProm, DMS y sus significados.

<u>Trat</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	
N	14,72	4	A
F	75,13	4	B
C	76,05	4	B

DMS=9,72; *Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)*

El PProm de N fue significativamente menor en relación a C y F, que mostraron valores similares (Tabla 4.2). Las espigas de C y F, fueron en su mayoría espigas con semillas completamente cuajadas (Figura 9. A y B). En los tratamientos N y P se establecieron muy pocas y aisladas de semillas, (Figura 9. C y D).

Tabla 5.1. Tabla de análisis de la varianza para P1000 y su significado.

<u>Fuente de Variación</u>	<u>Grados de Libertad</u>	<u>Cuadrado Medio</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Trat	2	258,08	30,36	0,0001
Error	9	8,50		

Tabla 5.2 Test de comparación de medias para P1000, DMS y sus significados.

<u>Trat</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
F	234,25	4	1,46	A
C	243,50	4	1,46	B
N	250,25	4	1,46	C

DMS=5,75587; *Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)*

El P1000 fue significativamente diferente entre los tratamientos realizados. El mayor P1000 lo tuvo el dispositivo N; el dispositivo C tuvo un P1000 intermedio, mientras que F fue el menor. El P1000 de F fue además significativamente menor que el del C.

Los dispositivos para la autopolinización utilizados en este trabajo se colocaron previamente a la antesis y permanecieron hasta la cosecha; los resultados permiten inferir que el ASI no mostró comportamientos anómalos. Los datos del Gráfico 1 presentado en el Anexo mostraron que las temperaturas mínimas y medias durante la polinización fueron las habituales para la época. Por otra parte, las restricciones impuestas por la endogamia fueron similares para las líneas X1 y X2 por lo que las diferencias en los resultados de rendimiento podrían atribuirse al diseño y naturaleza entre los dispositivos.



Figura 10. Condensación en Tratamiento N

El dispositivo de Nylon no fue lo suficientemente permeable al vapor del agua (Figura 10), permitió la condensación en el interior del dispositivo y favoreció que las anteras de las panojas quedaran en contacto de la pared del dispositivo, modificando posiblemente la capacidad polinizadora y afectando la fecundación. La cantidad o el tamaño de las microperforaciones no fue suficiente para impedir la condensación dentro del dispositivo; posiblemente se requerirían perforaciones de mayor tamaño o mayor cantidad de perforaciones por unidad de superficie. En cualquiera de estas situaciones y en consonancia con nuestros resultados experimentales, la pureza genética podría verse afectada. Otro abordaje distinto sería indagar sobre otros tipos de nylon, con otras características.

En la figura 9 C y D se observaron espigas con muy poca cantidad de semillas con el tratamiento N. La capacidad de las semillas de competir por fotoasimilados, es en primera instancia función de la cantidad que inicia el llenado efectivo y su capacidad de crecimiento (Edmeades et al; 2000). La menor competencia por fotoasimilados podría haber determinado mayor peso unitario, por consiguiente, mayor P1000.

Los PProm similares entre los dispositivos Convencional y Friselina revelaron la utilidad potencial de Friselina como una alternativa. Los menores valores de P1000 demostraron que fue posible obtener un mayor número de unidades reproductivas con el dispositivo de Friselina que con el Convencional, para su siembra y generación de nuevo stand de plantas, impulsando el uso del diseño del dispositivo de Friselina como una estrategia a considerar y seguir profundizando en su estudio.

Variables de calidad fisiológica:

Los análisis de varianza de las Tablas 6 y 7 muestran que no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($F=0,68$ y $F=2,29$, ns). Los valores de PG obtenidos fueron de 95,75; 96,50 y 97,50 para N, F y C respectivamente. La calidad fisiológica determinada con PG superó el valor umbral del 95% con los tres dispositivos experimentales. Los valores de VG también fueron elevados: 94,50 para N y 96,75 para F y C.

Tabla 6. Tabla de análisis de la varianza para PG y su significado.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p-valor
Trat	2	3,08	0,68	0,5304
Error	9	4,53		

Tabla 7. Tabla de análisis de la varianza para VG y su significado.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p-valor
Trat	2	6,75	2,29	0,1568
Error	9	2,94		

Estos resultados mostraron que los distintos dispositivos C, F y N no afectaron la calidad fisiológica de las semillas. Aunque la semilla parental no se comercializa, es muy importante destacar que todos los valores de PG obtenidos superaron el 90% - mínimo requerido por la Res. 2270/93 promulgada por INASE - y fueron mayores a 95%, valores referenciales basales, usuales e internos propios de la industria de semillas.

Variables de pureza genética

En la Tabla 8 se presentan los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para PGen. De acuerdo con los resultados se pudo inferir que las medianas de las poblaciones de los distintos tratamientos no fueron iguales. En este caso, la calidad genética de los tratamientos F y C fue máxima, mientras que se pudo detectar menor PGen, 92% cuando se utilizó el tratamiento N. El umbral interno de tolerancia determina una PGen = 100%. El tratamiento N mostró 8% de semillas con polinización cruzada o semillas *out cross*.

Tabla 8. Prueba de las medianas de Kruskal-Wallis para PGen y su significado.

Variable	Trat	N	Medias	Medianas	Promedio rangos	H	p
PGen	F	4	100,00	100,00	8,50	7,38	0,0061
PGen	N	4	92,05	92,12	2,50		
PGen	C	4	100,00	100,00	8,50		

El diseño y material del dispositivo de Nylon podrían haber permitido el ingreso de polen extraño en su interior a través de sus dos aperturas, o debido al cerrado incorrecto o

también a las microperforaciones, motivo que sugiere no continuar explorando su posible utilización en condiciones de producción.

CONCLUSIONES

- El diseño de los dispositivos usados en este trabajo final se basó en una concepción cilíndrica para generar un ambiente que facilitara el movimiento y dispersión libre del polen, desde la panoja hasta los estigmas, favoreciendo la autofecundación.
- El dispositivo de Papel se deterioró y desapareció en el transcurso de este experimento.
- El Tiempo Operativo demandado para la colocación del dispositivo de Friselina fue el menor de todos.
- El Rendimiento expresado como PProm fue similar con la operatoria Convencional y con la Friselina; aunque el P1000 obtenido con la innovación de Friselina, fue significativamente menor, posibilitando la producción de mayor cantidad de semillas por superficie y que el semillero disponga de más cantidad de semilla parental por unidad de superficie.
- El Poder Germinativo y el Vigor de semilla de la línea parental de maíz producida fueron similares para los tres tratamientos.
- Los menores valores de calidad genética y de rendimiento se manifestaron con el dispositivo de Nylon, debido posiblemente a las características del material y/o a las de su confección manual a escala hogareña.
- El uso del dispositivo de Friselina, facilitador de la operatoria de autofecundación de maíz, se seguirá evaluando.

BIBLIOGRAFÍA

Andrade, F., M.E. Otegui, A. Cirilo y S. Uhart, 2023. Ecofisiología y manejo de cultivo de maíz, 1ª ed. Balcarce: Libro digital, pdf. ISBN 978-987-88-8326-7

Bolsa de Comercio de Rosario, BCR, 2023. Estimaciones de producción, <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/gea/estimaciones-nacionales-de-produccion/estimaciones>.

----- Precios del mercado disponible, <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/mercado-de-granos/cotizaciones/cotizaciones-locales-2>

Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez L., M.Tablada y C.W. Robledo, 2014.

InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Di Yenno, F; A. Lugones, T.Rodríguez Zurro y E. Terré, 2021. ¿Cómo evolucionó el comercio internacional de granos en los últimos 40 años? Boletín Informativo Semanal de la Bolsa de Comercio de Rosario- Año XXXVIII-Ed. Nº2000-30-04-2021- <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/como-0>.

Instituto Nacional de Semillas, INASE, 2022. Producción de Semilla Fiscalizada bajo Normas de Fiscalización nacional 2022 (1/1/2022 al 31/12/2022) https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/inase_produccion_nacional_2022_0.pdf

-----, 2023. Resolución 2270/93. Tabla Tolerancias para Semilla Fiscalizada e Identificada de Cereales y Oleaginosas. Bs. As. <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/resolucionesagyp2270-93.pdf>

Infoleg, 2023. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=34822>

International Seed Testing Association, ISTA, 2016. Reglas Internacionales para el Análisis de las Semillas. Capítulo 5. Análisis de germinación. Online ISSN 2310-3655 www.ista.org/ISTA_Rules_2016_Spanish.pdf

Edmeades, G.O., J. Bolaños, A. Elings, J. Ribaut, M. Bänziger y M.E. Westgate, 2000. The Role and Regulation of the Anthesis-Silking Interval in Maize. In Physiology and Modeling Kernel Set in Maize (eds M. Westgate, K. Boote, D. Knievel y J. Kiniry) <https://doi.org/10.2135/cssaspecpub29.c4>

Melchinger, A. E. y R. K. Gumber, 1998. Overview of heterosis and heterotic groups in agronomic crops. In: Concepts and Breeding of Heterosis in Crop Plants. K. R. Lamkey, J. E. Staub (eds). Madison, Wisconsin. pp:29-44.

Ritchie, S. W., J. J. Hanway y G. O. Benson, 1993. How a corn plant develops. Iowa State University of Science and Technology. Cooperative Extension Service Ames, Iowa. Special Report, (48).

Sprague G. F. y L. A. Tatum, 1946. General vs specific combining ability in single crosses of corn. *Agronomy Journal*, 34:923-932.

ANEXO

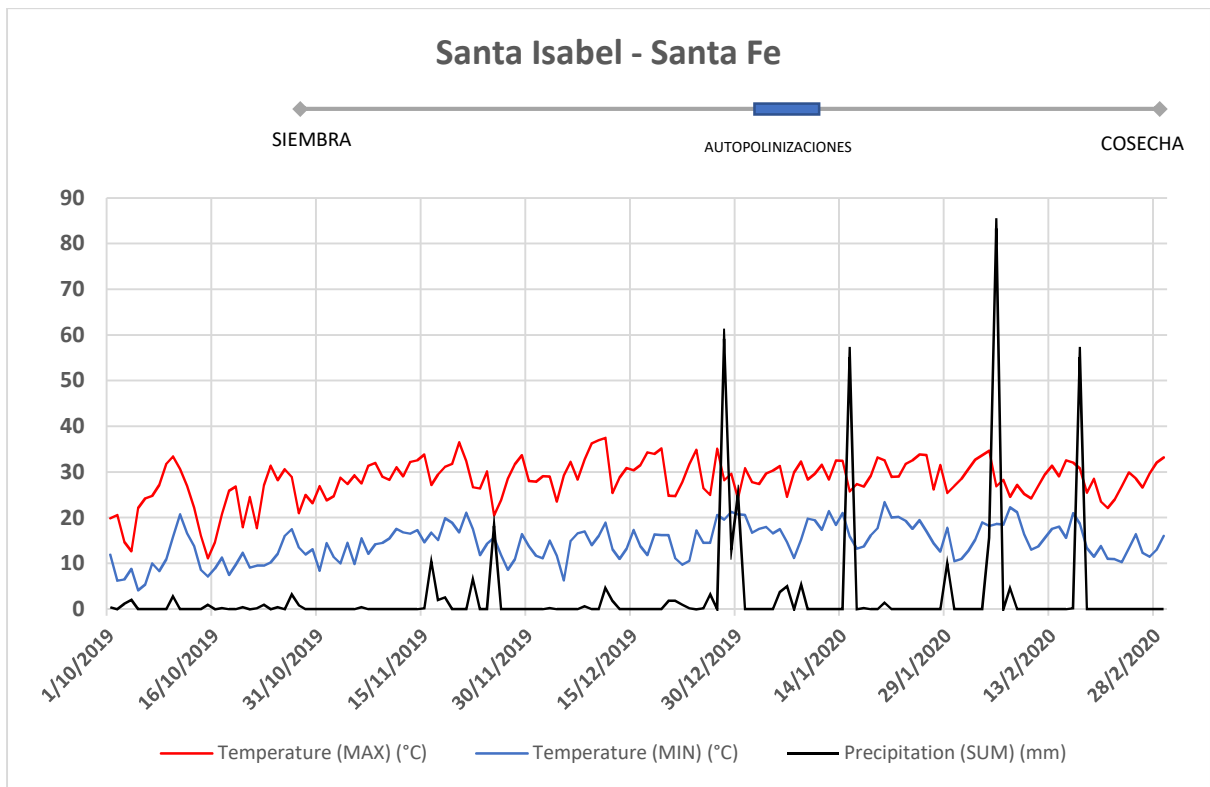


Gráfico 1. Temperaturas y precipitaciones registradas durante la campaña 2019/2020.