

Variabilidad del germoplasma de maíz (*Zea mays* L.) en Argentina: La aptitud forrajera asociada a la producción de bioetanol lignocelulósico.

*Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
de la Universidad Nacional de La Plata*

Luis Ezequiel García Stepien

Ingeniero Agrónomo
Universidad Nacional de Lomas de Zamora año 2007

Magister en Ciencias Agrarias y Forestales
Universidad Nacional de La Plata año 2012



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Universidad Nacional de La Plata

2020

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Luis Máximo Bertoia

Ingeniero Rural (Universidad Nacional de Lomas de Zamora)

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Lomas de Zamora)

Magister en Ciencias Agrarias (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agrarias y Forestales (Universidad Nacional de La Plata)

Co-director

Mónica Beatríz Aulicino

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de La Plata)

Doctor en Ciencias Naturales (Universidad Nacional de La Plata)

Fecha de defensa: 14 de agosto de 2020



DEDICATORIA

A mi hija Pía

A mi familia y amigos



AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mi hija Pía, mis padres Luis y Adela, hermana Natalia y su familia Leonardo y Valentina, por su apoyo incondicional y por permanecer a mi lado manteniendo firme el timón sin importar la magnitud de la tempestad.

A mis amigos, por acompañarme y por estar siempre presentes.

A mis directores Luis Bertoia y Mónica Aulicino, por su guía, consejos, paciencia y en especial por enseñarme a crecer profesionalmente.

A mi compañero de cátedra y referente Marcelo Torrecillas, por sus innumerables consejos.

A María Silvia Borlandelli, por su ayuda en el laboratorio con los innumerables análisis de las muestras.

A mis colaboradores, pasantes, becarios, hoy colegas y amigos, los ingenieros Martín Arizaga Inda, Diego Pérez, Yanina Ibáñez, Fernando Campos, Guido Carrillo y Dámaris Arakelian. Sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

A Marcelo Ferrer y Raquel Defacio del banco de semillas de INTA Pergamino; Roque Guillen Dow AgroSciences Argentina (Corteva Argentina, en la actualidad) y Alberto Pepper de Dekelb - Monsanto Argentina, (Bayer Argentina, en la actualidad) por su asesoramiento y por proporcionar las semillas de las poblaciones locales para realizar los experimentos.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora por financiar y permitirme ejecutar el proyecto tanto en las instalaciones del campo experimental como en el laboratorio NIRS de Cereales y Forrajes.



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.

Ing. Agr. (MSc.) Luis Ezequiel García Stepien



ÍNDICE GENERAL

	Contenido
TABLA DE ACRÓNIMOS	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS	xvi
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
CAPÍTULO I.....	1
Introducción general.....	1
Maíz, características generales de la especie.....	2
Historia y evolución del cultivo de maíz en Argentina.....	3
Mejoramiento y generación de estructuras genéticas en maíz.....	5
Potencialidad Genética del maíz para producir Bioetanol y Forraje.....	6
Composición de la biomasa lignocelulósica del maíz.....	9
Biocombustibles derivados de maíz.....	12
<i>Marco mundial de la producción de biocombustibles.....</i>	<i>12</i>
<i>Producción nacional de bioetanol de maíz.....</i>	<i>15</i>
Proceso de producción de bioetanol lignocelulósico.....	16
Objetivos e hipótesis.....	20
<i>Objetivo general.....</i>	<i>20</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>20</i>
Hipótesis.....	21
Materiales y Métodos en general de los experimentos.....	22
Descripción general de los experimentos.....	22
Condiciones generales de los experimentos.....	22
Caracterización ambiental.....	23
<i>Condiciones meteorológicas.....</i>	<i>23</i>



<i>Condiciones edáficas</i>	25
Diseño Experimental	26
Genotipos evaluados.....	27
Mediciones y estados de madurez evaluados	33
<i>Estado de madurez de cosecha para silaje (M1)</i>	33
<i>Variables evaluadas en el estado de madurez para silaje (M1)</i>	35
<i>Estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo) (M2)</i>	35
<i>Variables evaluadas en el estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo) (M2)</i>	36
Análisis de laboratorio mediante química húmeda.....	37
Generación de curvas de calibración de NIRS	40
CAPÍTULO II	43
Evaluación de los efectos genéticos y ambientales sobre las variables de rendimiento y calidad en dos estados de madurez de cosecha (silaje y grano) en genotipos de maíz... 43	
Objetivo.....	44
Metodología de Análisis de los datos.....	44
<i>Análisis de las Varianzas mediante el modelo de medias ajustadas en bloques incompletos</i>	44
<i>Análisis de parámetros genéticos de las variables de rendimiento y calidad en ambos estados de madurez de cosecha</i>	45
Resultados y Discusión.....	47
Estado de madurez de cosecha para silaje (M1).....	47
<i>Análisis de las variables de rendimiento y calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje</i>	47
<i>Caracterización de los parámetros genéticos relacionados a variables de rendimiento y calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje</i>	51
Estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo) (M2).....	53
<i>Análisis de las variables de rendimiento y calidad de la biomasa lignocelulósica y de rendimiento en grano en el estado de madurez de cosecha de grano</i>	54
<i>Caracterización de los parámetros genéticos relacionados a variables de rendimiento y calidad de la biomasa lignocelulósica en el estado de madurez de cosecha de grano</i>	60
Conclusiones	62
CAPÍTULO III.....	64



Caracterización de los recursos genéticos de maíz en función de su aptitud forrajera y su aptitud para la producción de grano y bioetanol lignocelulósico en dos estados madurez de cosecha.	64
Objetivo.....	65
Metodología de análisis de los datos.....	65
Resultados y Discusión.....	66
<i>Análisis de correlación entre las variables de aptitud forrajera en genotipos de maíz en el estado de madurez de cosecha de silaje.....</i>	<i>66</i>
<i>Análisis de componentes principales de la aptitud forrajera en genotipos de maíz.....</i>	<i>68</i>
<i>Análisis de correlación entre las variables de aptitud granífera y bioenergética lignocelulósica en genotipos de maíz en el estado de madurez de cosecha de grano (rastrajo).....</i>	<i>71</i>
<i>Análisis de componentes principales de la aptitud granífera y bioenergética lignocelulósica en genotipos de maíz.....</i>	<i>74</i>
Conclusiones	78
CAPÍTULO IV.....	79
Selección de genotipos con aptitud para la producción de grano y bioetanol lignocelulósico mediante índices de selección.....	79
Objetivo.....	80
Metodología de análisis.....	80
Resultados y Discusión.....	82
<i>Índices de selección de suma de rangos para la selección de genotipos doble propósito (grano y etanol lignocelulósico).....</i>	<i>82</i>
<i>Estimación de la estabilidad de los genotipos de maíz seleccionados con aptitud doble propósito.....</i>	<i>86</i>
Conclusiones	89
CAPÍTULO V.....	90
Variaciones Cualitativas-Cuantitativas en la fracción vegetativa de genotipos de maíz con distinto origen genético en dos estados de madurez de cosecha distintos (silaje y grano).	90
Objetivo.....	91
Metodología de análisis de los datos.....	91
Resultados y Discusión.....	92
<i>Análisis de conglomerados a priori para estado de madurez de cosecha para silaje.....</i>	<i>92</i>



Análisis de conglomerados a priori para estado de madurez de cosecha de grano.....	94
<i>Análisis de varianza de los conglomerados a priori en ambos estados de madurez de cosecha (Silaje y Rastrojo) para las variables de rendimiento y calidad de la fracción vegetativa.</i>	<i>95</i>
<i>Comparación de ambos estados de madurez de cosecha para las variables de calidad de la fracción vegetativa.....</i>	<i>96</i>
Conclusiones	104
CAPÍTULO VI.....	105
Conclusiones generales	105
Conclusiones generales	106
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	109
PRINCIPALES PRODUCCIONES DE LA TESIS	110
Publicaciones científicas con referato	110
Publicaciones en congresos científicos.....	110
Registros de propiedad intelectual.....	110
ANEXO.....	111
Fenología del cultivo de maíz.....	111
Correlaciones entre la temperatura y las variables de rendimiento y calidad de la fracción vegetativa de maíz en dos estados de madurez (silaje y grano).....	112
Relaciones entre el Rendimiento en Etanol Teórico Potencial (RETP) y las principales variables de calidad del rastrojo de maíz.....	113
Análisis de la varianza multivariado de los conglomerados a priori en el estado de madurez de cosecha de silaje	116
Análisis de la varianza multivariado de los conglomerados a priori en el estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo).....	117
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118



TABLA DE ACRÓNIMOS

Acrónimo	Referencia
**	Significativo al 1 %
*	Significativo al 5 %
α	Nivel de significancia
°C	Grados Centígrados
ACP	Análisis de Componentes Principales
ALTp	Altura de planta
ANVA	Análisis de Varianza
°B	Grados Brix
BMR	Brown mid rib
C-H	Enlace Carbono-Hidrógeno, Hidrocarburos.
Ca	Calcio
Cel	Celulosa
cm	Centímetro
CMe	Cuadrado medio del error experimental
CMg	Cuadrado medio de los genotipos
CP1	Componente Principal 1
CP2	Componente Principal 2
CS	Compuestos sintéticos
CVe%	Varianza ambiental en porcentaje
CVg%	Varianza genotípica en porcentaje
DFDN	Digestibilidad de la fibra
DOW	Dow Agro Sciences Argentina
DFDNch	Digestibilidad de la fibra de caña+hojas
DFDNr	Digestibilidad de la fibra de rastrojo
DIV	Digestibilidad <i>in vitro</i>
DIVch	Digestibilidad <i>in vitro</i> de caña+hojas
DIVr	Digestibilidad <i>in vitro</i> de rastrojo
DMS	Diferencia mínima significativa
EE.UU.	Estados Unidos
ETBE	Etilterbutil éster
Etc.	Etcetera
FAO	Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
F	Valor estadístico de la prueba de Fisher
FC	Factor de corrección de cada bloque incompleto
FDA	Fibra Detergente Ácido
FDAch	Fibra Detergente Ácido de caña+hojas
FDAr	Fibra Detergente Ácido de rastrojo
FDN	Fibra Detergente Neutro
FDNch	Fibra Detergente Neutro de caña+hojas
FDNr	Fibra Detergente Neutro de rastrojo
FFV	Flexible Fuel Vehicles



FS	Fecha de Siembra
FV	Fuente de variación
g	Número de genotipos
G1	Grupo 1, Poblaciones locales
G2	Grupo 2, Híbridos comerciales graníferos
G3	Grupo 3, Híbridos experimentales sileros
G4	Grupo 4, Híbridos precoces franceses
G5	Grupo 5, Compuestos sintéticos
GEM	Proyecto de Mejoramiento de Germoplasma de Maíz
GL	Grados de libertad
gle	Grados de libertad del error
H	Hidrógeno
ha	Hectárea. Unidad de superficie.
H ²	Heredabilidad en sentido amplio
h ²	Heredabilidad en sentido estricto
HD	Híbrido doble
Hem	Hemicelulosa
HES	Híbridos experimentales sileros
HS	Híbrido simple
hs	Horas. Unidad de tiempo.
ID	Código de identificación del genotipo
INRA	Instituto Nacional de la Investigación Agronómica de Francia
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina
INP	Instituto Nacional Politécnico de Toulouse
K	Potasio
kg	Kilogramo. Unidad de peso.
l	Litro. Unidad de volumen.
L.	Carl Nilsson Linnæus o Carlos Linneo. Botánico sueco 1707-1778.
LAMP	Proyecto de Maíz Latinoamericano
LDA	Lignina Detergente Ácido
LDAch	Lignina Detergente Ácido de caña+hojas
LDAr	Lignina Detergente Ácido de rastrojo
m	Metro. Unidad de medida.
M	Media de los genotipos
M.O.	Materia orgánica
M1	Estado de madurez de cosecha para silaje.
M2	Estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo)
METBE	Metilterbutil éster
Mg	Magnesio
mg	Miligramos. Unidad de peso
Minagri	Ministerio de Agroindustria de la República Argentina.
mm	Milímetro. Unidad de medida.
Mml	Mil millones de litros
MS	Materia seca



MSc+h	Contenido de materia seca de caña+hojas
Mse	Contenido de materia seca de espiga
MSpC	Contenido de materia seca de planta completa
N	Nitrógeno
N°	Número
NIRS	Near infrared reflectance spectroscopy
N-H	Enlaces Peptídicos. Bases nitrogenadas.
N-NO ₃	Nitrógeno de Nitratos
NS	No significativo
O-H	Enlace puente de Hidrogeno
OECD	Organización para la Economía, Cooperación y Desarrollo
<i>p</i>	<i>p</i> value
P	Fósforo
P.E.T.	Tereftalato de polietileno
Q	Quebrado de plantas a cosecha de grano
<i>r</i>	Número de repeticiones de los testigos
R ₁	Estadio fenológico de floración femenina, (Ritchie y Hanway, 1982)
R ₅	Estadio fenológico de grano dentado (Ritchie y Hanway, 1982)
R ₆	Estadio fenológico de madurez fisiológica (Ritchie y Hanway, 1982)
RETP	Rendimiento en Etanol Teórico Potencial
RG	Rendimiento en grano
RMS	Rendimiento en materia seca
RMSch	Rendimiento en materia seca de caña+hojas
RMSDpc	Rendimiento en materia seca digestible de planta completa
RMSe	Rendimiento en materia seca de espigas
S	Azufre
SG	Stay green
sp.	Especie
spp.	Subespecie
SSCF	Co-fermentación simultánea con la sacarificación
SSF	Sacarificación y fermentación simultánea
<i>t</i>	Tonelada. Unidad de peso.
<i>t</i>	Valor “ <i>t</i> ” de Student
V	Vuelco de plantas a cosecha de grano
V ₃	Estadio fenológico de tercera hoja expandida. (Ritchie y Hanway, 1982)
V ₆	Estadio fenológico de sexta hoja expandida. (Ritchie y Hanway, 1982)
VAj	Valores ajustados
VE	Varianza ambiental
VF	Varianza fenotípica
VG	Varianza genotípica
vs.	Versus



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Esquema de arquitectura de planta de teosinte (a.) y de maíz (b.). Adaptado de Doebley et al. (1990).	2
Ilustración 2. Expresión de rasgos BMR en hojas y tallos de genotipos de maíz.....	7
Ilustración 3. Esquema de la distribución de las distintas fracciones de fibra en el tejido vegetal.	10
Ilustración 4. Planta piloto de producción de bioetanol 100 kg/hora. INP Toulouse, Francia.....	17
Ilustración 5. Sistema simultanea de cosecha de granos y de biomasa lignocelulósica y rollo de biomasa de rastrojo de maíz.	19
Ilustración 6. Imagen del experimento durante la campaña 2013 (Virrey del Pino, 1/3/2013).	33
Ilustración 7. Avance de la línea de leche: Estado de madurez del grano de maíz dentro de R ₅	34
Ilustración 8. Equipo analizador NIRS 6500 Foss en funcionamiento.	41
Ilustración 9. Escala fenológica del maíz (adaptado de Ritchie and Hanway, 1982). ...	111



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de los rendimientos del cultivo de maíz en el período 1970-2019...	5
Figura 2. Porcentaje de materias primas utilizadas para la producción de biocombustibles a nivel mundial.....	13
Figura 3. Evolución de la producción de bioetanol del 2009 a 2018 en Argentina.	15
Figura 4. Condiciones meteorológicas del experimento durante las campañas 2012 (a), 2013 (b) y 2014 (c).....	24
Figura 5. Gráfico bi-dimensional (CP1 vs. CP2): genotipos de maíz agrupados sobre la base de su aptitud forrajera.	69
Figura 6. Gráfico bi-dimensional (CP1 vs. CP2): genotipos de maíz agrupados por su aptitud para la producción de biomasa lignocelulósica y grano.	75
Figura 7. Variación ambiental de los Índices de Selección de los genotipos selectos representado por sus medias y desvío estándar.....	85
Figura 8. Estabilidad Agronómica para la selección de genotipos con aptitud doble propósito (grano y biomasa lignocelulósica).	86
Figura 9. Fenograma del análisis de conglomerados <i>a priori</i> para las variables de calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje.....	92
Figura 10. Fenograma del análisis de conglomerados <i>a priori</i> para las variables de calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha de grano	94
Figura 11. Valores medios de LDA \pm error estándar para cada grupo <i>a priori</i> de genotipos de maíz en dos estados de madurez de cosecha, silaje vs. grano (rastrojo).	97
Figura 12. Valores medios de FDA \pm error estándar para cada grupo <i>a priori</i> de genotipos de maíz en dos estados de madurez de cosecha, silaje vs. grano (rastrojo).	99
Figura 13. Valores medios de FDN \pm error estándar para cada grupo <i>a priori</i> de genotipos de maíz en dos estados de madurez de cosecha, silaje vs. grano (rastrojo).	100



Figura 14. Valores medios de DIV \pm error estándar para cada grupo <i>a priori</i> de genotipos de maíz en dos estados de madurez de cosecha, silaje vs. grano (rastrojo).	101
Figura 15. Valores medios de DFDN \pm error estándar para cada grupo <i>a priori</i> de genotipos de maíz en dos estados de madurez de cosecha, silaje vs. grano (rastrojo)..	103
Figura 16. Relación entre Celulosa vs. Rendimiento de Etanol Teórico Potencial para todos los genotipos (Y1, \circ) y los genotipos selectos (Y2, \bullet).....	114
Figura 17. Relación entre Hemicelulosa vs. Rendimiento de Etanol Teórico Potencial para todos los genotipos (Y1, \circ) y los genotipos selectos (Y2, \bullet).....	114
Figura 18. Relación entre Lignina vs. Rendimiento de Etanol Teórico Potencial para todos los genotipos (Y1, \circ) y los genotipos selectos (Y2, \bullet).	115
Figura 19. Relación entre Digestibilidad vs. Rendimiento de Etanol Teórico Potencial para todos los genotipos (Y1, \circ) y los genotipos selectos (Y2, \bullet).....	115
Figura 20. Relación entre Digestibilidad de la Fibra vs. Rendimiento de Etanol Teórico Potencial para todos los genotipos (Y1, \circ) y los genotipos selectos (Y2, \bullet).....	116



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones meteorológicas de los experimentos.	25
Tabla 2. Valores de los principales indicadores de la calidad del suelo.	26
Tabla 3. Poblaciones locales de Argentina utilizadas en los experimentos (Grupo 1). ...	28
Tabla 4. Híbridos comerciales de Argentina utilizados en el experimento (Grupo 2)...	30
Tabla 5. Híbridos experimentales sileros utilizados en el experimento (Grupo 3).	31
Tabla 6. Híbridos precoces franceses utilizados en el experimento (Grupo 4).	31
Tabla 7. Compuestos sintéticos utilizados en el experimento (Grupo 5).	31
Tabla 8. Testigos utilizados en los experimentos.	32
Tabla 9. Análisis de varianza de las variables de rendimiento y Ciclo en el estado de madurez de cosecha para silaje.	47
Tabla 10. Análisis de varianza de las variables de calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje.	50
Tabla 11. Parámetros genéticos de las variables de rendimiento y calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje.	52
Tabla 12. Análisis de varianza de las variables de rendimiento de la biomasa lignocelulósica y de rendimiento en grano en el estado de madurez de cosecha de grano.	54
Tabla 13. Análisis de varianza de las variables de calidad de la biomasa lignocelulósica en el estado de madurez de cosecha de grano.	57
Tabla 14. Parámetros genéticos de las variables de rendimiento en grano y de rendimiento y calidad de rastrojo en el estado de madurez de cosecha de grano.	60
Tabla 15. Matriz de correlaciones fenotípicas de Pearson (Coeficientes\probabilidades) entre las variables de aptitud forrajera en genotipos de maíz en el estado de madurez de cosecha para silaje.	66



Tabla 16. Correlaciones con las variables originales de las variables de aptitud forrajera en el estado de madurez de cosecha de silaje.....	68
Tabla 17. Matriz de correlaciones fenotípicas de Pearson (Coeficientes\probabilidades) entre las variables de producción y calidad de biomasa lignocelulósica y producción de grano en genotipos de maíz en el estado de madurez de cosecha de grano.	72
Tabla 18. Correlaciones con las variables originales de las variables de aptitud para la producción de grano y biomasa lignocelulósica en el estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo).....	74
Tabla 19. Ranking de 30 Genotipos selectos mediante el índice de suma de rangos (IS1 (2012), IS2 (2013) y IS3 (2014)) y suma de rangos total (IST).....	83
Tabla 20. Valores medios de los genotipos seleccionados para las variables de Rendimiento y calidad en el estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo).	87
Tabla 21. Comparación de medias de las variables de rendimiento y de calidad de la fracción vegetativa del maíz en dos estados de madurez de cosecha (Silaje y grano)....	95
Tabla 22. Principales estados fenológicos del maíz (adaptado de Ritchie and Hanway, 1982).	111
Tabla 23. Análisis de correlación de Pearson entre la temperatura media del aire (Siembra-R ₁ , °C) vs. variables de rendimiento y calidad del tallo de maíz en el estado de madurez de cosecha para silaje.	112
Tabla 24. Análisis de correlación de Pearson entre la Temperatura media del aire (Siembra-R ₁ , °C) vs. variables de rendimiento y calidad del tallo de maíz en el estado de madurez de cosecha de grano.....	112



Variabilidad del germoplasma de maíz (*Zea mays* L.) en Argentina: La aptitud forrajera asociada a la producción de bioetanol lignocelulósico.

RESUMEN

El maíz posee un gran potencial para la producción de bioetanol, no sólo a través de la conversión del almidón del grano, sino también a partir de la celulosa y hemicelulosa del resto de la planta, siendo estos recursos altamente renovables. Existe variación genética en los distintos genotipos de maíz, tanto en rendimiento como en calidad de rastrojo, que podría ser aprovechada para la selección de nuevos materiales destinados a la producción de bioetanol lignocelulósico. La mejora genética debería incrementar la digestibilidad de la caña+hojas, reducir la lignina y aumentar la biomasa. Los objetivos de nuestro estudio fueron: a. Estimar componentes fenotípicos, genéticos y ambientales en relación a la calidad nutricional y rendimiento de la fracción vegetativa en los dos estados de madurez de cosecha (silaje y grano). b. Correlacionar las variables de rendimiento y calidad en dos estados de madurez diferentes de la fenología del cultivo para estimar la producción potencial de silaje y de bioetanol lignocelulósico. c. Clasificar el germoplasma a través de variables de rendimiento y calidad nutricional de la fracción vegetativa para identificar grupos con diferenciales aptitudes para la producción potencial de etanol celulósico. d. Evaluar las variaciones cuali-cuantitativas que sufre la fracción vegetativa de maíz al pasar del estado de madurez de cosecha para silaje al de grano, y su aptitud para la producción potencial de bioetanol lignocelulósico. Se evaluaron 144 accesiones + 3 testigos genéticamente divergentes, mediante un diseño de bloques aumentados durante 3 años consecutivos. Se realizó un análisis de componentes principales para clasificar a los genotipos a través de las variables de rendimiento y calidad determinadas en 2 estados de madurez de cosecha: silaje y grano (rastrojo). Se observó que las variables de calidad de la fracción vegetativa están más condicionadas por el efecto genético que por el

xviii



ambiental. LDA fue la variable con mayor varianza ambiental. DIV y DFDN podrían ser utilizadas como variables clasificatorias en programas de mejoramiento. El uso de índices de suma de rangos permitió la selección de genotipos con elevados rendimientos en grano, etanol teórico potencial y buen comportamiento agronómico. Algunas poblaciones locales, presentaron buena aptitud para la producción de forraje y bioetanol lignocelulósico, pudiendo ser utilizadas en futuros procesos de generación de líneas endocriadas.

Palabras clave: MAÍZ, RECURSOS GENÉTICOS, SILAJE, RASTROJO, BIOETANOL.



Variability of maize germplasm (*Zea mays* L.) in Argentina: The forage aptitude associated with lignocellulosic bioethanol production.

ABSTRACT

Maize has great potential for bioethanol production, not only through the conversion of grain starch, but also from the cellulose and hemicellulose of the rest of plant, being these resources highly renewable. There is genetic variation in the different maize genotypes, both in yield and in stubble quality, which could be used for the selection of new materials capable of producing lignocellulosic bioethanol. Genetic improvement should increase the digestibility of Stem + Leaf, reduce lignin and increase biomass. The objectives of our study were: a. To estimate phenotypic, genetic and environmental components in relation to nutritional quality and its yield of the vegetative fraction at two harvest maturity stages harvest times (silage and grain). b. To correlate the quality and quantity parameters at two different moments of the crop phenology to estimate the lignocellulosic bioethanol production potential. c. To classify germplasm through variables of yield and nutritional quality of the vegetative fraction to identify groups with differential aptitudes for the potential production of cellulosic ethanol. d. To evaluate the qualitative and quantitative variations in the maize vegetative fraction when passing from the harvest maturity stage for silage to grain, and its potential capacity to produce of lignocellulosic bioethanol. The 144 accessions + 3 Testers genetically divergent were evaluated, using an augmented block design for 3 years. A principal component analysis was performed to classify the genotypes through the performance and quality variables determined in 2 harvest maturity stages: silage and grain (stover). It was observed that the quality variables of the vegetative fraction are more conditioned by the genetic effect than by the environmental. LDA was the variable with the highest environmental variance. DIV and DFDN could be used as classification variables in breeding programs. The use of rank



sum indices allowed the selection of genotypes with high grain yields, potential theoretical ethanol and good agronomic performance. Some landraces maize showed good aptitude for the production of forage and lignocellulosic bioethanol, and could be used in future inbreeding line generation processes.

Key Words: MAIZE, GENETIC RESOURCES, SILAGE, STOVER, BIOETHANOL.



CAPÍTULO I

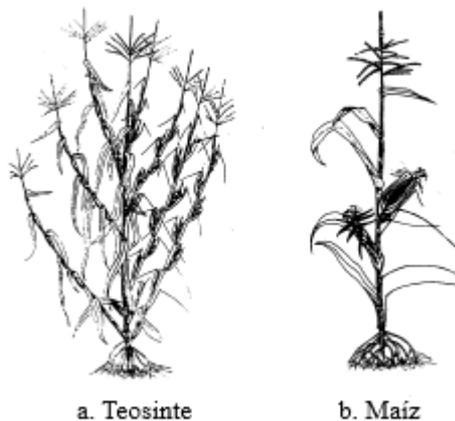
Introducción general



Maíz, características generales de la especie.

El maíz (*Zea mays L. ssp. mays*) es una especie anual, de ciclo estival y perteneciente a la familia de las *Poaceae*. La evidencia arqueológica y genética indica que esta especie fue domesticada hace aproximadamente 10,000 años en la cuenca del río Balsas, en el suroeste de México (Hufford et al., 2012). La domesticación implicó una transformación fenotípica radical de su progenitor salvaje, *Zea mays ssp. parviglumis* (Teosinte), lo que da como resultado una planta no ramificada con semillas unidas a una mazorca y, por lo tanto, el maíz depende completamente de los humanos para la propagación (Doebley et al., 1990; Hufford et al., 2012) (Ilustración 1).

Ilustración 1. Esquema de arquitectura de planta de teosinte (a.) y de maíz (b.). Adaptado de Doebley et al. (1990).



Este cultivo estival presenta una amplia zona de producción en todo el mundo. En el hemisferio sur la ventana de siembra va desde septiembre hasta enero y se cosecha entre marzo y agosto, esto depende del período de lluvias y el momento en que comienzan las heladas, de cada región.

A nivel mundial, el maíz es el tercer cultivo en importancia en relación a su área cosechada, con un promedio de 157 millones de ha por año y una producción de 781

mega toneladas mundiales por año entre 2000 y 2014 (Ramirez-Cabral et al., 2017). Este cultivo se destina principalmente a la alimentación animal, aunque también en la alimentación humana como en productos no alimenticios.

El maíz puede ser aprovechado tanto en planta entera, grano o rastrojo (residuo de cosecha). La planta entera (espiga + chalas + hojas + caña + panoja) se utiliza para la producción de reservas forrajeras para la producción animal o para la generación de biogas. El grano de maíz puede ser sometidos a distintos procesos: molienda húmeda, molienda seca, obtención de aceite del germen extraído en ambas moliendas y producción de bioetanol. De estos procesos se obtienen distintos productos tanto para la alimentación humana, animal industria farmacéutica, energía, etc.

Historia y evolución del cultivo de maíz en Argentina.

Las variedades locales o criollas (landraces) de maíz cultivadas en la Argentina a principios del siglo XX se habrían derivado, en parte, de semillas traídas por agricultores inmigrantes del Norte de Italia. Sin embargo, dado que el maíz ya se cultivaba antes de la dominación española, esas poblaciones se habrían cruzado con materiales americanos colorados duros o flint, cuyo origen geográfico, según algunos autores, sería el sur de Brasil, Paraguay y noreste argentino (Rossi, 2007). Estas variedades de polinización abierta dominaron el escenario del maíz argentino logrando incrementos de rendimiento de 9 kg ha⁻¹ año desde 1910 hasta 1950. En cuanto a los maíces dentados, si bien hubo introducción de semillas, su difusión fue sumamente escasa hasta las 2 últimas décadas del siglo XX.

Los trabajos de mejoramiento de maíz por endocría e hibridación en Argentina se iniciaron en la década del 20 por iniciativa oficial. No obstante, recién en 1945 se lograron los primeros híbridos dobles (HD), Santa Fe N° 2 y Santa Fe N° 3, en la Estación

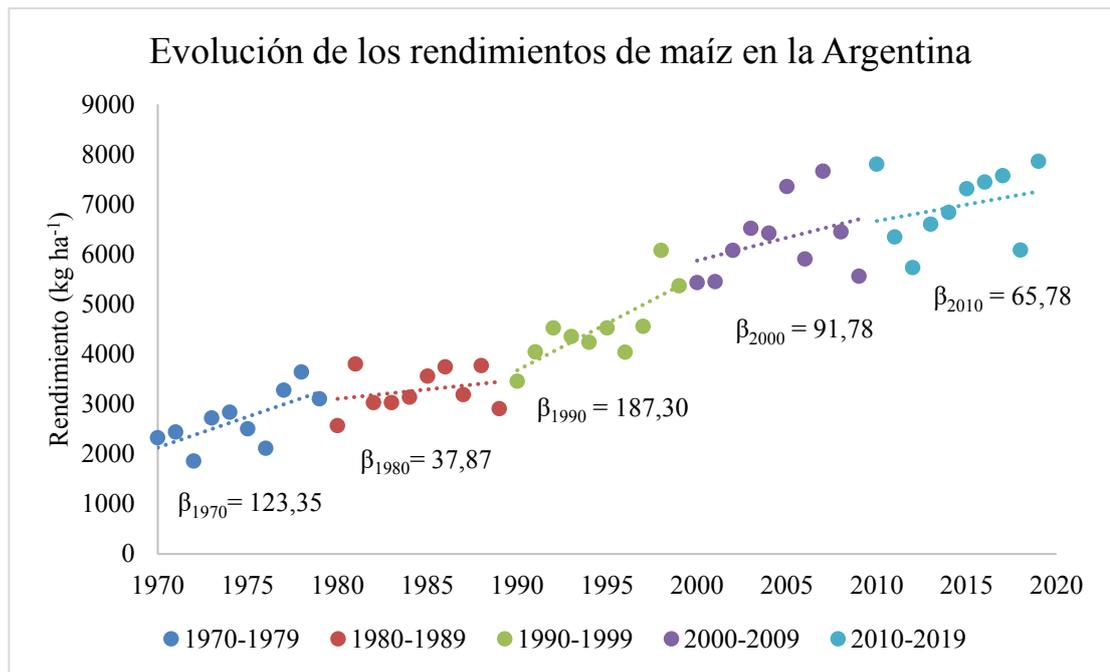


Experimental Ángel Gallardo de INTA. Desde 1951 hasta 1970 las variedades de maíz compartieron el mercado con los HD, logrando incrementos de rendimiento de 35,4 kg ha⁻¹ año, con rendimientos promedio de 1900 kg ha⁻¹ (Rossi, 2007). Durante la década del '70 con un amplio dominio de los HD, la ganancia registrada era de 123,35 kg ha⁻¹ año con un rendimiento promedio de 2685,5 ± 547,4 kg ha⁻¹ (Figura 1). En esta década también comenzó a tecnificarse más el cultivo, cosecha mecánica, uso de agroquímicos, etc. Luego, en la década del 80 se introdujeron en el mercado los híbridos de 3 líneas (3 vías, TWC) con una ganancia de 37,87 kg ha⁻¹ año y un rendimiento promedio de 3275,2 ± 422,4 kg ha⁻¹. A partir de la década del '90 se consolidó el predominio de los híbridos simples (HS), con la mayor ganancia anual registrada, 187,30 kg ha⁻¹ y un rendimiento promedio para la década de 4519,1 ± 733,0 kg ha⁻¹ (Figura 1). Durante esta década, se lograron estos importantes incrementos en la productividad, a causa de la disponibilidad de los nuevos HS de mayor potencial de rendimiento, mejor resistencia a enfermedades y plagas, una utilización más eficiente de los fertilizantes, incremento en la adopción de la siembra directa, mayor incorporación del riego complementario y el recambio del parque de cosechadoras entre otras (Rossi, 2007). Si bien los rendimientos promedio obtenidos en las décadas posteriores siguieron en aumento, 6284,9 ± 766,8 kg ha⁻¹ y 6960,7 ± 747,5 kg ha⁻¹ para las décadas del 2000 y 2010, las ganancias de rendimiento por año fueron cada vez menores (91,78 kg ha⁻¹ y 65,78 kg ha⁻¹, respectivamente). Estas dos últimas décadas se han caracterizado elevadas fluctuaciones interanuales reflejadas en sus elevados desvíos estándar, producto del clima errático que caracterizó estos últimos años (Figura 1). A su vez, la década del 2010 se caracterizó por un incremento en la superficie sembrada en fechas de siembra tardía, pasando de un 33% en el 2011 hasta un pico de 60% en el 2015, para luego estabilizarse alrededor de un 48% en las campañas posteriores (Gago et al., 2018). Estos últimos resultados remarcan la



importancia de seguir buscando ampliar la base genética del maíz y explorar nuevas tecnologías que nos permitan obtener mayores rendimientos y cultivos más eficientes y estables.

Figura 1. Evolución de los rendimientos del cultivo de maíz en el período 1970-2019.



Referencias: Datos de rendimiento promedio de maíz desde el año 1970 al 2019. Fuente: Ministerio de Agroindustria de la República Argentina (Minagri, 2020).

Mejoramiento y generación de estructuras genéticas en maíz.

A lo largo del proceso evolutivo de selección antrópica, el hombre ha aplicado sobre esta especie diversos procesos de selección genética derivado en la generación de distintas estructuras genéticas. En este trabajo, se analizarán tres tipos de estructuras que se describen a continuación:



Tipo A. Poblaciones de polinización abierta y/o selección masal. Son producto del mejoramiento de los propios agricultores. Las personas que domesticaron el maíz por primera vez, han seleccionado plantas y cultivares para satisfacer sus deseos y necesidades y, al hacerlo, desarrollaron miles de variedades locales adaptadas a una multitud de entornos, así como con una amplia gama de rasgos morfológicos y de calidad (Duvick, 2005). La unidad de selección comprende los fenotipos no replicados de plantas individuales (Hallauer et al., 1988). Los cultivares no adaptados (o a veces cruces de cultivares) se volvieron a seleccionar con éxito para su adaptación a la nueva región, pero después del avance inicial, las ganancias en rendimiento fueron pequeñas o inexistentes.

Tipo B. Híbridos (simples, dobles y tres vías). La heterosis o vigor híbrido es la base del mejoramiento genético por hibridación. Se define como el exceso de vigor de la F1 (primera generación) de un híbrido en relación con el promedio de sus progenitores (Hallauer et al., 1988). En la producción comercial de maíz se usan tres tipos de híbridos: cruza simple, cruza tres vías y cruza doble. El rendimiento potencial de los tres tipos de híbridos es: cruza simple > cruza tres vías > cruza doble (Hallauer et al., 1988).

Tipo C. Poblaciones sintéticas o Compuestos sintéticos. Son genotipos en equilibrio producto del cruzamiento de líneas o híbridos simples o dobles. Los sintéticos se pueden obtener mediante un cruzamiento aleatorio de un compuesto de híbridos y son seleccionados por su aptitud combinatoria general. De la segunda generación en adelante la semilla puede usarse directamente en la producción comercial (Márquez-Sánchez, 2008).

Potencialidad Genética del maíz para producir Bioetanol y Forraje.

Al buscar la generación de híbridos doble propósito para la producción de grano y biomasa lignocelulósica, Ertiro et al. (2013) encontraron que existen relaciones



contrapuestas entre las variables de rendimiento y las de calidad del rastrojo, por lo que proponen estudiar más a fondo la relación entre el rendimiento del grano y los rasgos de calidad, incluido el impacto del genotipo. El aumento de la lignina fue la consecuencia estructural necesaria para sostener el incremento del tamaño de la espiga de los híbridos actuales (Barrière et al., 2005; Duvick, 2005). No obstante, las variedades locales de maíz retienen más diversidad de nucleótidos y muestran menor diferenciación genética de su progenitor salvaje que otras especies cultivadas. Esto probablemente se deba a un su gran variabilidad y su sistema de apareamiento cruzado (Hufford et al., 2012). En este sentido, varios autores han encontrado que la lignina es el principal compuesto que limita el acceso de las enzimas a los polisacáridos de la pared celular, reduciendo así la degradabilidad de la biomasa lignocelulósica para el ganado rumiante (Jung et al., 2000; Torney et al., 2007) y en la potencial producción de etanol.

Ilustración 2. Expresión de rasgos BMR en hojas y tallos de genotipos de maíz.



Referencias: Hojas de maíz con la nervadura central marrón (izquierda), comparación de tallo de maíz BMR vs. tallo de maíz sin el rasgo (derecha).

Las comparaciones entre los híbridos de maíz sugieren que existe variación genética, que podría aprovecharse para aumentar el rendimiento de etanol por unidad de área, por ejemplo, alterando la concentración de lignina (Lorenz et al., 2009a), como son

los mutantes “brown midrib” (BMR) (Barrière et al., 2017) (Ilustración 2). En estos genotipos, se ven afectados distintos pasos de la ruta metabólica durante la síntesis de la lignina, produciendo un aumento de la digestibilidad de la fracción vegetativa (Barrière et al., 2017). No obstante, la reducción en el contenido de lignina generalmente va acompañada por una reducción en la biomasa, por consiguiente, cualquier reducción de ésta debería estar compensada por un incremento en el rendimiento de azúcares totales fermentables (Pedersen et al., 2005). Por otro lado, (Barrière et al., 2017) plantean la utilización de germoplasma con elevada digestibilidad de la pared celular, como la línea parental INRA F4, la cual alcanza valores de digestibilidad tan altos como los observados en varias líneas con el gen *bm3* (BMR).

Algunos autores (Lauer et al., 2001; Barrière et al., 2005, 2017) plantean que la selección para rendimiento en grano y resistencia al vuelco, podrían disminuir la calidad del forraje y como consecuencia, su aptitud potencial para producir bioetanol a partir del rastrojo. Lorenz et al. (2010) proponen incrementar la altura de la planta, el diámetro y la densidad del tallo, el área foliar y retrasar la senescencia, lo cual permitiría lograr aumentos de rendimiento en el grano y en la producción de biomasa lignocelulósica. De esta manera se podrían seleccionar híbridos con elevados rendimientos tanto para grano como para la fracción vegetativa. Estos antecedentes remarcan la importancia de encontrar fuentes de variabilidad genética para la producción de silaje y de este recurso energético sin comprometer el rendimiento en grano. Ejemplos de esta búsqueda son el Proyecto de Maíz Latinoamericano (LAMP) y el Proyecto de Mejoramiento de Germoplasma de Maíz (GEM) cuyo objetivo es introducir germoplasma nuevo en los programas de mejoramiento actuales (Pollak, 2001). Un proyecto similar (a menor escala) fue realizado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Argentina en el que se evaluaron 300 accesiones Argentinas en una etapa preliminar para combinar



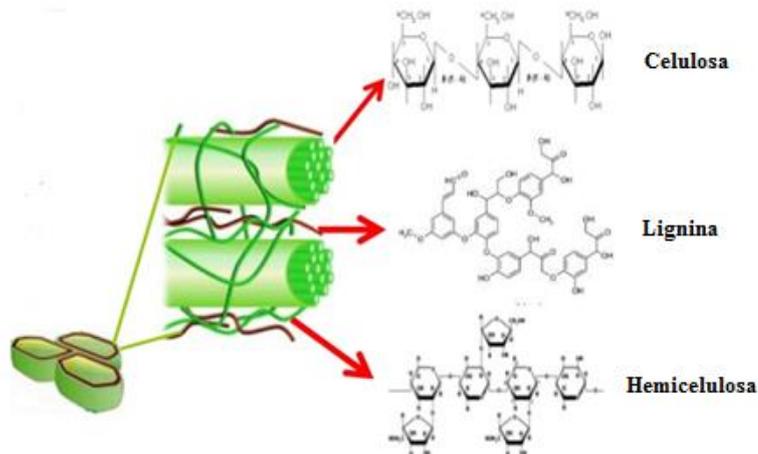
la capacidad de rendimiento de grano en cruces con cuatro evaluadores de base y origen exótico, y se seleccionaron los mejores treinta (10%) (Delucchi et al., 2012). Varios autores (Bertoia et al., 2006; Incognito et al., 2013, 2016; Bertoia y Aulicino, 2014) proponen evaluar la “aptitud forrajera” de poblaciones locales y utilizar las selectas como fuentes de alelos favorables en cruzamientos con líneas comerciales, para generar nuevos híbridos forrajeros. En este sentido, definiremos “aptitud forrajera” como la sumatoria de atributos de rendimiento y calidad forrajera que mejoran la producción animal por unidad de superficie en relación al forraje consumido (Bertoia et al., 2006).

Composición de la biomasa lignocelulósica del maíz.

El rastrojo de maíz, es el residuo que queda después de la cosecha del grano y se compone principalmente de celulosa (35-39,6 %), hemicelulosa (16,8-35 %) y lignina (7-18,4%) (Passoth y Sandgren, 2019). Resulta ser una fuente abundante y barata de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol de segunda generación. Lorenz et al., (2010) plantean la importancia de utilizar al rendimiento de biomasa aérea total del maíz como rasgo principal en algunos programas de mejoramiento, reemplazando en protagonismo al rendimiento en grano. Esto se debe a la creciente demanda de la utilización de la planta completa de maíz con fines de silaje, bioetanol, biogas, etc.



Ilustración 3. Esquema de la distribución de las distintas fracciones de fibra en el tejido vegetal.



La biomasa lignocelulósica de la planta de maíz presenta una estructura compleja compuesta de tres fracciones que deben ser procesadas por separado para asegurar su conversión eficiente a etanol: celulosa, hemicelulosa y lignina (Ilustración 3).

La celulosa está formada por largas cadenas de D-glucosa con un grado elevado de polimerización (Carpita, 1996). Debido al tipo de enlace β (1-4), la molécula tiene forma lineal (Ilustración 3). La formación de numerosos puentes de hidrógeno intra e intermoleculares hacen de la fibra de celulosa una estructura muy firme y poco sensible a la degradación, dificultando su hidrólisis. No obstante, una vez que se producen los azúcares simples, pueden fermentarse sin inconvenientes (Hatfield, 1993).

La hemicelulosa está formada principalmente por glucuronoarabinoxilano (GAX), un polímero de unidades de α -xilosa unidas por enlaces α -1,4 (Carpita, 1996) (Ilustración 3). Su naturaleza ramificada hace que la hemicelulosa sea amorfa y relativamente fácil de hidrolizar a sus azúcares constitutivos. Sin embargo, la xilosa es un azúcar difícil de fermentar a etanol (Hatfield, 1993).

La lignina es un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenante de unidades de fenilpropano ligadas por enlaces C-O-C y C-C, que se

alternan de manera desordenada (Ilustración 3). Los monómeros que la forman son los denominados alcoholes parahidroxicinamílicos (p-cumarílico, coniferílico y sinapílico) (Carpita, 1996). La lignina interacciona con los demás polisacáridos disminuyendo el valor nutricional del forraje y la aptitud de la biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol (Grabber, 2005), incrementando la resistencia de los tejidos a la acción de enzimas hidrolíticas (Jung y Casler, 2006). Definiremos “aptitud de la biomasa lignocelulósica” como la sumatoria de atributos de rendimiento y calidad que contribuyen a la producción de bioetanol lignocelulósico.

La concentración de lignina y su composición, está correlacionada negativamente con la degradabilidad de la pared celular, y su capacidad para producir bioetanol lignocelulósico (Zeng et al., 2014). Según Jung et al. (2000) existen distintos grados de respuesta a la lignificación, pudiéndose generar a través de variaciones en la estructura tridimensional y composición de la lignina. También pueden ocurrir cambios en su hidrofobicidad, grado de incrustación e intensidad de entrecruzamiento con los demás carbohidratos estructurales o modificando su accesibilidad a la acción de enzimas hidrolíticas. Por lo que no siempre menores contenidos de la misma implican incrementos en la digestibilidad (Jung et al., 2000).

La estructura compleja y variable de la lignina solo puede ser degradada por unos pocos microorganismos, incluyendo bacterias como *Streptomyces* sp. y hongos como *Nocardia* sp. y basidiomicetes (hongos de pudrición parda y de podredumbre blanca, respectivamente) (Thevenot et al., 2010). Sin embargo, hasta ahora no hay ninguna evidencia de la existencia de algún organismo capaz de usar la lignina como fuente de alimento para la vida (Zeng et al., 2014). Es por ello que un rastrojo ideal debe presentar una elevada concentración de celulosa y hemicelulosa, una alta digestibilidad y una baja concentración de lignina (Dien et al., 2006).



La biomasa lignocelulósica del rastrojo puede transformarse en etanol mediante procesos similares a los que son sometidos los forrajes en un rumen (Lorenz et al., 2009a). En este sentido, Lorenz et al. (2009b) encontraron en ensayos de SSF (Sacarificación y fermentación simultánea) que la variación en el rendimiento de etanol medido está determinada por la convertibilidad de los azúcares en bioetanol, más que por el contenido de carbohidratos estructurales. Esta convertibilidad estaría fuertemente correlacionada con los métodos de calidad del forraje, como la digestibilidad ruminal *in vitro* de la materia seca, la digestibilidad de la fibra (DFDN) y contenido de lignina. Las barreras que enfrentan estos organismos vivos para acceder a los carbohidratos de la pared celular son las mismas que ocurren en los procedimientos de la SSF (Dowe y Mcmillan, 2001) y más recientemente en SSCF (co-fermentación simultánea con la sacarificación) (Liu y Chen, 2016; Zhang y Bao, 2017; Qin et al., 2018). Todas las variables utilizadas comúnmente en investigación en nutrición de rumiantes, son de fácil determinación y calibración mediante NIRS (Grabber, 2005; Lorenz et al., 2009a)

Biocombustibles derivados de maíz.

Marco mundial de la producción de biocombustibles.

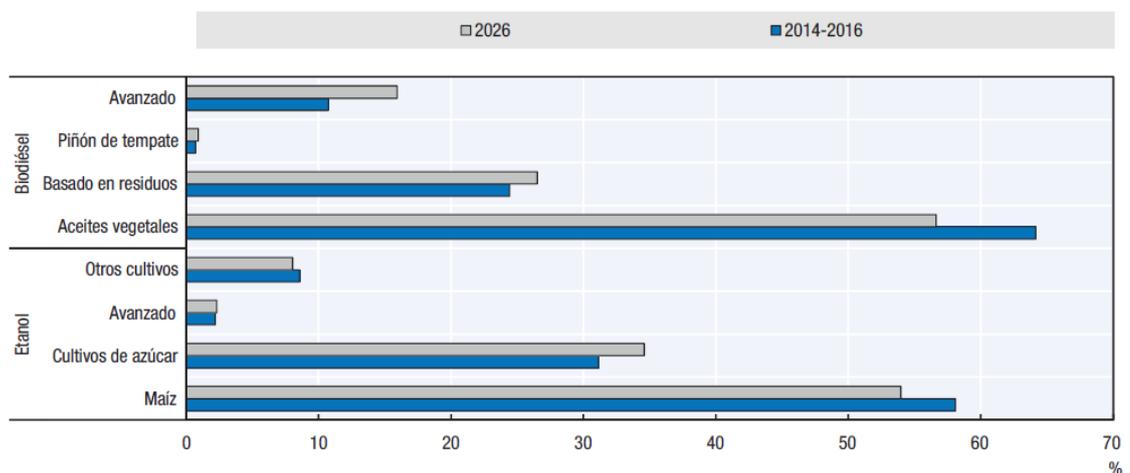
La producción de biocombustibles, bioetanol y biodiesel, constituyen las formas más prometedoras de energías renovables para las que Argentina presenta ventajas comparativas importantes. Al hablar de bioetanol, nos referimos al combustible de origen biológico, de carácter renovable que se obtiene a partir de la fermentación alcohólica de materias primas de origen biológico. Este bio-sustituto de las naftas puede utilizarse directamente como aditivo antidetonante en pequeñas proporciones (5 a 10 %), o transformado en el aditivo ETBE (etilterbutil éster) para reemplazar al MTBE (metilterbutil éster). El ETBE es utilizado numerosas experiencias en el mundo con



beneficiosos impactos ambientales. Además, puede emplearse como combustible directo (sin corte con hidrocarburos fósiles) en su forma no anhidra, en motores específicamente diseñados a tal efecto, o en cualquier proporción de corte con naftas de origen fósil (10 a 85 %) en motores con tecnología FFV (Flexible Fuel Vehicles).

La Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) prevé que la producción mundial de etanol aumentará 14 % durante el período 2017-2026, pasando de cerca de 120 Mml (mil millones de litros) en 2016 a alrededor de 137 Mml para 2026 (FAO, 2017). Los cereales secundarios y la caña de azúcar se mantendrán como la principal materia prima para la producción de etanol (Figura 2). En este escenario, la producción de etanol utilizará un 15% de la producción mundial de maíz y un 20 % de la de caña de azúcar (FAO, 2017). Se estima que el etanol de biomasa represente alrededor de 0,5 % de la producción mundial de etanol para 2026.

Figura 2. Porcentaje de materias primas utilizadas para la producción de biocombustibles a nivel mundial.



Fuente: OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026, Estadísticas de la OCDE sobre agricultura (FAO, 2017).

El cultivo de maíz es mundialmente utilizado para la producción de biocombustible. La mayor parte del etanol derivado de este cereal se obtiene mediante la fermentación de azúcares del almidón del grano, clasificando a estos biocombustibles como de “primera generación”. Este uso ha generado un gran dilema: “Alimento vs. Energía”, surgiendo así la necesidad de buscar fuentes locales de energía, basadas en la extracción de biocombustibles a partir de la biomasa lignocelulósica o etanol de “segunda generación”, que no comprometan la alimentación. Esta producción altamente renovable actualmente presenta dificultades relacionadas con los altos costos de producción y los complejos procesos para su obtención. Desde el año 2006 se están desarrollando a nivel mundial procesos más eficientes, capaces de lograr bajar los costos de conversión de los polisacáridos e incrementar la degradación de los azúcares resultantes (Dhugga, 2007). Bajo tales perspectivas, en EE.UU. se estudió el grado potencial de erosión del suelo provocado por la remoción del rastrojo de maíz, habiéndose demostrado que recolectar el 75 % del mismo no generaría problemas de erosión (Graham et al., 2007). Amos y Walters (2006) encontraron que la biomasa radicular del maíz al estado de madurez fisiológica es aproximadamente el 20% de la biomasa total de la planta. Sin embargo, según Wilts et al., (2004) esta biomasa por sí sola no es suficiente para mantener estable el contenido de materia orgánica del suelo. Johnson et al., (2004), proponen la enmienda de los suelos con el subproducto de la fermentación del rastrojo, como una alternativa para disminuir el riesgo de erosión.

la implementación de cultivos de servicio como el ray grass (*Lolium sp.*), avena (*Avena sativa*), vicia (*Vicia sp.*) o rotaciones con pasturas de especies perennes (Garibay et al., 1997) podría ayudar a disminuir los riesgos de erosión y a incrementar la fijación de carbono en estos sistemas. Bajo este marco, sería de sumo interés estudiar los niveles

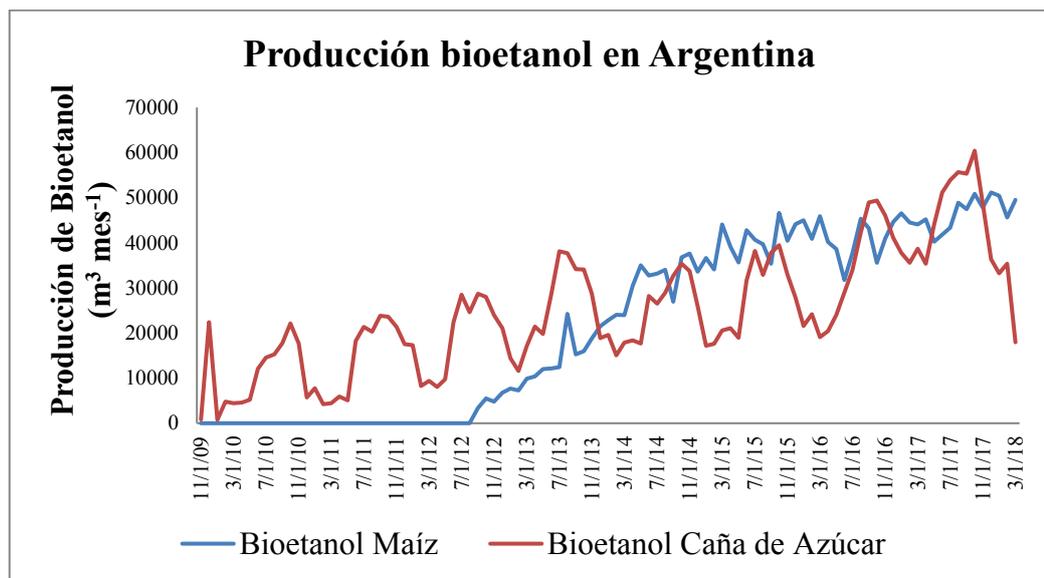


de extracción permitidos para las distintas realidades de nuestros suelos y cuáles serían las enmiendas y rotaciones más acordes, como especies perennes, para no degradar nuestro principal recurso.

Producción nacional de bioetanol de maíz.

La evolución de la Producción de Bioetanol en la Argentina ha llevado a que en la actualidad el 56% del bioetanol producido se obtenga a partir del grano de maíz y el 44% restante de la caña de azúcar (Modernización, 2019) (Figura 3). En el país la producción de etanol de segunda generación se encuentra actualmente en una etapa experimental. En la actualidad en el país se presenta condición de déficit en materia de infraestructura y el precio no resulta competitivo. Se espera que los progresos en el desarrollo tecnológico, y en la eficiencia de los mismos, permitan reducir el costo actual, pudiendo lograr la factibilidad de esta fuente alternativa.

Figura 3. Evolución de la producción de bioetanol del 2009 a 2018 en Argentina.



Referencias: Producción de bioetanol en Argentina derivada de caña de azúcar (línea roja) y de maíz (línea azul). Fuente: Ministerio de Modernización de la Republica Argentina (2019).



Existen diversos factores que están generando un incremento en la demanda de este producto, destacándose el aumento del precio del petróleo, la creciente demanda de combustible y energía y los intereses de protección ambiental, expresados en el Protocolo de Kioto (Patrouilleau et al., 2007). En este sentido, Argentina promulgó la ley N° 26.093 en el año 2006 para estimular la producción de biocombustibles. Se estableció que a partir del año 2010 todos los combustibles que se expendieran en el país (gasoil y naftas) deberían contener un corte mínimo del 5% de biocombustibles. Su implementación obligatoria se prorrogó a partir del 1° de enero del 2012. Este valor de corte se incrementó al 12% en el 2016, mediante el Decreto N° 543.

La producción de maíz de Argentina redondea 8,5 millones de ha, de las cuales 7 millones se destinan a cereales y el área restante se utiliza para las reservas de forraje (Minagri, 2020). Argentina destina únicamente el 4% de la cosecha de granos a su conversión en bioetanol. Si se logran superar las barreras para generar etanol de segunda generación, la Argentina tendría la capacidad de abastecer la creciente demanda de biocombustible con la producción a partir del rastrojo de maíz, sin comprometer el recurso alimenticio.

Proceso de producción de bioetanol lignocelulósico.

La producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica se basa en el pretratamiento e hidrólisis de la materia prima, para lo cual se presentan tres procesos: hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática y procesos termoquímicos. El pretratamiento tiene como finalidad desintegrar la matriz de carbohidratos de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada



para el posterior ataque enzimático. Adicionalmente, la mayor parte de la hemicelulosa se hidroliza durante el pretratamiento y liberando la lignina, o incluso puede descomponerse en algunos casos, produciendo compuestos perjudiciales para el proceso fermentativo subsiguiente. En una etapa posterior, la celulosa liberada es sometida a hidrólisis enzimática, obteniéndose una solución de azúcares fermentables que contiene principalmente glucosa, así como pentosas (xilosas) resultantes de la hidrólisis inicial de la hemicelulosa (Sun y Cheng, 2002). Un problema a resolver es disminuir los costos relacionados con la conversión de polisacáridos a azúcares simples.

Ilustración 4. Planta piloto de producción de bioetanol 100 kg/hora. INP Toulouse, Francia.



Referencias: 1. Extrusor de tornillo, 2. Transportador de extrusado, 3. Fermentador SSCF. Fuente: Hilbert J. 18/4/2020 “Biocombustibles de segunda generación”. Charla técnica CPIA (Consejo de Profesionales de Agro, Alimentos y Agroindustria) Proyecto Babet Real 5 <https://www.babet-real5.eu/>. Planta Piloto del Instituto Nacional Politécnico (INP) de Toulouse, Francia.

Una opción podría ser la disminución en el número de procesos como sucede en la SSF (Dowe y Mcmillan, 2001), donde los dos últimos pasos, hidrólisis enzimática y fermentación, pueden ser combinados en una sola operación. En la actualidad, proceso de fermentación y sacarificación en simultáneo (SSF) se destina la producción de

bioetanol a partir del almidón del grano de maíz, implicando primero un tratamiento con amilasa a elevada temperatura y luego el enfriamiento hasta los 30-37 °C y agregado de glucoamilasa y la inoculación de las levaduras (Ojeda et al., 2011). Por otro lado, en los procesos de segunda generación (Ilustración 4), se emplea el proceso de co-fermentación simultánea con la sacarificación (SSCF) de mayor eficiencias en el tratamiento de biomásas lignocelulósicas (Ojeda et al., 2011). En la SSCF, la hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada ocurre simultáneamente con la co-fermentación de hexosas (C6) derivada de la celulosa (principalmente glucosa) y pentosas (C5) derivadas de la hemicelulosa (principalmente xilosa y arabinosa) por *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificada (Qin et al., 2018). No obstante, aún queda mucho por trabajar en lograr mejorar la eficiencia de estos procesos de conversión. Según Yang y Wyman (2008), las cepas de levadura nativas de *Saccharomyces cerevisiae* solo son eficientes fermentando hexosas. Es por eso que algunos autores sugieren considerar únicamente a la fracción de celulosa en sus ecuaciones de estimación de producción de bioetanol (Cotton et al., 2013). Sin embargo, durante la última década se han llevado a cabo muchos estudios de ingeniería genética para introducir los genes de la ruta de la fermentación de azúcares C5 en el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* y otros microorganismos como *Escherichia coli* (Zhang et al., 2015; Liu y Chen, 2016; Zhang y Bao, 2017). Según Wang et al. (2019), combinando la levadura convencional y la mejorada genéticamente se podría evitar la represión de la absorción de glucosa y la relación glucosa/xilosa de la vía metabólica en la levadura C5/C6. Estos importantes avances en la microbiología, combinados con la tecnología de SSFC resultan de suma importancia para el futuro de la refinera de bioetanol lignocelulósico, ya que permite reducir el costo de inversión, ahorrar energía y lograr mayor productividad de etanol (Ojeda et al., 2011; Qin et al., 2018). Por lo tanto, las ecuaciones actuales de estimación de producción de bioetanol a



partir de materiales lignocelulósicos contemplan tanto la conversión de la celulosa como de la hemicelulosa (Zhao et al., 2009; Barros-Rios et al., 2016; Bonin et al., 2016; Liu y Chen, 2016; Zhang y Bao, 2017; Tang et al., 2018; Almeida et al., 2019).

Por otro lado, en la Universidad Estatal de Michigan mediante ingeniería genética han desarrollado el maíz “Espartano”, el cual produce sus propias celulasas dentro de la pared celular de hojas y tallos, las que convierten la celulosa y hemicelulosa en azúcares cuando se las somete a una temperatura de 70 °C (Sticklen, 2007, 2008).

El desarrollo de maquinaria que permita cosechar el grano y el rastrojo en un única operación (Shinners et al., 2007) es una tecnología que actualmente ya se encuentra en el mercado (Ilustración 5) que también permite disminuir los costos. Estos equipos de maquinaria especializada se han generado en países donde tienen más desarrollada la producción de bioetanol lignocelulósico, como es el caso de Estados Unidos.

Ilustración 5. Sistema simultanea de cosecha de granos y de biomasa lignocelulósica y rollo de biomasa de rastrojo de maíz.



Objetivos e hipótesis

Objetivo general

Evaluar e identificar germoplasma de maíz de distintos orígenes geográficos y grado de mejoramiento genético disponibles en la Argentina, buscando seleccionar genotipos destacados por su aptitud para la producción potencial de bioetanol lignocelulósico.

Objetivos específicos

- a) Estimar componentes fenotípicos, genéticos y ambientales en relación a la calidad nutricional y rendimiento de la fracción vegetativa en los dos estados de madurez de cosecha (silaje y grano).
- b) Correlacionar las variables de rendimiento y calidad en dos estados de madurez diferentes de la fenología del cultivo para estimar la producción potencial de silaje y de bioetanol lignocelulósico.
- c) Clasificar el germoplasma a través de variables de rendimiento y calidad nutricional de la fracción vegetativa para identificar grupos con diferenciales aptitudes para la producción potencial de etanol celulósico.
- d) Evaluar las variaciones cuali-cuantitativas que sufre la fracción vegetativa de maíz al pasar del estado de madurez de cosecha para silaje al de grano, y su aptitud para la producción potencial de bioetanol lignocelulósico.



Hipótesis

- I. Las principales variables que definen la calidad de la fibra de la fracción vegetativa de la planta de maíz están controladas por un importante efecto genético y un escaso efecto ambiental.

- II. Las poblaciones locales de mayor producción de rastrojo presentan mayor aptitud potencial para la producción de bioetanol de segunda generación debido a su mayor calidad del componente vegetativo.

- III. Los genotipos de maíz con elevada aptitud forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje, presentan elevados rendimientos potenciales para la producción de bioetanol lignocelulósico en el estado de cosecha de grano.



Materiales y Métodos en general de los experimentos

Descripción general de los experimentos

Para cumplir con los objetivos propuestos y poner a prueba las Hipótesis planteadas se llevaron a cabo una serie de mediciones sobre la base de un mismo ensayo repetido en 3 años consecutivos en la misma localidad.

La Hipótesis I se puso a prueba en el Capítulo II, donde se estimaron los componentes fenotípicos, genéticos y ambientales en relación a la calidad nutricional y su rendimiento de la fracción vegetativa en los dos estados de madurez.

La Hipótesis II se contrastó en los Capítulos III y IV. En el Capítulo III se correlacionaron las variables de rendimiento y de calidad de la biomasa vegetativa en los dos estados de la fenología del cultivo, para luego aplicar técnicas multivariadas de clasificación y así poder agrupar a los genotipos según su comportamiento. En el Capítulo IV se confeccionaron Índices de selección para agrupar genotipos con rasgos favorables para la producción de grano y bioetanol lignocelulósico.

La Hipótesis III se contrastó en el Capítulo V, donde se evaluaron las variaciones cuali-cuantitativas que sufre la fracción vegetativa de maíz al pasar del estado de madurez de cosecha para silaje a postcosecha de grano, y su aptitud para la producción potencial de bioetanol lignocelulósico.

Condiciones generales de los experimentos

Los experimentos se realizaron en el Campo experimental de la FCA-UNLZ ubicado en Virrey del Pino, (34°49'59,45''Sur; 58°43'17,98''Oeste) durante 3 años consecutivos, con las siguientes fechas de siembra: 10/12/2012, 30/10/2013 y 29/10/2014.



La siembra se realizó en forma manual, colocando dos semillas por golpe. Las parcelas experimentales consistieron en dos surcos de 5 m de largo, separados a 0,5 m entre sí. En el estadio de V₃ de la escala fenológica de Ritchie y Hanway (1982) (Ilustración 9, Tabla 22, Anexo), se realizó el raleo de plantas para obtener la densidad final de 8 plantas m⁻² y se fertilizó con 100 kg ha⁻¹ de fosfato diamónico. En V₆, se fertilizó con 100 kg ha⁻¹ de urea, con la finalidad de asegurar la suficiencia nutricional del cultivo.

El control preventivo de insectos de suelo se efectuó con carbofurán (3 l ha⁻¹) en formulación líquida, mediante aplicación directa al surco de siembra. Con el objetivo de prevenir la interferencia por malezas, se realizó un control químico mediante la aplicación de 4 l ha⁻¹ de atrazina, 2 l ha⁻¹ de acetoclor y 0,5 l ha⁻¹ de flumetsulam en preemergencia.

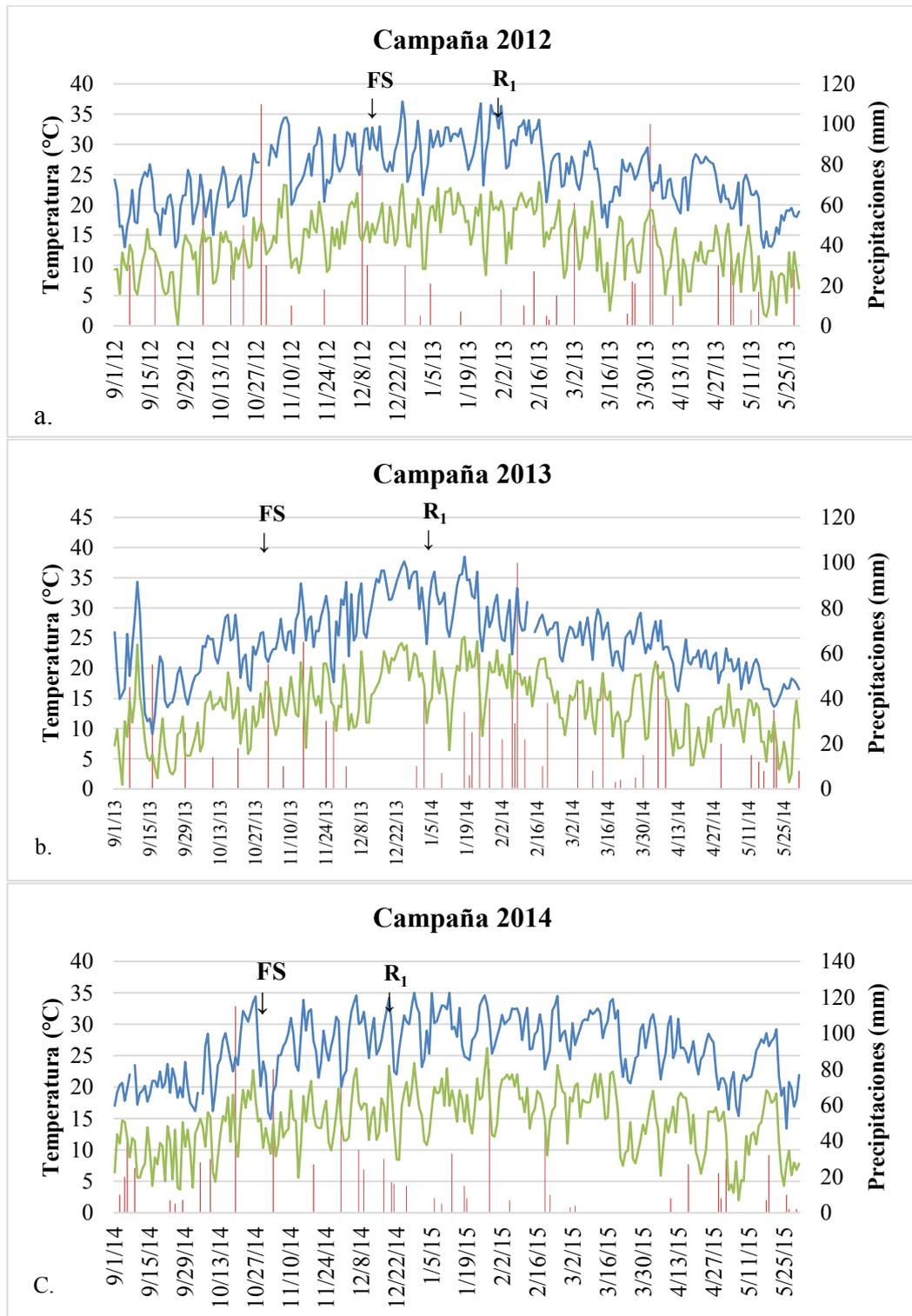
Caracterización ambiental

Condiciones meteorológicas

Para la caracterización meteorológica se utilizaron los datos de temperatura mínima y máxima del aire y precipitaciones en registrados en lapsos de 24 hrs. provistos por la estación meteorológica de INTA Castelar durante todo el ciclo de cultivo en todos los experimentos (Figura 4).



Figura 4. Condiciones meteorológicas del experimento durante las campañas 2012 (a), 2013 (b) y 2014 (c).



Referencias: Condiciones climáticas de Virrey del Pino para las campañas 2012 (a.), 2013 (b.) y 2014 (c.). Los valores corresponden a las temperaturas máximas (°C) y mínimas (°C) del aire. Las barras representan las precipitaciones diarias (mm). Referencias: FS (Fecha de siembra), floración del genotipo más precoz (R₁).



Los valores de temperaturas (medias, mínimas y máximas) y precipitaciones medias fueron calculados para el período siembra a cosecha de cada ensayo (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones meteorológicas de los experimentos.

Año	Temperatura del aire			Precipitaciones mm
	Media °C	Mínima °C	Máxima °C	
2012	23,5	7,9	37,1	531
2013	23,3	6,4	38,5	930
2014	22,3	5,6	35,0	567

Referencias: Año, Temperatura media, mínima y máxima del aire del período siembra-R₁ (°C) y precipitaciones durante el período siembra-cosecha (mm).

Condiciones edáficas

Los ensayos se realizaron sobre una loma caracterizada por un suelo Argiudol. El lote provenía de una pastura degradada de festuca (*Festuca arundinacea*). El muestreo de suelos se realizó el primer año de evaluación antes de comenzar los ensayos, en el mes de septiembre del 2012. Los 3 años de evaluación se realizaron sobre el mismo lote por lo cual no se repitió el análisis. Las muestras de suelo fueron tomadas con un barreno tubular a dos profundidades (0 a 20 cm y de 20 a 40 cm), según la determinación correspondiente. El método de muestreo fue en zig-zag, realizando 15 repiques en la superficie destinada al ensayo, con los que se conformó una muestra compuesta de aproximadamente 1 kg, que se remitió al Laboratorio de Suelos de la Asociación de Cooperativas Argentinas para su análisis. A continuación, se detallan los valores de los análisis de suelo realizados (Tabla 2).



Tabla 2. Valores de los principales indicadores de la calidad del suelo.

Variable	Unidad	Valor	Condición
M.O.	g/mg	5,14	Adecuado
N-NO3 (0 a 20 cm)	mg/kg	69,4	Adecuado
N-NO3 (20 a 40 cm)	mg/kg	14,70	Intermedio
P extraíble	mg/kg	42,30	Adecuado
S (0 a 20 cm)	mg/kg	14,30	Intermedio
pH		5,60	Deficiente
Ca	mg/kg	7,61	Adecuado
Mg	mg/kg	1,73	Intermedio
K	mg/kg	2,44	Deficiente

Referencias: M.O. (Materia orgánica), N-NO3 (Nitrógeno de Nitratos), P extraíble (Fósforo extraíble), S (Azufre), Ca (Calcio), Mg (Magnesio), K (Potasio).

Diseño Experimental

El germoplasma se evaluó en ensayos experimentales realizados durante 3 años consecutivos en la misma localidad. En razón del alto número de genotipos a evaluar y el escaso número de semillas, se adoptó un diseño aumentado de bloques incompletos (Federer, 1961; Federer et al., 2001). Los diseños aumentados son una herramienta importante cuando se evalúa numerosas entradas ya que permiten el control de la variabilidad local utilizando “n” testigos sistemáticamente espaciados y repetidos “r” veces, mientras que los genotipos se incluyen una sola vez en el experimento (Federer, 1961; Federer et al., 2001).



Genotipos evaluados

Se evaluó germoplasma de maíz con distintas estructuras genéticas:

- Tipo A. Poblaciones de polinización abierta y/o selección masal, grupo de genotipos con características comunes.
- Tipo B. Híbridos (Híbridos simples y tres vías) siendo el grupo de individuos más homogéneos y estables.
- Tipo C. Compuestos sintéticos, compuesta por grupos de genotipos en equilibrio.

Para una mejor interpretación de los resultados, se formaron grupos *a priori* no sólo en función de su estructura genética, sino también de sus rasgos como tipo de grano, ciclo, grado de mejora, destino de selección y origen.

Los grupos de genotipos se conformaron de la siguiente manera:

- **Grupo 1:** 100 poblaciones locales (Tipo A) provenientes de distintas regiones de la República Argentina, cedidos por el Banco de Germoplasma del INTA Pergamino (ID: 1 a 100) (Tabla 3).
- **Grupo 2:** 12 híbridos comerciales con un elevado nivel de mejora granífera (Tipo B) (ID: 101 a 112) (Tabla 4).
- **Grupo 3:** 24 híbridos experimentales sileros, genotipos pre-comerciales forrajeros con características intermedias entre un material granífero y un ideotipo silero (Tipo B) (ID: 113 a 115 y 131 a 144) (Tabla 5).
- **Grupo 4:** 5 híbridos precoces franceses (Tipo B) (ID: 116 a 120) (Tabla 6).
- **Grupo 5:** 10 compuestos sintéticos (Tipo C), con distintos destinos de selección (graníferos, sileros, tropicales y BMR) (ID: 121 a 130) (Tabla 7).



Tabla 3. Poblaciones locales de Argentina utilizadas en los experimentos (Grupo 1).

ID	Genotipo	Característica	Origen	Rango de Ciclo*
1	ARZM01008	CRISTALINO COLORADO	Buenos Aires	COMPLETO
2	ARZM01010	CRISTALINO COLORADO	Buenos Aires	COMPLETO
3	ARZM01046	CRISTALINO COLORADO	Buenos Aires	COMPLETO
4	ARZM01066	CRISTALINO COLORADO	Buenos Aires	COMPLETO
5	ARZM01081	CRISTALINO COLORADO	Buenos Aires	COMPLETO
6	ARZM01108	AMARILLO OCHO HILERAS	Buenos Aires	PRECOZ
7	ARZM01110	PISINGALLO	Buenos Aires	PRECOZ
8	ARZM01113	DULCE	Buenos Aires	PRECOZ
9	ARZM01114	DULCE	Buenos Aires	PRECOZ
10	ARZM01125	CALCHAQUI	Buenos Aires	PRECOZ
11	ARZM01129	BLANCO OCHO HILERAS	Buenos Aires	PRECOZ
12	ARZM02001	CRISTALINO COLORADO	Santa Fe	COMPLETO
13	ARZM02005	CRISTALINO COLORADO	Santa Fe	COMPLETO
14	ARZM02006	CRISTALINO COLORADO	Santa Fe	COMPLETO
15	ARZM02008	CRISTALINO COLORADO	Santa Fe	COMPLETO
16	ARZM02011	CRISTALINO COLORADO	Santa Fe	COMPLETO
17	ARZM02014	CRISTALINO COLORADO	Santa Fe	COMPLETO
18	ARZM02020	CRISTALINO AMARILLO	Santa Fe	COMPLETO
19	ARZM03002	CRISTALINO COLORADO	Entre Ríos	COMPLETO
20	ARZM03003	CAMELIA	Entre Ríos	COMPLETO
21	ARZM03015	DENTADO BLANCO	Entre Ríos	LARGO
22	ARZM03023	CAMELIA	Entre Ríos	COMPLETO
23	ARZM03026	CALCHAQUI	Entre Ríos	PRECOZ
24	ARZM03037	CAMELIA	Entre Ríos	COMPLETO
25	ARZM04004	AVATI MOROTI	Corrientes	COMPLETO
26	ARZM04005	PISINGALLO	Corrientes	PRECOZ
27	ARZM04011	NO CLASIFICABLE	Corrientes	COMPLETO
28	ARZM04018	CAMELIA	Corrientes	COMPLETO
29	ARZM04026	AVATI MOROTI MITA	Corrientes	COMPLETO
30	ARZM04027	COMPLEJO TROPICAL	Corrientes	LARGO
31	ARZM04070	AVATI PICHINGA	Corrientes	COMPLETO
32	ARZM04080	CANARIO FORMOSA	Corrientes	LARGO
33	ARZM05040	PERLITA	Misiones	PRECOZ
34	ARZM05070	AVATI MOROTI MITA	Misiones	COMPLETO
35	ARZM05100	AVATI MOROTI	Misiones	COMPLETO
36	ARZM06041	AVATI MOROTI	Chaco	COMPLETO
37	ARZM06051	CRISTALINO COLORADO	Chaco	COMPLETO
38	ARZM06060	PISINGALLO	Chaco	PRECOZ
39	ARZM06077	AVATI MOROTI	Chaco	COMPLETO
40	ARZM06083	CRISTALINO COLORADO	Chaco	COMPLETO
41	ARZM06086	PISINGALLO	Chaco	PRECOZ
42	ARZM06090	TUSON	Chaco	LARGO



43	ARZM06096	TUSON	Chaco	LARGO
44	ARZM06099	CANARIO FORMOSA	Chaco	LARGO
45	ARZM07002	DENTADO BLANCO	Formosa	LARGO
46	ARZM07004	AVATI MOROTI	Formosa	COMPLETO
47	ARZM07010	AVATI PICHINGA	Formosa	COMPLETO
48	ARZM07073	AVATI MOROTI	Formosa	COMPLETO
49	ARZM07104	AVATI MOROTI	Formosa	COMPLETO
50	ARZM07108	VENEZOLANO	Formosa	LARGO
51	ARZM07111	PERLITA	Formosa	PRECOZ
52	ARZM12125	PISINGALLO	Catamarca	PRECOZ
53	ARZM13048	COMPLEJO TROPICAL	La Rioja	LARGO
54	ARZM13120	PERLA	La Rioja	PRECOZ
55	ARZM13149	DENTADO BLANCO	La Rioja	LARGO
56	ARZM13164	PISINGALLO	La Rioja	PRECOZ
57	ARZM13166	DENTADO BLANCO	La Rioja	LARGO
58	ARZM14029	AMARILLO OCHO HILERAS	Córdoba	PRECOZ
59	ARZM14044	CRISTALINO COLORADO	Córdoba	COMPLETO
60	ARZM14045	DENTADO BLANCO	Córdoba	LARGO
61	ARZM14046	CALCHAQUI	Córdoba	PRECOZ
62	ARZM14048	NO CLASIFICABLE	Córdoba	COMPLETO
63	ARZM14049	CRISTALINO COLORADO	Córdoba	COMPLETO
64	ARZM14052	CALCHAQUI	Córdoba	PRECOZ
65	ARZM14057	CRISTALINO COLORADO	Córdoba	COMPLETO
66	ARZM14063	CRISTALINO COLORADO Y DENTADO	Córdoba	COMPLETO
67	ARZM14064	CRISTALINO COLORADO	Córdoba	COMPLETO
68	ARZM14070	PISINGALLO	Córdoba	PRECOZ
69	ARZM14079	CRISTALINO COLORADO	Córdoba	COMPLETO
70	ARZM15002	DENTADO BLANCO CON AMARILLO	San Juan	LARGO
71	ARZM15005	CRISTALINO COLORADO Y BLANCO	San Juan	COMPLETO
72	ARZM15006	DENTADO BLANCO CON AMARILLO	San Juan	LARGO
73	ARZM15007	PERLITA	San Juan	PRECOZ
74	ARZM15008	DENTADO BLANCO	San Juan	LARGO
75	ARZM16015	CRISTALINO AMARILLO	Mendoza	COMPLETO
76	ARZM16016	CRISTALINO COLORADO	Mendoza	COMPLETO
77	ARZM16050	CRISTALINO COLORADO	Mendoza	COMPLETO
78	ARZM16057	DENTADO BLANCO	Mendoza	LARGO
79	ARZM16069	CRISTALINO COLORADO	Mendoza	COMPLETO
80	ARZM17008	CRISTALINO COLORADO	San Luis	COMPLETO
81	ARZM17013	CRISTALINO COLORADO	San Luis	COMPLETO
82	ARZM17021	PISINGALLO	San Luis	PRECOZ
83	ARZM17029	CRISTALINO COLORADO	San Luis	COMPLETO
84	ARZM17035	CRISTALINO COLORADO	San Luis	COMPLETO
85	ARZM17050	CALCHAQUI	San Luis	PRECOZ
86	ARZM17051	AMARILLO OCHO HILERAS	San Luis	PRECOZ



87	ARZM17057	PISINGALLO	San Luis	PRECOZ
88	ARZM18001	CRISTALINO COLORADO	La Pampa	COMPLETO
89	ARZM18003	CRISTALINO COLORADO	La Pampa	COMPLETO
90	ARZM18009	CRISTALINO COLORADO	La Pampa	COMPLETO
91	ARZM18018	AMARILLO 8 HILERAS	La Pampa	PRECOZ
92	ARZM18021	AMARILLO 8 HILERAS	La Pampa	PRECOZ
93	ARZM18022	NO CLASIFICABLE CRISTALINO AMARILLO ANARANJADO	La Pampa	COMPLETO
94	ARZM18023	ANARANJADO	La Pampa	COMPLETO
95	ARZM18029	BLANCO 8 HILERAS	La Pampa	PRECOZ
96	ARZM18030	BLANCO 8 HILERAS	La Pampa	PRECOZ
97	ARZM18034	CRISTALINO COLORADO	La Pampa	COMPLETO
98	ARZM18042	CRISTALINO COLORADO	La Pampa	COMPLETO
99	ARZM18044	CRISTALINO COLORADO	La Pampa	COMPLETO
100	ARZM18050	BLANCO 8 HILERAS	La Pampa	PRECOZ

Referencia: Las poblaciones nativas evaluadas figuran dentro del Catálogo de germoplasma de maíz – Argentina (INTA, 1997). Rango de Ciclo* fue informado en comunicación personal por Marcelo Ferrer, Curador del banco de germoplasma activo de la Estación Experimental Agropecuaria Pergamino de INTA.

Tabla 4. Híbridos comerciales de Argentina utilizados en el experimento (Grupo 2).

ID	Genotipo	Empresa	Año de Inscripción	Condición genética
101	HC 417 MGRR2	ACA	2008	Híbrido simple
102	2752 MGRR2	DON MARIO	2011	Híbrido simple
103	DK 747 VT3P	MONSANTO	2010	Híbrido simple
104	ARV 2155 HX	ARVALES	2012	Híbrido simple
105	KM 4020 G	KWS	2013	Híbrido simple
106	BG 6502 HR	PIONEER	2012	Híbrido simple
107	PAN 5E-203	PANNAR	2011	Híbrido simple
108	NK 907 TD/TG	SYNGENTA	2010	Híbrido simple
109	SY 900 VIPTERA	SYNGENTA	2012	Híbrido simple
110	SRM553 MG	SURSEM	2010	Híbrido simple
111	AX887 MG	NIDERA	2010	Híbrido simple
112	M369	DOW	1991	Híbrido de tres líneas



Tabla 5. Híbridos experimentales sileros utilizados en el experimento (Grupo 3).

ID	Genotipo	Empresa	Origen	Característica
113	Pannar - A	PANNAR	Sudáfrica	Silero
114	Pannar - B	PANNAR	Sudáfrica	Silero
115	Pannar - C	PANNAR	Sudáfrica	Silero
131	HES1	DOW	Argentina	Silero
132	HES2	DOW	Argentina	Silero
133	HES3	DOW	Argentina	Silero
134	HES4	DOW	Argentina	Silero
135	HES5	DOW	Argentina	Silero
136	HES6	DOW	Argentina	Silero
137	HES7	DOW	Argentina	Silero
138	HES8	DOW	Argentina	Silero
139	HES9	DOW	Argentina	BMR
140	HES10	DOW	Argentina	Silero
141	HES11	DOW	Argentina	Silero
142	HES12	DOW	Argentina	Silero
143	HES13	DOW	Argentina	Silero
144	HES14	DOW	Argentina	Silero

Tabla 6. Híbridos precoces franceses utilizados en el experimento (Grupo 4).

ID	Genotipo	Empresa	Característica
116	Lindsey	ZADEN-LIMAGRAIN	PRECOZ
117	Adevey	ZADEN-LIMAGRAIN	PRECOZ
118	Sherley	LIMAGRAIN	PRECOZ
119	LG3264	LIMAGRAIN	PRECOZ
120	LG30275	LIMAGRAIN	PRECOZ

Tabla 7. Compuestos sintéticos utilizados en el experimento (Grupo 5).

ID	Genotipo	Empresa	Característica
121	CS Silaje 4	DOW	Forrajero
122	CS Grano	DOW	Granífero
123	CS Silaje 2	DOW	Forrajero
124	CS Silaje 1	DOW	Forrajero
125	CS BMR	DOW	BMR
126	CS Silaje 3	DOW	Forrajero
127	CS Tropical 2	DOW	Tropical
128	CS Tropical 1	DOW	Tropical
129	CS Tropical 4	DOW	Tropical
130	CS Tropical 3	DOW	Tropical



Tabla 8. Testigos utilizados en los experimentos.

ID	Genotipo	Empresa	Año de inscripción	Destino	Grano	Otro
145	DK72-10VT3P	Dekalb	2012	Granífero	Semidentado	
146	BMR126HX	DOW	2011	Forrajero	Semidentado	BMR
147	DK390VT3P	Dekalb	2011	Granífero	Semidentado	

Los testigos utilizados fueron seleccionados por su mejor desempeño agronómico rendimiento y calidad forrajera en los ensayos realizados por la cátedra de Cerealicultura de la FCA-UNLZ (Datos no publicados). El híbrido simple DK72-10VT3P (Dekalb) es un genotipo de gran potencial de rendimiento en grano y buena adaptabilidad con una madurez relativa de 122 días. El genotipo BMR126HX (DOW) es un híbrido simple de maíz que presenta el rasgo BMR destinado a silaje con una madurez relativa de 115 días. DK390VT3P (Dekalb) es un híbrido simple tropical con una elevada producción de grano y biomasa vegetativa de 150 días de madurez relativa (Tabla 8). Los valores de madurez relativa fueron extraídos de los catálogos comerciales de las empresas semilleras.

La madurez relativa es un parámetro tomado por las distintas empresas semilleras para indicar diferencias relativas de ciclo entre distintos híbridos. No es un valor absoluto, ya que el ciclo se modifica según su fecha de siembra, año, etc. pero mantienen el ordenamiento general. Algunas empresas, establecen como criterio general, que por cada 2 unidades de diferencia de MR de un híbrido a otro, habrá 1 punto de diferencia en su humedad a cosecha.



Ilustración 6. Imagen del experimento durante la campaña 2013 (Virrey del Pino, 1/3/2013).



Mediciones y estados de madurez evaluados

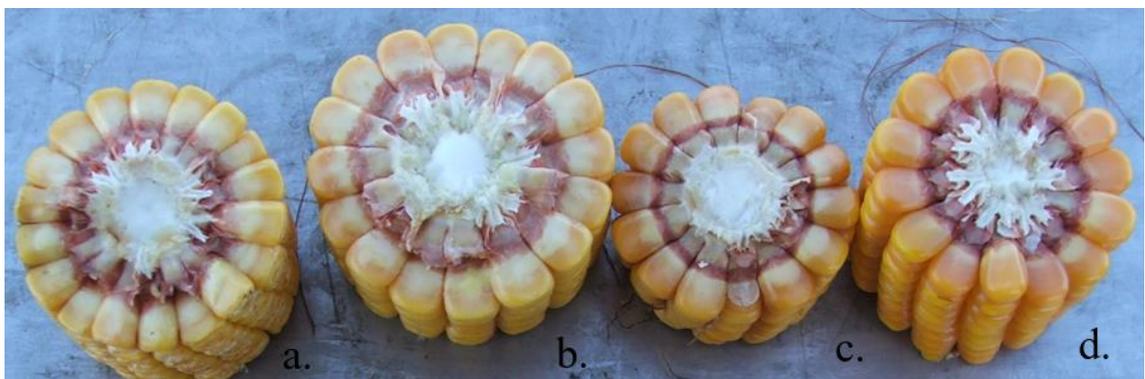
Para evaluar la aptitud forrajera de los genotipos se estudiarán las variables de calidad y cantidad de la biomasa y la morfología de planta, medidos en dos estados de madurez del cultivo: coincidiendo con una madurez adecuada para silaje (Estado de madurez para silaje, M1) y con la cosecha de grano y rastrojo (Estado de madurez para cosecha para Rastrojo, M2).

Estado de madurez de cosecha para silaje (M1)

La cosecha se realizó cuando el 50% de las plantas de cada genotipo alcanzó aproximadamente un 30-40% de materia seca de planta completa (MSpc), estado donde se conjuga el máximo rendimiento con la máxima calidad nutricional (Wiersma et al., 1993) y la mejor conservación del forraje (Cone et al., 2008). Este estado de madurez de cosecha para silaje se determinó mediante apreciación visual de cada parcela dependiendo

de la proporción de espiga y secado general de la planta. Para confirmar el estado de madurez, se realizó un muestreo de espigas al azar, buscando que la “línea de leche” se encuentre en un rango entre $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$ de madurez del grano dentro del estado fenológico de R₅ (Ritchie y Hanway, 1982) (Ilustración 7). Se cosechó la mitad frontal de la parcela experimental, separando las espigas de la planta y pesando las distintas fracciones por separado. Para la determinación de contenido de azúcares en °B se tomó una muestra de jugo mediante compresión física de la sección de la caña que porta la espiga de dos plantas al azar de la parcela. La determinación del contenido de azúcares se realizó colocando la muestra de jugo en un refractómetro (Atago Pocket PAL-1), limpiando el equipo entre muestras con agua destilada. Posteriormente, se tomaron otras dos plantas al azar y se muestrearon por separado 200 g de caña+hojas del fitómero que porta la espiga y 300 gr del tercio medio de la espiga. Las muestras se secaron en estufa a 60 °C hasta peso contante y se calculó el porcentaje de materia seca. Las muestras secas se molieron con un molino de cuchillas hasta un tamaño de partícula de 1 mm para proseguir con los análisis de laboratorio.

Ilustración 7. Avance de la línea de leche: Estado de madurez del grano de maíz dentro de R₅.



Referencias: a. $\frac{1}{4}$ línea de leche, b. $\frac{1}{2}$ línea de leche, c. $\frac{3}{4}$ línea de leche, d. fin de R₅.

Variables evaluadas en el estado de madurez para silaje (M1)

Se midieron las siguientes variables consideradas de importancia en la evaluación de germoplasma destinado a la producción de silaje:

1. Rendimiento en Materia Seca de Caña+Hojas ($t\ ha^{-1}$), RMSch.
2. Rendimiento en Materia Seca de Espiga ($t\ ha^{-1}$), RMSe.
3. Contenido de Materia Seca de Caña+Hojas (%), MSch.
4. Contenido de Materia Seca de Espiga (%), MSe.
5. Fibra Detergente Neutro de Caña+Hojas (%), FDNch.
6. Fibra Detergente Ácido de Caña+Hojas (%), FDAch.
7. Lignina Detergente Ácido de Caña+Hojas (%), LDAch.
8. Digestibilidad in vitro de la Materia Seca de Caña+Hojas (%), DIVch.
9. Digestibilidad de la Fibra de Caña+Hojas (%), DFDNch.
10. Contenido de Azúcares en la caña (BRIX, °B) *.
11. Rendimiento en Materia Seca Digestible de Planta Completa ($t\ ha^{-1}$), RMSDpc.
12. Ciclo de siembra a floración (R_1), (Ciclo, °C día⁻¹), expresado como la sumatoria térmica ($\sum °C\ día^{-1}$) desde siembra hasta aparición de las barbas en el 50 % de las plantas que integren la parcela (R_1) (Ritchie y Hanway, 1982) (Ilustración 9, Tabla 22, Anexo). Utilizando como temperatura base 10°C.

*BRIX: variable evaluada en M1 como predictora de la calidad del rastrojo para su futura conversión en bioetanol.

Estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo) (M2).

La cosecha se efectuó después que el contenido de humedad del grano de cada entrada fue inferior al 20%. Este estado de madurez de cosecha se determinó mediante apreciación visual de cada parcela dependiendo secado de la espiga. Para confirmar el



estado de madurez, se realizó muestreo de espigas al azar y se midió la humedad de una muestra de grano de aproximadamente 200 gr con un humidímetro (Tesma modelo campo). Este estado de madurez ocurrió después del estado fenológico de R₆ del cultivo (Ritchie y Hanway, 1982) (Ilustración 9, Tabla 22, Anexo). Se pesaron 10 plantas en competencia perfecta y luego se las despojaron de sus espigas. Posteriormente se tomó una muestra de 200 g por entrada de la fracción de rastrojo correspondiente al fitómero que portaba la espiga. Las muestras fueron acondicionadas de la misma manera que en M1. Las espigas se desgranaron, pesaron y se midió el contenido de humedad de grano con un humidímetro (Tesma modelo campo) para obtener los valores de rendimiento en grano (RG, t ha⁻¹) corrigiendo a un valor de humedad de 14,5%.

Variables evaluadas en el estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo) (M2).

Se midieron las siguientes variables consideradas de importancia en la evaluación de germoplasma destinado a la producción de grano y de etanol lignocelulósico:

1. Altura de la Planta. (m), ALTp.
2. Rendimiento en grano (t ha⁻¹), RG. (Corregido a 14,5 % de humedad).
3. Rendimiento en Materia Seca del Rastrojo (t ha⁻¹), RMSr.
4. Contenido de Materia Seca del Rastrojo (%), MSr.
5. Fibra Detergente Neutro del Rastrojo (%), FDNr.
6. Fibra Detergente Ácido del Rastrojo (%), FDAr.
7. Lignina Detergente Ácido del Rastrojo (%), LDAr
8. Digestibilidad in Vitro de la Materia Seca del Rastrojo (%), DIVr.
9. Digestibilidad de la Fibra del Rastrojo (%), DFDNr.
10. Rendimiento en Etanol Teórico Potencial (mil l/ha), RETP.
11. Vuelco de plantas a cosecha de grano (%), V.



12. Quebrado de plantas a cosecha de grano (%), Q.

Análisis de laboratorio mediante química húmeda.

Los análisis del laboratorio húmedo se basaron en las metodologías propuestas por la A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists, 1990), los protocolos detallados se encuentran en el sitio web oficial de ANKOM Technology (<https://www.ankom.com/analytical-methods-support/fiber-analyzer-a2000>).

Las fracciones analíticas de la fibra FDN y FDA fueron determinadas según los métodos descritos por Goering and Van Soest (1970) de manera secuencial. La lignina fue determinada en ácido sulfúrico como LDA mediante el método de Van Soest et al. (1991). La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIV) de la fracción Caña+Hojas se determinó mediante el método enzimático descrito por Gabrielsen (1986). Todas las fracciones de química húmeda, FDN, FDA, LDA y DIV, se estimaron utilizando bolsas de P.E.T. (Tereftalato de polietileno) en el analizador de fibra ANKOM 220 (ANKOM Technology, Macedon, NY, EE.UU.).

Para la determinación de FDN que contiene las fracciones de Celulosa + Hemicelulosa + Lignina, se pesaron $0,500 \pm 0,005$ g del material en las bolsas de P.E.T. previamente taradas en balanza analítica. Una vez alcanzada la muestra de 0,500 g, se sellaron con calor y colocaron en las bandejas del analizador de fibra. Las bolsas se sometieron a una solución de detergente neutro (lauril sulfato + etilen diamino tetra acetato di sódico (EDTA sal) + sodio borato decahidro (Borax) + sodio fosfato di básico + trietilglicol + agua destilada) por 60 minutos a 100°C en agitación dentro del analizador de fibra ANKON 220. Una vez finalizado el proceso, se descarga del detergente neutro por la manguera de drenaje del equipo y se procedió a retirar las bolsas, las cuales inmediatamente se presionaron en un colador para retirar restos de detergente contenido



en el interior de las mismas. Luego, las bolsas se sumergieron en acetona durante 3 minutos para favorecer el secado y se extrajo la acetona utilizando la misma prensa/colador. Se dejaron secar al aire y una vez secas, se llevaron para culminar el secado a estufa de aire forzado a 65°C durante 48 hs aproximadamente hasta alcanzar peso constante (AOAC, 1990).

El cálculo de FDN se realizó por diferencia de pesadas según la siguiente ecuación:

$$FDN (\%) = \left(\frac{\text{Peso final} - \text{Peso de la bolsa}}{\text{Peso de la muestra}} \right) * 100$$

Para la variable FDA, que comprende las fracciones Celulosa + Lignina, las muestras provenientes de FDN, una vez pesadas en seco, se sometieron a una solución de detergente ácido (H₂SO₄ + cetrimida + agua destilada) durante 60 minutos a 100°C en agitación, en el mismo analizador ANKOM 220. Se procede de igual modo que para el análisis anterior.

El cálculo de FDA se realizó por diferencia de pesadas según la siguiente ecuación:

$$FDA (\%) = \left(\frac{\text{Peso final} - \text{Peso de la bolsa}}{\text{Peso de la muestra}} \right) * 100$$

La LDA (Lignina), se obtuvo tratando el residuo insoluble ácido de las muestras de FDA con ácido sulfúrico al 72% durante 3 horas, en un cristizador o recipiente de vidrio profundo de modo de embeber completamente las muestras y revolviendo a intervalos regulares de tiempo, preferentemente cada 30 minutos. Luego, se retiraron las muestras y presionaron utilizando la prensa o colador para eliminar el ácido dentro de las bolsas. Se lavaron con agua destilada para remover los restos del ácido y se sumergieron durante 3 minutos en acetona. Se extrajo la acetona y se secaron hasta peso constante



como en los análisis anteriores. El residuo de la extracción es la lignina. El cálculo de LDA se realizó por diferencia de pesadas según la siguiente ecuación:

$$LDA (\%) = \left(\frac{\text{Peso final} - \text{Peso de la bolsa FDA}}{\text{Peso de la muestra FDA}} \right) * 100$$

Dado que se utilizó la metodología secuencial para el análisis de las fracciones analíticas de la fibra (la misma muestra de FDN luego fue utilizada para determinar FDA y luego LDA), se estimaron los contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina por diferencia entre los porcentajes de las fracciones. El contenido de celulosa (Cel, %) fue determinado como el porcentaje de tejido remanente al realizar la diferencia entre (FDA-LDA), mientras que la hemicelulosa (Hem, %) resultó de realizar la diferencia entre (FDN-FDA) (Goering y Van Soest, 1970). Estas variables fueron necesarias para poder calcular rendimiento en etanol teórico potencial del rastrojo (RETP, mil l/ha) mediante siguiente ecuación utilizada por Zhao et al. (2009):

$$RETP \left(\frac{\text{mil l}}{\text{ha}} \right) = (Cel + Hem) * RMSr * 1,11 * 0,85 * 0,51 * 0,85 * (1000/0,79)$$

Donde: Cel = Contenido de celulosa (%).

Hem = Contenido de hemicelulosa (%).

RMSr = Rendimiento en materia seca de rastrojo (t ha⁻¹).

1,11 = Factor de conversión de celulosa y hemicelulosa en azúcar.

0,85 = Eficiencia del pasaje de celulosa y hemicelulosa a azúcar.

0,51 = Factor de conversión de azúcar en etanol.

0,85 = Eficiencia del pasaje de azúcar en etanol.

1000/0,79 = Peso específico del etanol (g ml⁻¹).

La Digestibilidad *in vitro* (DIV) se calculó mediante el método de digestión enzimático de doble etapa utilizando un digestor Daisy II (ANKOM). Para ello, se pesaron muestras de 0,250 ± 0,005 g en bolsas secas de P.E.T., previamente taradas en



balanza analítica y se sellaron con calor. Se colocaron en frascos de capacidad para 100 bolsas con tapa con válvula para el escape de gases conteniendo una solución de HCl (0,1 Normal) + Pepsina + agua destilada en rotación constante a 39°C dentro de una cámara aislada durante 24 horas. Luego de enjuagar las muestras en agua destilada, las mismas fueron sometidas a una solución de acetato de sodio + agua destilada y otra de ácido acético glacial + agua destilada durante 48 horas en rotación constante a 39°C. Por último, se enjuagaron en agua destilada y se secaron en estufa hasta peso constante. El cálculo de DIV (%) se realizó por diferencia de pesadas según la siguiente ecuación:

$$DIV (\%) = \left(1 - \left(\frac{\text{Peso final} - \text{Peso de la bolsa}}{\text{Peso de la muestra}} \right) \right) * 100$$

Para la determinación de la digestibilidad de la fibra (DFDN), se combinaron las técnicas de DIV y de FDN, realizándolas de manera secuencial sobre la misma muestra. Las muestras de la fracción vegetativa en cada cosecha se incubaron con solución enzimática conjuntamente con la solución buffer en la incubadora Daisy II ANKOM. Posteriormente, se determinó el contenido de FDN del residuo en un analizador de fibra ANKOM 220. Los valores DIV y FDN se utilizaron para calcular DFDN según el método de Goering y Van Soest (1970). Dicho valor representa la proporción digerida de FDN durante la incubación 48 hs en la solución enzimática.

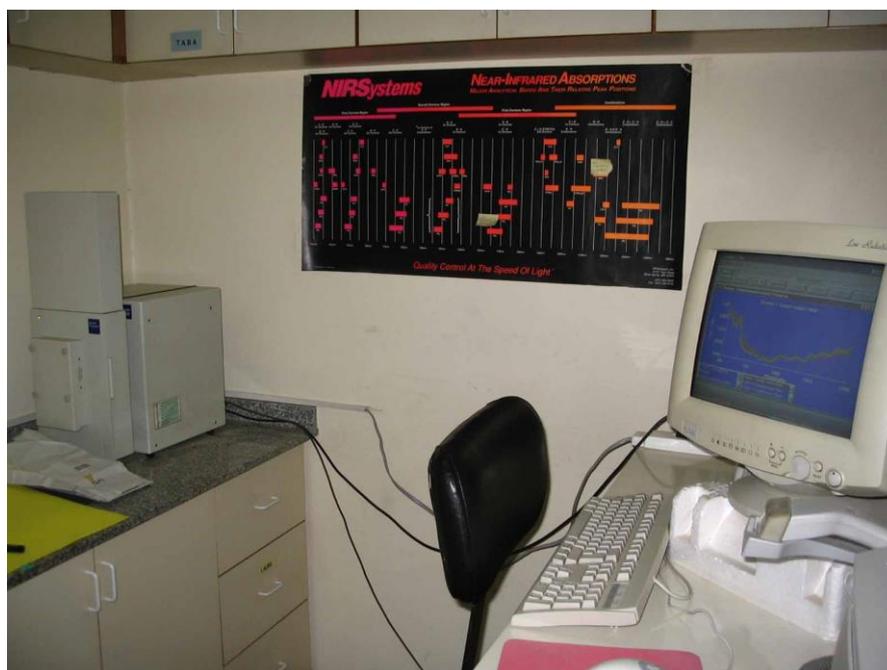
Generación de curvas de calibración de NIRS

Se generaron curvas de calibración sobre la base de los métodos descriptos para el laboratorio húmedo mediante espectroscopía cercana al infrarrojo, utilizando un analizador NIRS Foss System 6500 (Foss NIRS Systems Inc., Silver Spring, MD, USA) (Ilustración 8). Para ello se leyeron las muestras colectadas a campo, previamente secadas a 60°C y molidas a 1 mm. Se empleó el método de refractancia para realizar las lecturas



con el analizador NIRS. Este método se basa en la incidencia de un haz de luz sobre una muestra, donde una parte de los fotones es transmitida a través de la misma, siendo el resto absorbido, provocando la vibración de los enlaces C-H, O-H y N-H que son los componentes principales de la estructura básica de las sustancias orgánicas. El espectro obtenido en la región del infrarrojo cercano (longitudes de onda entre 800 y 2500 nm) es la combinación de bandas de absorciones parciales superpuestas o muy cercanas, que resultan en una línea suavizada, con pico y valles.

Ilustración 8. Equipo analizador NIRS 6500 Foss en funcionamiento.



Se leyeron con el equipo NIRS alrededor de 1300 muestras de caña+hojas de plantas de maíz con distintos estados de madurez del cultivo. Luego, se utilizaron técnicas multivariadas de Análisis de Componentes Principales (ACP) para seleccionar muestras correspondientes a los espectros que difirieron significativamente del resto. Primero se eliminaron los valores fuera de rango (*outlier*) y se recalculó el ACP. De esa población

de muestras, se seleccionaron 158 debido a la heterogeneidad en la composición de las mismas, y se analizaron mediante los métodos de laboratorio húmedo previamente descriptos para determinar los datos nominales. Luego, se seleccionaron los espectros representativos de grupos similares y se evaluó la estructura poblacional. Con ello se conformó la curva de calibración del equipo analizador NIRS, que es un algoritmo que relaciona la información espectral (óptica) con la información de la composición química (método de referencia) a través de la aplicación de modelos estadísticos (Shenk, J. S. y Westerhaus, 1995; Shenk, J.S. and Westerhaus, 1996). Para la validación de la curva se seleccionaron 20 muestras y se analizó la relación entre el desvío estándar del análisis químico (SD) y el error estándar de la validación cruzada (SECV). El método para la selección de ecuaciones de calibración fue desarrollado en Handbook of Agricultura (Agricultural Research Service, USA, Washington, DC).



CAPÍTULO II

Evaluación de los efectos genéticos y ambientales sobre las variables de rendimiento y calidad en dos estados de madurez de cosecha (silaje y grano) en genotipos de maíz.



Objetivo

a. Estimar componentes fenotípicos, genéticos y ambientales en relación a la calidad nutricional y rendimiento de la fracción vegetativa en los dos estados de madurez de cosecha (silaje y grano).

Metodología de Análisis de los datos

Análisis de las Varianzas mediante el modelo de medias ajustadas en bloques incompletos.

Los análisis de varianza (ANVA) de todas las variables se realizaron utilizando los Valores Ajustados (VAj). Los VAj se calcularon por la diferencia entre el Valor Observado y el Factor de Corrección (FC) de cada bloque incompleto. El FC se estimó para cada bloque con los datos de los testigos aplicando la siguiente ecuación:

$$FC = \left(\frac{l}{g}\right) \left(\sum_{i,j} Y_{ij} - \sum_{i,j} \frac{Y_{ij}}{r} \right)$$

Donde g es el número de testigos y “ r ” el número de bloques. $Y_{ij}' = Y_{ij} - FC$ donde; Y_{ij}' es el valor ajustado de la variable evaluada para el j -ésimo bloque del i -ésimo genotipo, Y_{ij} es el valor observado de la variable evaluada y FC es el factor de corrección calculado para cada bloque, con el cual se corrigen todos los genotipos de su respectivo bloque (Federer, 1961; Cotes y Núñez, 2001). Los grados de libertad del error para el ANVA de los testigos debe ser mayor de 10, por lo cual, debe cumplirse la siguiente relación: $r > [10/(c-1) + 1]$, siendo “ c ” el número de testigos (Cotes y Núñez, 2001). Para el análisis de varianza se utilizó el programa SAS® macro, *augment.sas* (IASRI, 2013).



La Diferencia Mínima Significativa (DMS) ajustada se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$DMS = t\left(\frac{\alpha}{2}, gle\right) \sqrt{\left((r-1) * (g-1) * \frac{CMe}{(r * g)}\right)}$$

Donde “*t*” es el valor de Student, “*gle*” son los grados de libertad del error de los testigos, “ α ” es el nivel de significancia, “*r*” número de repeticiones de los testigos, “*g*” número de genotipos y CMe es el cuadrado medio del error para el ANVA.

Se aplicó el Test de No Aditividad de Tukey con el propósito de evaluar la existencia de interacción Genotipo \times Ambiente (G \times E). Este método fue calculado luego de aplicar un diseño en bloques completos aleatorizados, considerando los años (ambientes) como bloques. En este caso la suma de cuadrados total se particionó en suma de cuadrados para no aditividad (con 1 grado de libertad) y en suma de cuadrados residual (Steel y Torrie, 1960). Si la F de la no aditividad es significativa, indica presencia de efectos multiplicativos.

Para analizar la asociación entre temperatura media del aire en el período Siembra-R1 ($^{\circ}$ C) y las variables de calidad de la fracción vegetativa, se realizó un análisis de Correlación de Pearson entre las mismas en ambos estados de madurez de cosecha (M1 y M2). Se utilizó el programa estadístico InfoStat versión 2011 (Di Rienzo et al., 2011).

Análisis de parámetros genéticos de las variables de rendimiento y calidad en ambos estados de madurez de cosecha.

Se obtuvieron las varianzas: fenotípica (VF), genética (VG) y ambiental (VE) como: Varianza Fenotípica (VF = CMg + CMe), Genotípica (VG = CMg) y Ambiental (VE = CMe); siendo CM: Cuadrado Medio, g: Genotipos y e: Error Experimental. A



partir de éstas se calcularon: la heredabilidad en sentido amplio ($H^2 (\%) = \frac{VG}{VF}$), el coeficiente de variación genética en porcentaje ($CVg\% = \frac{100\sqrt{VG}}{M}$), y el coeficiente de variación ambiental en porcentaje se calculó como ($CVe\% = \frac{100\sqrt{VE}}{M}$) y la Razón CVg/CVe ; siendo M la media de los genotipos (sin los testigos). Remarcamos que en el modelo aumentado la varianza experimental (Cuadrado Medio del Error) obtenida del ANVA fue estimada únicamente utilizando los testigos (Cruz, 2006). Para el análisis genético se utilizó el programa GENES versión Windows (2004.2.1), desarrollado por Cruz (2006).



Resultados y Discusión

Estado de madurez de cosecha para silaje (M1).

Análisis de las variables de rendimiento y calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje.

Tabla 9. Análisis de varianza de las variables de rendimiento y Ciclo en el estado de madurez de cosecha para silaje.

FV	GL	Ciclo	RMSe	RMSch	RMSDpc
2012					
Bloque	15	1877 **	1,17 NS	2,06 NS	1,56 NS
Tratamientos	146	9795 **	12,51 **	7,88 **	13,21 **
Genotipos	143	9078 **	9,33 **	5,83 **	10,08 **
Testigos	2	64697 **	49,86 **	150,88 **	50,22 **
Genotipos vs Testigos	1	4579 **	450,96 **	19,23 **	449,81 **
Error	30	278 **	1,79	2,03	2,87
Total	191				
2013					
Bloque	9	2414 **	2,39 NS	3,63 NS	2,43 NS
Tratamientos	146	13542 **	13,06 **	7,14 **	14,11 **
Genotipos	143	12083 **	9,70 **	6,38 **	10,81 **
Testigos	2	115066 **	86,28 **	60,93 **	104,78 **
Genotipos vs Testigos	1	20529 **	345,69 **	10,09 *	306,52 **
Error	18	765 **	3,08	1,75	3,06
Total	173				
2014					
Bloque	9	2305 NS	2,74 NS	1,42 NS	1,71 NS
Tratamientos	146	19724 **	10,10 **	9,32 **	11,40 **
Genotipos	143	19296 **	8,58 **	7,30 **	9,44 **
Testigos	2	58994 **	25,40 **	142,07 **	54,00 **
Genotipos vs Testigos	1	2631 NS	199,81 **	31,70 **	207,66 **
Error	18	2118	1,71	1,31	1,42
Total	173				
No Aditividad	1	82040 **	10,50 NS	11,19 NS	35,56 *
Residual	285	9093,1	5,86	4,54	6,82

Referencias: Cuadrados medios estimados para las variables: Ciclo siembra a R₁ (Ciclo, °C día⁻¹), Rendimiento en Materia Seca de spigas (RMSe, t ha⁻¹), Rendimiento en Materia Seca de Caña+Hojas (RMSch, t ha⁻¹) y Rendimiento en Materia Seca Digestible de Planta Completa (RMSDpc, t ha⁻¹). ** significativo al 1 %, * significativo al 5 %, NS no significativo.



Los ANVA realizados para cada ambiente por separado mostraron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre tratamientos, genotipos y testigos para todas las variables de rendimiento en M1 (Tabla 9). Las comparaciones entre genotipos y testigos mostraron diferentes resultados según el ambiente. Las diferencias entre los testigos y los genotipos fueron significativas ($p < 0,01$) para RMSDpc, RMSe, RMSch y Ciclo, en todos los casos, las medias de los testigos fueron mayores que las de los genotipos (Tabla 9). Si bien nuestros resultados coinciden con Bertoia et al. (2006), estos solamente evaluaron híbridos simples.

Es importante remarcar que, en nuestro trabajo se evaluaron 147 genotipos de maíz (144 grupos de genotipos o poblaciones con características comunes + 3 testigos) de rasgos muy variables en cuanto a su estructura genética, procedencia, tipo de grano, ciclo, etc. En cuanto al Ciclo, los materiales evaluados presentaron un rango de 666 a 1476 °C día⁻¹ para el período siembra-R₁, considerando los 3 años. El año 2014 no presentó diferencias significativas para Ciclo, pero sí una tendencia a una mayor duración del período Siembra-R₁ a favor de los testigos. Esto pudo deberse a un leve período de altas temperaturas y un leve déficit hídrico ocurrido durante el mes de noviembre del 2014 (Figura 4). Según Abrecht y Carberry (1993), un estrés hídrico en estadios vegetativos puede producir un retraso de la floración, lo que afectó en distinta forma a los genotipos evaluados.

Los niveles más altos de RMSch se encontraron en 2012, lo cual se asoció con las más altas temperaturas durante el período Siembra-R₁ (23,5 °C) (Tabla 1) y a una buena distribución de las precipitaciones durante el período crítico alrededor de floración femenina (R₁) (Figura 4). Sin embargo, la correlación encontrada entre la temperatura y RMSch fue baja (0,13), aunque significativa (Tabla 23, Anexo). Estos resultados concuerdan con los publicados por Cirilo y Andrade (1994), quienes describieron que las



fechas de siembra tardías causan un mayor desarrollo de la fracción vegetativa del maíz, en detrimento de la fracción granífera.

El Ciclo ($p < 0,01$) y el RMSDpc ($p < 0,05$) tuvieron efectos significativos en la prueba de No Aditividad de Tukey para evaluar la de interacción $G \times A$ (Tabla 9). No encontramos interacción entre las variables de rendimiento de espiga y caña+hojas, difiriendo con los resultados encontrados por Bertoia y Aulicino (2014), que demostraron interacción significativa para el RMSe.

Variables de calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje.

Los resultados de los ANVA por ambiente para las variables de calidad se expresan en la Tabla 10. Las variables de calidad de tallo fueron significativas para los genotipos, pero su respuesta estuvo condicionada por las condiciones ambientales de cada año en particular. El ensayo realizado en el año 2013 presentó los valores más altos de DIVch (54,58%) y BRIX (12,02 °B) y más bajos de: FDNch (61,61 %), FDAch (31,81 %) y LDAch (4,96 %) (Tabla 9). Para la variable DFDNch, los valores más altos se midieron en 2014 (38,43%).

Los ambientes con fechas de siembra más temprana (2013 y 2014), presentaron los mejores valores de calidad de la fracción vegetativa de los genotipos de maíz. Se encontró una marcada correlación entre las variables de calidad de caña+hojas y la temperatura media del aire en el período Siembra- R_1 . Las variables FDAch, FDNch y LDAch, se asociaron positivamente con la temperatura (0,25, 0,21 y 0,45, respectivamente), mientras que DIVch, DFDNch y BRIX lo hicieron negativamente (-0,42, -0,54 y -0,17, respectivamente) (Tabla 23, Anexo). Otros autores (Fairey, 1983; Darby y Lauer, 2002) también obtuvieron una mayor calidad utilizando fechas de siembra



tempranas, lo que puede atribuirse principalmente al efecto de la temperatura en la síntesis de los componentes de la pared celular y a una reducción de la translocación de fotosintatos durante el llenado del grano.

Tabla 10. Análisis de varianza de las variables de calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje.

FV	GL	FDAch	FDNch	LDAch	DIVch	DFDNch	BRIX
2012							
Bloque	15	7,57 **	11,13 **	0,50 NS	4,98 NS	3,35 NS	3,86 NS
Tratamientos	146	4,80 **	14,64 **	0,36 NS	13,91 **	20,32 **	10,48 **
Genotipos	143	4,12 **	13,41 **	0,32 NS	9,73 **	9,52 *	10,00 **
Testigos	2	23,37 **	28,06 **	2,71 **	283,17 **	797,03 **	17,80 **
Genotipos vs Testigos	1	73,65 **	172,69 **	2,02 **	93,96 **	23,51 *	56,46 **
Error	30	1,47	3,15	0,30	2,51	5,22	2,36
Total	191						
2013							
Bloque	9	4,14 NS	34,88 *	0,13 NS	10,14 NS	8,65 *	5,69 NS
Tratamientos	146	4,46 NS	15,07 NS	0,47 **	11,30 NS	17,13 **	8,88 *
Genotipos	143	4,21 NS	15,16 NS	0,39 **	9,74 NS	11,58 **	8,18 *
Testigos	2	11,96 *	5,35 NS	3,19 **	105,86 *	396,00 **	0,14 NS
Genotipos vs Testigos	1	25,06 **	19,42 NS	6,41 **	44,43 **	55,33 **	123,80 **
Error	18	2,83	13,32	0,109	6,87	3,47	3,95
Total	173						
2014							
Bloque	9	13,16 **	30,40 *	0,53 NS	11,50 **	3,21 NS	9,70 **
Tratamientos	146	5,76 **	17,45 NS	0,62 NS	14,10 **	22,82 **	9,81 **
Genotipos	143	5,03 **	17,31 NS	0,53 NS	9,99 **	12,41 **	9,05 **
Testigos	2	31,03 **	19,37 NS	4,32 **	295,13 **	766,68 **	18,27 **
Genotipos vs Testigos	1	62,15 **	35,26 NS	5,91 **	40,55 **	24,12 *	101,44 **
Error	18	1,77	11,08	0,34	2,09	4,79	2,53
Total	173						
No Aditividad	1	9,73 NS	91,47 *	4,61 *	1,34 NS	8,02 NS	39,88 NS
Residual	285	4,16	15,87	0,40	8,06	8,10	9,65

Referencias: Cuadrados medios estimados para las variables: Fibra Detergente Ácido (FDAch, %), Fibra Detergente Neutro (FDNch, %), Lignina Detergente Ácido (LDAch, %), Digestibilidad in vitro (DIVch, %), Digestibilidad de la Fibra (DFDNch %) y Contenido de azúcares solubles (BRIX, °B). ** significativo al 1 %, * significativo al 5 %, NS no significativo.



Los testigos difirieron significativamente ($p < 0,01$) para la mayoría de las variables de calidad en casi todos los ambientes, excepto para FDAch y DIVch que fueron significativos en 2013 ($p < 0,05$), mientras que en 2013 y 2014 fueron no significativos para la variable FDNch. Los genotipos difirieron significativamente de los testigos ($p < 0,01$) en los 3 ambientes para FDAch, LDAch y DIVch. La variable DFDNch mostró diferencias significativas al $p < 0,01$ en $p < 0,05$ en 2012 y 2014. Los genotipos presentaron diferencias significativas ($p < 0,01$) para la variable DFDNch en todos los ambientes, los valores más altos se midieron en 2014 (38,43%) (Tabla 10).

La prueba de No Aditividad de Tukey se aplicó por separado para todas las variables (Tabla 10). Fue significativa ($p < 0,05$) para FNDch y LDAch, revelando la existencia de efectos de interacción $G \times A$.

Los genotipos arrojaron diferencias significativas sobre los testigos para las variables de calidad de tallo. Resultados similares fueron encontrados por Bertoia et al. (2006) al evaluar poblaciones locales como fuentes de alelos favorables para generar híbridos de maíz para silaje. Nuestros resultados también concuerdan con Barrière et al. (2005), quienes evaluaron genotipos mejorados de maíz de diferentes décadas a través de variables de rendimiento y calidad de forraje. A pesar de que en nuestro trabajo los genotipos evaluados presentan distintas estructuras genéticas, origen del germoplasma, ciclos, estructura de planta, eventos transgénicos, etc.; podemos apreciar un gradiente de pérdida de calidad del componente vegetativo a medida que los esfuerzos de selección tendieron a incrementar el componente granífero.

Caracterización de los parámetros genéticos relacionados a variables de rendimiento y calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje.



Tabla 11. Parámetros genéticos de las variables de rendimiento y calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje.

Variable	Media general	Media Testigos	Media Tratamientos	CV%	VF	VE	VG	H ²	CVg/CVe
2012									
Ciclo	995,35	1009,49	990,64	1,68	10397,31	278,32	10118,99	97,32	6,03
RMSe	10,70	13,67	9,71	12,50	13,05	1,79	11,26	86,29	2,51
RMSch	10,21	10,60	10,09	13,95	7,46	2,03	5,43	72,79	1,64
FDAch	34,98	36,57	34,45	3,46	4,80	1,47	3,33	69,45	1,51
FDNch	66,61	68,98	65,81	2,65	15,13	3,12	12,01	79,39	1,96
LDAch	5,93	6,16	5,85	9,25	0,36	0,30	0,06	17,12	0,45
DIVch	50,10	48,47	50,65	3,16	11,19	2,50	8,69	77,64	1,86
DFDNch	32,95	32,17	33,21	6,93	11,34	5,22	6,12	53,99	1,08
BRIX	7,94	6,63	8,38	19,35	11,50	2,36	9,14	79,48	1,97
RMSDpc	14,30	17,11	13,37	13,34	15,04	3,64	11,40	75,81	1,77
2013									
Ciclo	1133,80	1158,04	1128,75	2,44	18277,36	764,56	17512,80	95,82	4,79
RMSe	10,18	13,26	9,53	17,21	13,88	3,07	10,81	77,90	1,88
RMSch	8,73	9,25	8,62	15,12	11,19	1,74	9,44	84,42	2,33
FDAch	31,98	32,83	31,81	5,28	5,00	2,85	2,15	42,96	0,87
FDNch	61,77	62,54	61,61	5,91	19,88	13,33	6,54	32,93	0,70
LDAch	5,05	5,47	4,96	6,59	0,47	0,11	0,36	76,38	1,80
DIVch	54,35	53,23	54,58	4,83	11,40	6,89	4,51	39,57	0,81
DFDNch	35,77	34,57	36,02	5,20	17,80	3,46	14,34	80,56	2,04
BRIX	11,63	9,77	12,02	17,07	13,26	3,94	9,32	70,25	1,54
RMSDpc	13,04	15,94	12,43	13,39	17,56	3,05	14,51	82,64	2,18
2014									
Ciclo	1058,02	1065,95	1056,37	4,35	26511,86	2118,09	24393,77	92,01	3,39
RMSe	10,75	13,10	10,26	12,15	13,03	1,71	11,32	86,90	2,58
RMSch	9,88	10,83	9,69	11,62	11,62	1,32	10,30	88,65	2,80
FDAch	33,47	34,76	33,20	3,98	7,12	1,77	5,35	75,11	1,74
FDNch	63,93	64,89	63,73	5,20	25,26	11,07	14,19	56,18	1,13
LDAch	5,10	5,50	5,01	11,52	0,65	0,35	0,30	46,61	0,93
DIVch	54,07	53,03	54,29	2,66	12,00	2,07	9,93	82,73	2,19
DFDNch	38,26	37,43	38,43	5,71	15,66	4,77	10,88	69,51	1,51
BRIX	9,71	8,04	10,06	16,39	11,84	2,54	9,30	78,58	1,92
RMSDpc	14,20	16,60	13,70	8,41	14,19	1,43	12,77	89,95	2,99

Referencias: Media general, Media Testigos, Media Tratamientos, Coeficiente de Variación (CV%, %), Varianza Fenotípica (VF), Varianza Ambiental (VA), Varianza Genética (VG), Heredabilidad en sentido amplio (H²), Razón CVg/CVe, para las siguientes variables: Ciclo desde siembra a R₁ (Ciclo, °C día⁻¹) de la fracción Espiga: Rendimiento en Materia seca de Espiga (RMSe, t ha⁻¹) y variables de la fracción Caña+Hojas: Rendimiento en Materia seca (RMSch, t ha⁻¹), Fibra Detergente Ácido (FDAch, %), Fibra Detergente Neutro (FDNch, %), Lignina Detergente Ácido (LDAch, %), Digestibilidad *in vitro* (DIVch, %), Digestibilidad de la Fibra (DFDNch, %), Contenido de azúcares solubles (BRIX, °B), Rendimiento en Materia Seca Digestible de Planta Completa (RMSDpc, t ha⁻¹).



En la Tabla 11 se puede ver que Ciclo fue la variable que presentó mayor VF y VG. A su vez, mostró un bajo CV% y una elevada H^2 . Esto era esperable, ya que es una variable con un alto control genético y de baja modificación ambiental. La VG superó con creces su VA, lo que determinó valores máximos para la relación CVg/CVe.

Las variables de rendimiento (RMSe, RMSch y RMSDpc) también produjeron VF elevadas y altas H^2 (Tabla 11). La Variable compuesta RMSDpc, se comportó de manera similar a las otras variables de rendimiento debido a la baja tracción ejercida por su componente de calidad forrajera. Esta variable presentó una elevada relación CVg/CVe (1,77-2,99), lo que implicaría un efecto genético mayor al ambiental.

Las variables asociadas con la calidad presentaron una variación fenotípica más baja que las variables de rendimiento, aunque DIVch tuvo los valores más altos en dos de los tres ambientes (1,86 y 2,19 en 2012 y 2014, respectivamente) y DFDNch obtuvo el mayor valor en el 2013 (2,04) (Tabla 11). Las otras variables de calidad presentaron valores intermedios, siendo LDAch la que más fluctuó entre ambientes. La variable BRIX, presentó una elevada relación CVg/CVe en los tres ambientes evaluados (rango 1,54 – 1,97), lo cual revela un fuerte componente genético, siendo posible su uso como variable predictora de la cantidad de azúcares presentes en la caña en M1. Pfalsdorf (2017), encontró que esta variable presenta un rango medio de heredabilidad en sentido estricto (h^2 , 58%), pudiendo ser equiparable con nuestros resultados, donde se evaluó la heredabilidad en sentido amplio, con un rango de H^2 de 70,25 a 79,48%.

Estado de madurez de cosecha de grano (rastreo) (M2).



Análisis de las variables de rendimiento y calidad de la biomasa lignocelulósica y de rendimiento en grano en el estado de madurez de cosecha de grano.

Tabla 12. Análisis de varianza de las variables de rendimiento de la biomasa lignocelulósica y de rendimiento en grano en el estado de madurez de cosecha de grano.

FV	GL	ALTp	RG	RMSr	RETP
2012					
Bloque	15	0,03 **	1,60 NS	1,60 NS	0,20 NS
Tratamientos	146	0,07 **	12,30 **	9,20 **	1,30 **
Genotipos	143	0,07 **	7,50 **	8,50 **	1,20 **
Testigos	2	0,50 **	65,40 **	62,20 **	9,90 **
Genotipos vs Testigos	1	0,15 **	651,20 **	0,80 NS	0,50 NS
Error	30	0,01	2,00	2,00	0,20
Total	191				
2013					
Bloque	9	0,02 NS	0,70 NS	0,70 NS	0,10 NS
Tratamientos	146	0,06 *	10,40 **	7,30 **	0,80 **
Genotipos	143	0,06 *	6,50 **	7,00 **	0,70 **
Testigos	2	0,21 **	108,40 **	26,40 **	5,70 **
Genotipos vs Testigos	1	0,26 **	362,90 **	11,40 **	0,60 *
Error	18	0,03	1,90	1,00	0,10
Total	173				
2014					
Bloque	9	0,04 NS	1,50 NS	0,90 NS	0,10 NS
Tratamientos	146	0,05 NS	10,50 **	6,90 **	0,80 **
Genotipos	143	0,05 NS	7,00 **	5,30 **	0,60 **
Testigos	2	0,32 **	30,60 **	34,00 **	6,10 **
Genotipos vs Testigos	1	0,00 NS	468,80 **	179,40 **	21,90 **
Error	18	0,03	0,80	0,70	0,10
Total	173				
No Aditividad	1	0,01 NS	0,00 NS	54,50 **	11,00 **
Residual	285	0,04	3,00	5,20	0,60

Referencias: Cuadrados medios estimados para las variables: Altura de Planta (ALTp, m), Rendimiento en grano (RG, t ha⁻¹) y Rendimiento en Materia Seca del Rastrojo (RMSr, t ha⁻¹) y Rendimiento en Etanol Teórico Potencial (RETP, mil l ha⁻¹). ** significativo al 1 %, * significativo al 5 %, NS no significativo.

Los ANVA realizados para cada ambiente por separado mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre los tratamientos (genotipos evaluados y genotipos



utilizados como testigos) para todas las variables de rendimiento (Tabla 12). Las comparaciones entre genotipos y testigos mostraron diferentes resultados según el ambiente, al igual que el estado de madurez de cosecha de silaje (M1). Las diferencias entre los testigos y los genotipos fueron significativas para RG ($p < 0,01$), siendo las medias de los testigos más altas que las de los genotipos, Lo mismo sucedió con RMSr en 2013 y 2014 (Tabla 12). La variable RETP mostró los resultados más disímiles, con diferencias significativas en 2014 ($p < 0,01$), en 2013 ($p < 0,05$), y no significativa en 2012.

La variable ALTp también produjo diferentes resultados según el ambiente evaluado, difirió significativamente ($p < 0,01$) en 2012, en 2013 ($p < 0,05$) y fue no significativo en 2014. Al igual que en M1 para RMSe, los niveles más altos de RG se encontraron en 2012. Según algunos autores (Maddonni, 2012; Mercau et al., 2014) en la zona núcleo agrícola de Argentina se utiliza a las fechas de siembra tardías como una estrategia para disminuir el riesgo de déficit hídrico durante el período de floración. Esta estrategia proporciona mayor estabilidad de las cosechas, pero no garantiza elevados rendimientos. Los niveles más altos de Altp (2,08 m), RMSr (10,61 t ha⁻¹) y RETP (3,70 mil l ha⁻¹) también se encontraron en 2012, lo que también estaría relacionado con la fecha de siembra del experimento. En este sentido, se encontró una correlación positiva de estas variables con la temperatura (Altp 0,25, RMSr 0,47 y RETP 0,49) (Tabla 24, Anexo). Estos resultados concuerdan con Cirilo y Andrade (1994), quienes encontraron que las siembras tempranas favorecían el crecimiento reproductivo, con el mayor rendimiento de grano, mientras que las siembras tardías favorecían el crecimiento vegetativo. No obstante, los niveles más altos de RG también se encontraron en 2012, estos podrían deberse a una buena distribución de la lluvia efectiva (> 10 mm día⁻¹) y la temperatura del aire menor de 36 °C durante el período de floración (Figura 4), a pesar



de una fecha de siembra tardía. Nuestros resultados indicarían que las fechas de siembra tardías serían más beneficiosas para la producción de biomasa lignocelulósica con fines bioenergéticos por su mayor RMSr y RETP debido a las mayores temperaturas.

La prueba de No Aditividad fue significativa para RMSr y RETP ($p < 0,01$) que indicaron efectos significativos de interacción $G \times A$ (Tabla 12). Estos resultados mostraron, como era esperable, respuestas y estrategias ecofisiológicas diferentes en los genotipos de origen y ciclos diversos según el ambiente. Sah et al, (2016) encontraron resultados similares al evaluar genotipos doble propósito, destinados a la producción de grano y biomasa lignocelulósica.



Tabla 13. Análisis de varianza de las variables de calidad de la biomasa lignocelulósica en el estado de madurez de cosecha de grano.

FV	GL	FDAr	FDNr	LDAr	DIVr	DFDNr
2012						
Bloque	15	13,4 **	44,9 **	0,7 NS	9,4 **	18,2 *
Tratamientos	146	8,4 *	23 NS	0,7 *	17,6 **	30,9 **
Genotipos	143	7,6 *	22,4 NS	0,7 *	10,7 **	19 **
Testigos	2	69,1 **	77,4 *	4,6 **	497,4 **	849,2 **
Genotipos vs Testigos	1	10,3 NS	15,8 NS	5,8 **	66,2 **	208,2 **
Error	30	4,4	14,6	0,4	2,8	8,4
Total	191					
2013						
Bloque	9	5,1 NS	21,5 NS	1,6 **	3,9 NS	7,6 NS
Tratamientos	146	8,5 NS	25,2 *	0,9 *	18,5 **	25,2 *
Genotipos	143	6,6 NS	20,6 *	0,7 NS	10,9 **	16,1 NS
Testigos	2	144,4 **	339,7 **	11,4 **	572,6 **	613,5 **
Genotipos vs Testigos	1	5,1 NS	48,8 *	7,9 **	0,8 NS	155 **
Error	18	5	9,9	0,4	3,9	11,2
Total	173					
2014						
Bloque	9	5,1 NS	11 NS	1,6 *	8,5 *	4,3 NS
Tratamientos	146	9,9 **	19 **	1,1 NS	22,2 **	39,3 **
Genotipos	143	8 **	17,1 **	0,9 NS	14 **	22,7 **
Testigos	2	135,9 **	166,2 **	10 **	615,1 **	1225,4 **
Genotipos vs Testigos	1	25,1 **	0,1 NS	8,9 **	5,8 NS	45,4 **
Error	18	2,5	4,5	0,6	2,6	3,7
Total	173					
No Aditividad	1	2,7 NS	0,1 NS	2,6 *	4,1 NS	29,4 NS
Residual	285	7,3	21,3	0,6	10,5	12,6

Referencias: Cuadrados medios estimados para las variables: Fibra Detergente Ácido (FDAr, %), Fibra Detergente Neutro (FDNr, %), Lignina Detergente Ácido (LDAr, %), Digestibilidad in vitro (DIVr, %) y Digestibilidad de la Fibra (DFDNr, %). ** significativo al 1 %, * significativo al 5 %, NS no significativo.

Los resultados de los ANVA por ambiente para las variables de calidad se muestran en la (Tabla 13). La DIVr presentó diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) en todos los ambientes, los valores más altos se obtuvieron en 2014 (49,05%) (Tabla 14). Sin embargo, el resto de las variables de calidad tuvieron respuestas diferenciales ($p < 0,01$) según el ambiente considerado: para DFDNr en 2012 y 2014



(29,69 y 39,03%, respectivamente), para FDAr (39,04%) en 2014. También encontramos diferencias al 5% para FDNr (68,99%) en 2013; y para FDAr (38,96%) y LDAr (5,95%) en 2012 (Tabla 13). Muttoni et al. (2013) también encontraron diferencias significativas en la calidad del rastrojo al evaluar poblaciones locales de maíz de México y líneas endocriadas de CIMMYT, siendo las variables de mayores diferencias entre los genotipos DIV y LDA.

Al igual que en M1, se encontró una correlación significativa entre las variables de calidad de rastrojo y la temperatura media del aire en el período Siembra-R₁. Las variables FDAr, FDNr y LDAr, se asociaron positivamente con la temperatura (0,35, 0,08 y 0,17, respectivamente) mientras que DIVr y DFDNr lo hicieron negativamente (-0,50 y -0,51) (Tabla 24, Anexo). El año 2014 presentó los valores más altos de DIVr (49,05%), DFDNr (39,04%) y FDNr (73,58%); FDAr moderado (36,73%) y bajo LDAr (5,72%) (Tabla 14). Si bien estos resultados coinciden con los de otros autores (Buxton, 1996; Darby y Lauer, 2002; Lewis et al., 2004), la correlación entre la temperatura y las variables de calidad, fue menor que en M1. En este sentido, Hansey et al. (2010) encontraron que la senescencia incrementa la diferencia en las variables de calidad de tallo entre los genotipos, lo cual podría explicar la menor correlación.

Los testigos difirieron significativamente ($p < 0,01$) para la mayoría de los rasgos en casi todos los ambientes. FDNr fue significativo al $p < 0,05$ sólo en 2014. Esto probaría la existencia de una respuesta amplia para los tres híbridos comerciales utilizados para ajustar las medias (VA_j) de los genotipos.

Los genotipos difirieron significativamente de los testigos ($p < 0,01$) en los tres ambientes para LDAr y FDNr. Sin embargo, el contraste sólo fue significativo ($p < 0,01$) para DIVr en el 2012 y para FDAr en 2014. La variable FDNr sólo mostró diferencias significativas en el año 2013 (Tabla 13).



Los genotipos mostraron diferencias significativas sobre los testigos para las variables de calidad. En el año 2014, con la fecha de siembra más temprana, se observaron las medias más altas para DIVr y DFDNr. Recordemos que estas variables son importantes para la conversión en etanol (Lorenz et al., 2009a,). Ertiro et al, (2013) encontraron una variación ambiental importante para las variables relacionadas con la calidad de la fibra, como la DIV y el contenido de proteína del tallo de maíz al analizar híbridos de maíz en África.

La prueba de No Aditividad de Tukey fue significativa ($p < 0,05$) sólo para LDAr, revelando la existencia de efectos de interacción $G \times A$ (Tabla 13). Estos resultados nos permitirían inferir una mayor inestabilidad ambiental para esta variable. Muttoni et al. (2013) encontraron resultados similares al evaluar poblaciones locales de maíz en México, pero con valores significativos para LDA y DIV, atribuyendo una leve diferencia a favor de DIV en su estabilidad ambiental. Esto se ve reflejado en nuestro trabajo al analizar la variabilidad de LDAr, la cual fue alta en comparación con su valor medio. La relación CVg/CVe alcanzó valores cercanos a 1, lo que indica una contribución similar de la varianza genética frente a la varianza ambiental. Riboulet et al. (2008) al realizar comparaciones histológicas y bioquímicas en líneas endocriadas francesas para silaje, también encontraron una gran variabilidad genética en el contenido y distribución de lignina. Según Campbell y Sederoff, (1996), existe una gran variabilidad genética en la expresión de genes que codifican enzimas biosintéticas de lignina en respuesta a diferentes señales ambientales y de desarrollo del cultivo.

Los ANVA de V (Vuelco) y Q (Quebrado) no se realizaron debido a que son rasgos categóricos.



Caracterización de los parámetros genéticos relacionados a variables de rendimiento y calidad de la biomasa lignocelulósica en el estado de madurez de cosecha de grano.

Tabla 14. Parámetros genéticos de las variables de rendimiento en grano y de rendimiento y calidad de rastrojo en el estado de madurez de cosecha de grano.

Variable	Media general	Media Testigos	Media Tratamientos	CV%	VF	VE	VG	H ²	CVg/CVe
2012									
Altp	2,10	2,17	2,08	3,87	0,10	0,01	0,09	93,13	3,68
RG	9,38	12,93	8,20	14,96	12,42	1,97	10,45	84,14	2,3
RMSr	10,61	10,53	10,64	13,35	10,59	2,01	8,58	81,02	2,07
FDAr	38,61	39,54	38,29	5,42	9,6	4,38	5,22	54,34	1,09
FDNr	73,39	73,54	73,34	5,20	28,86	14,57	14,3	49,53	0,99
LDAr	5,95	6,39	5,81	10,20	0,79	0,37	0,42	53,26	1,07
DIVr	44,38	42,97	44,85	3,74	13,72	2,76	10,96	79,89	1,99
DFDNr	29,60	27,07	30,45	9,79	26,31	8,40	17,92	68,08	1,46
RETP	3,70	3,66	3,72	12,53	1,45	0,22	1,23	85,13	2,39
2013									
Altp	1,78	1,87	1,76	9,40	0,10	0,03	0,07	70,50	1,55
RG	7,90	11,07	7,24	17,32	11,83	1,87	9,96	84,17	2,31
RMSr	8,55	9,10	8,43	11,87	10,03	1,03	9,00	89,73	2,96
FDAr	35,38	35,76	35,31	6,32	7,56	5,00	2,56	33,82	0,71
FDNr	68,78	67,62	69,02	4,57	24,6	9,89	14,72	59,81	1,22
LDAr	6,20	6,67	6,10	10,55	0,93	0,43	0,50	54,08	1,09
DIVr	48,03	47,88	48,06	4,14	11,61	3,95	7,66	65,97	1,39
DFDNr	27,69	25,24	27,75	12,22	18,66	11,14	7,51	40,28	0,82
RETP	2,76	2,89	2,74	10,44	0,98	0,08	0,89	91,47	3,27
2014									
Altp	1,98	1,98	1,97	9,24	0,07	0,03	0,03	49,78	1,00
RG	8,62	12,23	7,87	10,65	10,94	0,84	10,1	92,3	3,46
RMSr	7,84	10,06	7,37	10,43	5,88	0,67	5,21	88,63	2,79
FDAr	36,73	37,55	36,56	4,33	8,94	2,53	6,41	71,7	1,59
FDNr	73,58	73,52	73,59	2,89	19,31	4,53	14,79	76,55	1,81
LDAr	5,72	6,21	5,62	13,08	1,10	0,56	0,54	49,16	0,98
DIVr	49,05	48,66	49,14	3,31	15,5	2,63	12,87	83,00	2,21
DFDNr	39,04	37,71	39,09	4,93	27,31	3,67	23,64	86,57	2,54
RETP	2,74	3,52	2,58	12,2	0,69	0,11	0,58	83,83	2,28

Referencias: Media general, Media Testigos, Media Tratamientos, Coeficiente de Variación (CV% , %), Varianza Fenotípica (VF), Varianza Ambiental (VA), Varianza Genética (VG), Heredabilidad en sentido amplio (H²), Razón CVg/CVe, para las siguientes variables: Altura de Planta (ALTp, m), Rendimiento de Grano (RG, t/ha), Rendimiento en Materia seca de Rastrojo (RMSr, t/ha), Fibra Detergente Ácido (FDAr, %), Fibra Detergente Neutro (FDNr, %), Lignina Detergente Ácido (LDAr, %), Digestibilidad *in vitro* (DIVr, %), Digestibilidad de la Fibra (DFDNr, %), Rendimiento en Etanol Teórico Potencial (RETP, mil l/ha).



Las variables de rendimiento (RG, RMSr, RETP) produjeron la VF más alta (Tabla 14). Estas también presentaron una elevada H^2 . La VG superó con creces su VA, que determinó los valores máximos para la relación CVg/CVe. Las variables asociadas con la calidad presentaron una variación fenotípica más baja que las variables de rendimiento, aunque LDAr, DIVr y DFDNr alcanzaron valores intermedios, mientras que FDNr tuvo los valores más altos en dos de los tres ambientes, debido al alto VG y VA en los tres ambientes. La DFDNr, en 2012 y 2014, presentó una VG que excedió al VA en 1,5 a 2,5 veces, respectivamente. Las variables de calidad presentaron una relación CVg/CVe cercana a 1 (rango 0,71-1,63), excepto el DFDNr y el FDNr que mostraron variaciones ambientales fluctuantes de acuerdo con el año. La variable FDNr mostró valores de VA altos, lo que determinó valores bajos para la relación CVg/CVe.

Las variables de rendimiento mostraron mayor valor de H^2 , en comparación con las variables de calidad (Tabla 14). You et al. (2013) explicaron que H^2 está sobreestimada en diseños aumentados. No obstante, resulta ser un buen estimador en términos relativos para la comparación de genotipos en función de su varianza genética. Las variables DIVr y DFDNr mostraron valores más altos de H^2 y una mayor relación CVg/CVe, por lo tanto, estas variables podrían usarse en la selección directa (Lorenz et al., 2009b). Sin embargo, la incorporación de genes favorables no resulta una labor sencilla, ya que una vez seleccionados, hay que lograr incorporarlos a los programas de obtención de nuevos genotipos comerciales. Allí actúan otros mecanismos como la obtención de líneas endocriadas que porten dichos genes, pruebas intermedias y la generación de híbridos experimentales para finalmente obtener los nuevos híbridos de maíz mejorados. Lewis et al, (2010) estimaron una H^2 mayor para la glucosa, la liberación de glucosa y la lignina que para el rendimiento de grano y el vuelco de tallos y raíces. Estos autores sugieren que los programas de mejoramiento de maíz actuales deberían ser



capaces de incorporar la calidad de caña+hojas como objetivo de mejoramiento para generar híbridos con buena aptitud para la producción bioetanol a partir del rastrojo, sin recurrir a germoplasma no adaptado o exótico y sin afectar negativamente las ganancias genéticas para el rendimiento de grano y los rasgos agronómicos. Por lo tanto, podríamos confirmar a las variables: DIV y DFDN como las de mayor peso discriminatorio y con mayor aptitud para selección genotipos con mayor capacidad de convertibilidad en etanol. Sin embargo, DIVr resultó ser la más estable ya que mantuvo una alta H^2 en los tres ambientes. Esto podría acelerar el avance genético, debido a que al seleccionar por variables con mayor H^2 implicaría que la expresión de esos caracteres estaría más condicionada por el genotipo que por el ambiente. Por otro lado, la FDNr mostró una alta variación fenotípica, valores intermedios de H^2 y una relación CVg/CVe que no se mantuvo constante en los diferentes ambientes. Esto indicaría una menor repetibilidad y su uso para seleccionar genotipos sería limitado.

Conclusiones

En el estado de madurez de cosecha para silaje las variables de rendimiento (RMSch, RMSe y RMSDpc) presentaron un mayor condicionante genético que las de calidad, señalado por mayores valores de H^2 y razón CVg/CVe . Las variables con mayor CVg/CVe fueron DIVch y DFDNch, pudiendo ser consideradas como las variables más importantes a aplicar en programas de selección de genotipos para aptitud forrajera. Por otro lado, la variable LDAch fue la más condicionada por el ambiente, por alcanzar las menores razones CVg/CVe .



Las fechas de siembra tardía serían propicias para lograr mayores rendimientos de silaje, pero de menor calidad nutricional, debido a la relación encontrada entre la temperatura y las variables de rendimiento y las de calidad.

En el estado de madurez de cosecha de grano se encontró que las variables de rendimiento (RG, RMSr y RETP) también alcanzaron los mayores valores de H^2 y razón CVg/CVe. Las variables de calidad de rastrojo, presentaron menores valores de H^2 , aunque en general, con una razón CVg/CVe cercana a 1, con excepción de DFDNr y el FDNr que mostraron variaciones ambientales fluctuantes de acuerdo al año. Las variables DIVr y DFDNr tuvieron valores más altos de H^2 y una mayor relación CVg/CVe, pudiendo ser consideradas como herramientas útiles en selección directa de genotipos con propósitos bioenergéticos.

LDAr fue la variable de calidad más fluctuante y condicionada por el ambiente.

El efecto de las mayores temperaturas condicionadas por fechas de siembra tardías, serían más beneficiosas para la producción de biomasa lignocelulósica con fines bioenergéticos por provocar mayor RMSr y RETP, a expensas de una menor calidad del rastrojo.



CAPÍTULO III

Caracterización de los recursos genéticos de maíz en función de su aptitud forrajera y su aptitud para la producción de grano y bioetanol lignocelulósico en dos estados madurez de cosecha.



Objetivo

b. Correlacionar las variables de rendimiento y calidad en dos estados de madurez diferentes de la fenología del cultivo para estimar la producción potencial de silaje y de bioetanol lignocelulósico.

Metodología de análisis de los datos

Mediante la aplicación de coeficientes de correlación fenotípica se estudiaron las asociaciones entre variables de calidad y cantidad de la fracción vegetativa y variables morfológicas de la planta para los dos estados de madurez de cosecha programados y en los diferentes grupos genotípicos encontrados (Rohlf y Sokal, 1981). Luego se aplicaron técnicas multivariadas con la intención de clasificar el germoplasma e identificar grupos de materiales con patrones diferenciales asociados a las variables de rendimiento y calidad analizadas en el estado de madurez de postcosecha de grano (Sneath y Sokal, 1973). Se consideró como variable respuesta al RMSDpc para el M1 y RETP para el M2.

Las variables morfológicas, de calidad y de cantidad de la fracción vegetativa y reproductiva para los dos estados de madurez de cosecha fueron consideradas como las variables dependientes y los distintos grupos de genotípicos como las variables clasificatorias. Los genotipos de maíz se agruparon *a priori* en función del nivel de mejora que poseen, utilizando 5 clases: G1, Poblaciones locales, G2, Híbridos comerciales, G3, Híbridos sileros experimentales, G4, Híbridos precoces franceses y G5, Compuestos sintéticos.

A posteriori se emplearon técnicas de taxonomía numérica como análisis de componentes principales mediante el empleo del software InfoStat versión 2011 (Di Rienzo et al., 2011) para clasificar a los genotipos a través de las variables morfológicas, agronómicas y de calidad, cantidad del rastrojo y de grano. Se analizó la estructura de los



grupos formados y se identificaron las variables con mayor peso en la clasificación. Los porcentajes de traza resultantes del autoanálisis presentaron una caracterización de la variabilidad disponible en la población de genotipos estudiados.

Resultados y Discusión

Análisis de correlación entre las variables de aptitud forrajera en genotipos de maíz en el estado de madurez de cosecha de silaje.

Tabla 15. Matriz de correlaciones fenotípicas de Pearson (Coeficientes\probabilidades) entre las variables de aptitud forrajera en genotipos de maíz en el estado de madurez de cosecha para silaje.

	ALTp	BRIX	Ciclo	DFDNch	DIVch	FDAch	FDNch	LDAch	RMSe	RMSch	RMSDpc
ALTp		0,160	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
BRIX	-0,07		0,000	0,710	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,230
Ciclo	0,21	0,25		0,002	0,210	0,002	0,001	0,010	0,890	0,000	0,020
DFDNch	-0,41	0,02	-0,15		0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000
DIVch	-0,33	0,34	0,06	0,58		0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000
FDAch	0,29	-0,44	-0,15	-0,34	-0,87		0,000	0,000	0,000	0,720	0,000
FDNch	0,19	-0,42	-0,16	-0,13	-0,83	0,89		0,000	0,000	0,050	0,230
LDAch	0,26	-0,27	-0,13	-0,51	-0,56	0,45	0,28		0,000	0,010	0,000
RMSe	0,30	-0,18	-0,01	-0,30	-0,30	0,29	0,18	0,22		0,000	0,000
RMSch	0,58	0,18	0,30	-0,44	-0,13	-0,02	-0,10	0,13	0,34		0,000
RMSDpc	0,48	-0,06	0,11	-0,40	-0,24	0,18	0,06	0,20	0,91	0,68	

Referencias: Variables analizadas: Altura de planta (ALTp, m), Contenido de azúcares solubles (BRIX, °B), Ciclo desde siembra a R₁ (Ciclo, °C día⁻¹), Digestibilidad de la Fibra (DFDNch, %), Digestibilidad *in vitro* (DIVch, %), Fibra Detergente Ácido (FDAch, %), Fibra Detergente Neutro (FDNch, %), Lignina Detergente Ácido (LDAch, %), Rendimiento en Materia seca de Espiga (RMSe, t ha⁻¹), Rendimiento en Materia seca de Caña+Hojas (RMSch, t ha⁻¹) y Rendimiento en Materia Seca Digestible de la planta completa (RMSDpc, t ha⁻¹).

En la Tabla 15 se puede ver como la ALTp se correlacionó negativamente con las variables de aprovechamiento de la fracción vegetativa (DIVch -0,33 y DFDNch -0,41). Resultados similares fueron encontrados por Méchin et al., (2001) lo cual se asoció a un mayor contenido de FDNch, FDAch y LDAch, todos componentes estructurales de la



planta. Existió una relación positiva y significativa ($p < 0,01$) de ALTp con RMSch (0,58) y en menor medida con RMSe (0,30), esto se relaciona parcialmente con la tendencia del mejoramiento moderno de maíz descrita por Duvick (2005) donde describe la búsqueda de plantas más bajas y con mayor índice de cosecha. Por su lado, ALTp y LDAch presentaron un bajo nivel de asociación, aunque significativo ($p < 0,01$) y positivo (0,26). Estos resultados concuerdan con Barrière et al, (2005) quienes proponen que los genotipos sileros de maíz deben poseer elevada producción de biomasa y baja lignificación, ya que su cosecha se ve anticipada a los materiales graníferos, disminuyendo así el riesgo de V y Q. Contrariamente a lo esperado, la variable Ciclo tampoco se correlacionó marcadamente con ALTp (0,21) y RMSch (0,31). El RMSDpc estuvo más relacionado con el RMSe (0,91) que con RMSch (0,68), esto se asocia con la evolución de los maíces sileros modernos descrita por Lauer et al, (2001) al analizar híbridos de diferentes eras.

Las variables de rendimiento (RMSe, RMSch y RMSDpc) se asociaron negativamente con las de aprovechamiento de la fibra, DIVch (-0,30; -0,13 y -0,24) y DFDNch (-0,30; -0,44 y -0,40), respectivamente (Tabla 15). Según Barrière et al. (2005), estas asociaciones son la consecuencia del mejoramiento para grano, transferido a los genotipos sileros. La DFDNch resultó ser una variable más discriminante que DIVch. Muttoni et al. (2013), resaltan la importancia de estas variables para el desarrollo de genotipos de maíz con características superiores en calidad forrajera para la alimentación de rumiantes, la producción de fibra y biocombustibles.

La LDAch se relacionó negativamente con las variables de aprovechamiento de la fibra (DIVch -0,56 y DFDNch -0,51). Si bien presentó una asociación positiva con las variables de rendimiento, esta fue de escasa magnitud (RMSe: 0,22, RMSch: 0,13 y RMSDpc: 0,20) (Tabla 15).



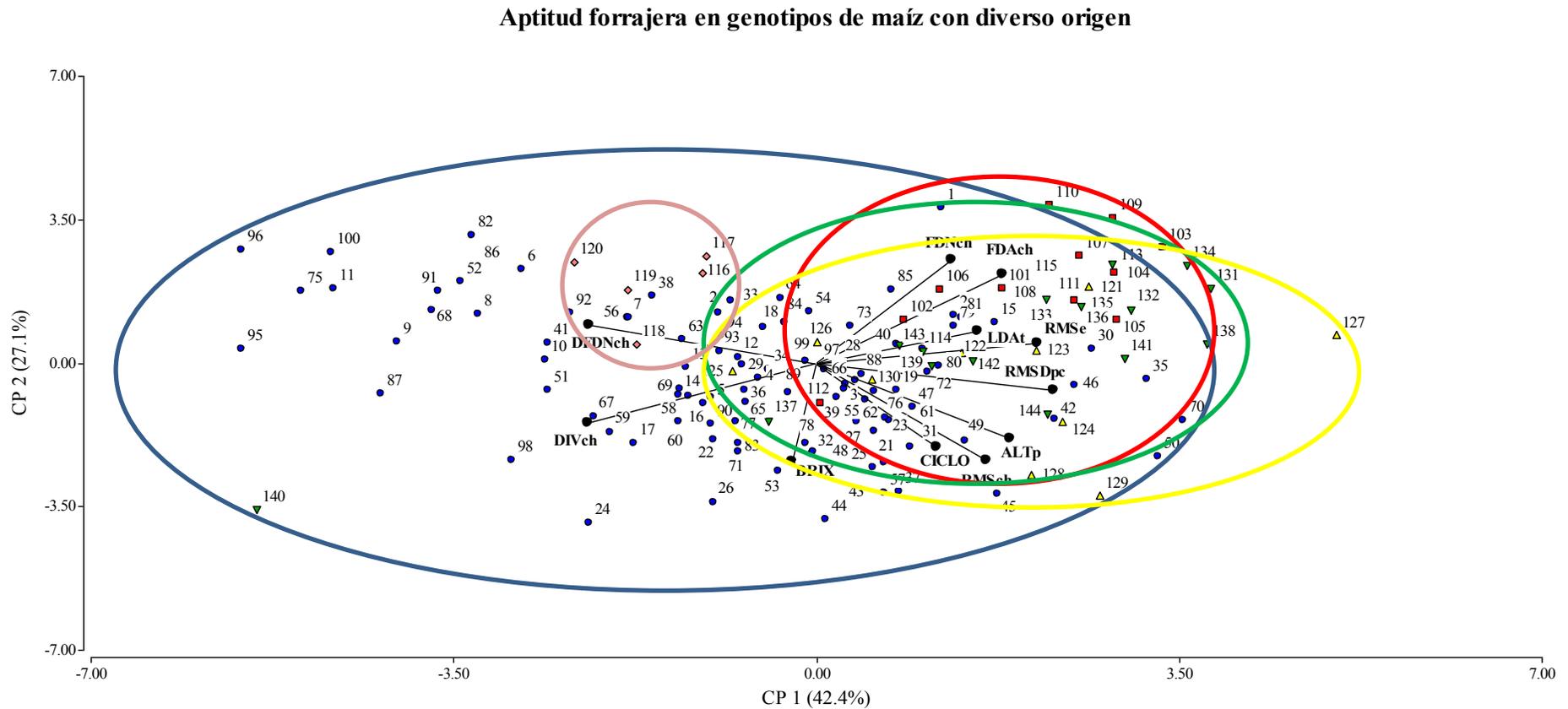
Análisis de componentes principales de la aptitud forrajera en genotipos de maíz.

Tabla 16. Correlaciones con las variables originales de las variables de aptitud forrajera en el estado de madurez de cosecha de silaje.

Variables	CP 1	CP 2
ALTp	0,69	-0,55
BRIX	-0,08	-0,71
Ciclo	0,43	-0,61
DIVch	-0,81	-0,43
DFDNch	-0,81	0,27
FDAch	0,66	0,64
FDNch	0,48	0,74
LDAch	0,57	0,23
RMSch	0,79	0,15
RMSch	0,60	-0,69
RMSDpc	0,84	-0,20
Correlación cofenética: 0,934		



Figura 5. Gráfico bi-dimensional (CP1 vs. CP2): genotipos de maíz agrupados sobre la base de su aptitud forrajera.



Referencias: Poblaciones locales (círculo azul, ●), Híbridos comerciales (círculo rojo ■), Híbridos sileros experimentales (círculo verde ▼), Híbridos precoces franceses (círculo rosa ◆) y Compuestos Sintéticos (círculo amarillo ▲).



Los CP 1 y 2 explicaron el 42,4 y el 27,1 % de la variación total, respectivamente (Figura 5). La correlación cofenética fue elevada (0,934) lo cual nos da un elevado ajuste del modelo. Las variables de mayor peso sobre el CP 1 fueron: RMSDpc (0,84), RMSe (0,79), ALTp (0,69), FDAch (0,66), RMSch (0,60) y LDAch (0,57) con signo positivo. Mientras que con signo negativo fueron: DFDNch (-0,81) y DIVch (-0,81) (Tabla 16). Hacia el cuadrante izquierdo de la Figura 5 quedaron agrupados los genotipos con mayor calidad de la fracción vegetativa, pero con menor producción de biomasa y longitud de ciclo (Poblaciones locales precoces e híbridos precoces franceses). El comportamiento de estos genotipos se corresponde con el descrito por Barrière et al. (2018), quienes remarcan que algunas líneas precoces francesas pueden superar a genotipos BMR en su calidad forrajera. Por otro lado, hacia el cuadrante derecho se ubicaron los genotipos con mayor longitud de ciclo y mayor producción biomasa (Espiga y caña+hojas). Cabe destacar que el componente granífero (RMSe) posee un mayor peso discriminatorio que la fracción vegetativa a la hora de clasificar los genotipos y es más cercana a la variable respuesta RMSDpc. Esto remarcaría la importancia de un elevado índice de espiga al seleccionar genotipos para silaje, sin descuidar el aporte de la biomasa vegetativa.

El grupo que mayor variabilidad presentó fue el de las poblaciones locales, demostrado por distribución casi continua desde el cuadrante izquierdo hacia el derecho (Figura 5). Estos resultados coinciden con varios autores (Hallauer y Sears, 1972; Lundvall et al., 1994; Bertoia et al., 2006; Incognito et al., 2013, 2016) quienes remarcan la importancia del germoplasma nativo como fuente de alelos favorables para múltiples destinos del cultivo de maíz. Recordemos que es función de los Bancos de Germoplasma conservar la diversidad genética, mientras que los programas de mejoramiento buscan tener disponible una variabilidad genética representativa para sus fines de selección en sus colecciones de trabajo. La finalidad de estos últimos es obtener el mejor híbrido que



concentre los mejores genes y sus efectos genéticos favorables en una estructura genética con la menor variabilidad posible para un fin comercial dado.

El CP2 fue explicado en mayor medida por FDNch (0,74) y FDAch (0,64) (Tabla 16) discriminando en el cuadrante superior derecho a los genotipos con mayor contenido de fibra en la biomasa vegetativa y mayor RMSe, representados en su mayoría por los híbridos comerciales (cuadrados rojos). Estos genotipos presentaron mayor producción de espiga, pero a costa de una menor calidad forrajera de la fracción vegetativa (ideotipo granífero). Varios autores (Lauer et al., 2001; Barrière et al., 2005, 2017, 2018) coinciden en que ante una caída en la calidad de la fracción vegetativa sería esperable una menor respuesta en la producción animal. Mientras que en el cuadrante superior izquierdo se agruparon los genotipos más precoces y con mayor calidad forrajera de la fracción vegetativa (Poblaciones locales en azul e híbridos precoces en rosa). Las variables con mayor peso clasificatorio y con signo negativo en el CP2 fueron: BRIX (-0,71), RMSch (-0,69), Ciclo (-0,61) y ALTp (-0,55) (Tabla 16), quedando agrupadas en el cuadrante inferior derecho de la Figura 5 algunas poblaciones locales (círculos azules) y compuestos sintéticos (triángulos amarillos) con elevada producción de biomasa vegetativa y elevado RMSDpc, siendo genotipos propicios para ser utilizados como fuente de nuevas líneas endocriadas para desarrollar híbridos con mejor aptitud para silaje de planta entera.

Análisis de correlación entre las variables de aptitud granífera y bioenergética lignocelulósica en genotipos de maíz en el estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo).

Las variables de rendimiento de grano y rastrojo se asociaron de manera positiva y significativa (0,32, $p < 0,01$) (Tabla 17). Tales resultados coinciden con los de Ertiro et



al. (2013) durante su evaluación de germoplasma de base genética amplia. Esta asociación indica la posibilidad de aumentar ambos rendimientos simultáneamente, resultando de interés al intentar obtener genotipos doble propósito: con buena producción granífera y elevada producción de rastrojo. En este sentido, Dhugga (2007) propone utilizar genotipos de maíz adaptados a regiones tropicales en zonas templadas, para aumentar la biomasa por unidad de superficie, aunque se vería restringido el rendimiento en comparación a genotipos graníferos adaptados.

Tabla 17. Matriz de correlaciones fenotípicas de Pearson (Coeficientes\probabilidades) entre las variables de producción y calidad de biomasa lignocelulósica y producción de grano en genotipos de maíz en el estado de madurez de cosecha de grano.

	ALTp	Ciclo	DFDNr	DIVr	FDAr	FDNr	LDAr	Q	RETP	RG	RMSr	V
ALTp		0,000	0,003	0,000	0,0000	0,000	0,010	0,250	0,000	0,000	0,000	0,060
Ciclo	0,21		0,000	0,040	0,8800	0,080	0,010	0,004	0,000	0,910	0,000	0,090
DFDNr	-0,14	-0,22		0,000	0,0023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
DIVr	-0,38	-0,10	0,55		0,0000	0,000	0,000	0,590	0,000	0,002	0,000	0,240
FDAr	0,34	0,01	-0,15	-0,80		0,000	0,010	0,280	0,000	0,010	0,002	0,490
FDNr	0,17	-0,09	0,22	-0,60	0,80		0,030	0,000	0,000	0,070	0,210	0,870
LDAr	0,13	0,12	-0,51	-0,30	0,13	-0,10		0,001	0,010	0,000	0,000	0,670
Q	-0,06	-0,14	0,24	0,03	0,05	0,18	-0,15		0,050	0,000	0,004	0,370
RETP	0,57	0,18	-0,30	-0,44	0,33	0,17	0,13	-0,09		0,000	0,000	0,210
RG	0,41	0,01	-0,26	-0,15	0,12	-0,09	0,26	-0,36	0,29		0,000	0,000
RMSr	0,54	0,20	-0,36	-0,31	0,15	-0,06	0,19	-0,14	0,97	0,32		0,280
V	-0,09	0,08	-0,12	-0,06	-0,03	-0,01	-0,02	-0,04	0,06	-0,26	0,05	

Referencias: Variables analizadas: Altura de Planta (ALTp, m), Ciclo desde siembra a R₁ (Ciclo, °C día⁻¹), Digestibilidad de la Fibra (DFDNr, %), Digestibilidad *in vitro* (DIVr, %), Fibra Detergente Ácido (FDAr, %), Fibra Detergente Neutro (FDNr, %), Lignina Detergente Ácido (LDAr, %), Quebrado (Q, %), Rendimiento en Etanol Teórico Potencial (RETP, mil l ha⁻¹), Rendimiento de Grano (RG, t ha⁻¹), Rendimiento en Materia seca de Rastrojo (RMSr, t ha⁻¹), Vuelco (V, %).

En cuanto a V y Q existió una relación negativa de ambas con RG (-0,26 y -0,36, respectivamente) (Tabla 17). La asociación evidencia un grado de mejora del germoplasma evaluado para un ideotipo granífero de maíz, con mayor rendimiento de grano y tolerancia a factores bióticos y abióticos. Varios son los autores (Barrière et al.,



2005; Dhugga, 2007; Ertiro et al., 2013) que coinciden con nuestros resultados y plantean que la selección para rendimiento en grano, y resistencia al vuelco y al quebrado del tallo, podrían disminuir la calidad del forraje y como consecuencia, su aptitud potencial para producir bioetanol a partir del rastrojo.

Las variables RMSr, RG y RETP alcanzaron valores de correlación significativos ($p < 0,01$) de -0,36; -0,26 y -0,30 para DFDNr y de -0,31; -0,15 y -0,44 para DIVr, respectivamente (Tabla 17). Las asociaciones entre RETP y las variables de calidad del rastrojo pueden observarse en el Anexo (Relaciones entre el Rendimiento en Etanol Teórico Potencial (RETP) y las principales variables de calidad del rastrojo de maíz). La variable de calidad que logró una asociación más elevada con la variable respuesta RETP fue DIVr (-0,44, $p < 0,001$). Esto pudo deberse principalmente a que la variable RETP se encuentra muy asociada a RMSr (0,97, $p < 0,001$) y, coincidiendo con Lorenz et al., (2009b), y existe una relación inversa entre el rendimiento y la calidad de la biomasa vegetativa (Dhugga, 2007; Lorenz et al., 2009b; Lewis et al., 2010). Por otro lado, se encontró una correlación positiva (0,24, $p < 0,01$) entre DFDNr y Q, aunque no ocurrió lo mismo con el V (-0,12, $p < 0,01$). La LDAr se correlacionó positivamente ($p < 0,01$) con RG y RMSr, (0,26 y 0,19, respectivamente) aunque en menor medida también lo hizo con RETP (0,13, $p < 0,01$), coincidiendo con los resultados de Lorenz et al. (2009b). También se generaron correlaciones negativas entre DIVr y DFDNr con las variables LDAr y FDAr (Tabla 17). Estos resultados coinciden con varios autores (Jung y Casler, 2006; Lorenz et al., 2009b; Barrière et al., 2017), quienes encontraron que la concentración y el tipo de composición de la lignina es el principal factor limitante del aprovechamiento de la celulosa y hemicelulosa en rumiantes. Por otro lado, Ertiro et al. (2013) no encontraron asociaciones significativas entre la calidad del rastrojo y las



variables de rendimiento, indicando la posibilidad de mejorar en ambos sentidos. Weimer et al., (2005) señalan que DIV mide indirectamente el rendimiento de etanol real que podría alcanzarse cuando se utiliza un proceso de SSCF. En este sentido, Dhugga (2007) sugiere mejorar dicha variable como posible estrategia para incrementar el Rendimiento de etanol. Las variables LDA y FDA se asociaron positiva y significativamente con todas las variables de rendimiento (RMSr, RG y RETP) (Tabla 17). Esta relación inversa entre rendimiento y calidad fue descrita por Barrière et al. (2017), quienes plantean la necesidad de disminuir el contenido de lignina para mejorar el aprovechamiento de la fracción vegetativa. Lewis et al, (2010) proponen una selección no solo por RG y RMSr, sino también por calidad de este último.

Análisis de componentes principales de la aptitud granífera y bioenergética lignocelulósica en genotipos de maíz.

Tabla 18. Correlaciones con las variables originales de las variables de aptitud para la producción de grano y biomasa lignocelulósica en el estado de madurez de cosecha de grano (rastrajo).

Variables	CP 1	CP 2
ALTp	0,85	0,02
Ciclo	0,67	0,18
DFDNr	-0,78	0,25
DIVr	-0,67	-0,56
FDAr	0,43	0,75
FDNr	-0,02	0,91
LDAr	0,54	-0,18
Q	-0,40	0,56
RETP	0,80	0,09
RG	0,59	-0,44
RMSr	0,81	-0,09
V	-0,08	0,38
Correlación cofenética (CC): 0,880		



Los CP 1 y 2 explicaron el 37,8 y el 20,7 % de la variación total, respectivamente (Figura 6). La correlación cofenética fue de 0,88, lo cual es un elevado valor de ajuste del modelo. Las variables de mayor peso sobre el CP 1 fueron: ALTp (0,85), RMSr (0,81), RETP (0,80), Ciclo (0,67), RG (0,59) y LDAr (0,54) con signo positivo; mientras que con signo negativo fueron DFDNr (-0,78) y DIVr (-0,67) (Tabla 18). Los genotipos con mayor Ciclo, mayor RG, mayor RMSr y con mayor LDAr, se agruparon hacia el cuadrante derecho, representando a los genotipos con mayor aptitud granífera y para la producción de biomasa lignocelulósica. A la izquierda se agruparon los genotipos más precoces y con mayor calidad y capacidad de conversión de la biomasa en bioetanol. Estos resultados son similares a los encontrados por Torres et al. (2015) quienes describen una relación opuesta entre las variables de calidad y rendimiento de la biomasa lignocelulósica. Nuevamente, al igual que en M1 (Figura 5), cabe destacar el comportamiento de las poblaciones locales que se distribuyen de izquierda a derecha a lo largo del eje CP1 de la Figura 6, demostrando su gran variabilidad genética. Estos resultados son coincidentes con los trabajos de varios autores (Hallauer y Sears, 1972; Bertoia et al., 2006; Incognito et al., 2013, 2016), quienes remarcan el potencial uso de las poblaciones locales como fuente de alelos favorables para la producción de bioetanol.

El CP2 fue explicado en mayor medida por FDNr (0,91), FDAr (0,75) y Q (0,56) (Tabla 18) agrupándose en el cuadrante superior los genotipos con mayor contenido de fibra en la biomasa vegetativa y menor nivel de mejora (círculos azules) (Figura 6). En el cuadrante inferior se ubicaron materiales con menor contenido de fibra, pero con mayor capacidad de conversión en bioetanol (DIVr, -0,56) y mayor RG, (-0,44) (Figura 6). En este cuadrante ocurrió una clara separación, hacia la izquierda, de híbridos comerciales (cuadrados rojos), que compartieron una elevado RG, RMSr y Ciclo, mientras que a la derecha del mismo predominaron los genotipos sin mejora (círculo azul), salvo 5



genotipos con mejora de origen francés y elevada precocidad (rombos rosas) (Figura 6). Lamentablemente la elevada calidad que posee este grupo no puede compensar la escasa producción de biomasa por unidad de superficie. En este sentido, Dhugga (2007) establece que para ser comercialmente viable cualquier mejora en la calidad del rastrojo, debe reflejarse en un aumento de la eficiencia de la producción de etanol por unidad de superficie y no simplemente por unidad de masa seca. Las poblaciones locales se ubicaron a lo largo del eje del CP 1, casi en su totalidad, en el cuadrante superior lo que marca una amplia variabilidad para los caracteres evaluados. Los genotipos con elevado nivel de mejora se ubicaron predominantemente en el cuadrante inferior derecho, predominando los ciclos largos, con elevada producción de grano, elevada producción de biomasa, pero baja calidad de la fibra. Estos resultados concuerdan con otros trabajos (Lauer et al., 2001; Barrière et al., 2005; Incognito et al., 2013), donde se remarca la disminución de la calidad de la fracción vegetativa a través de las eras de selección. Los dos primeros CP explicaron una variación fenotípica media (58,5 %), y determinaron un mayor peso para la clasificación de los genotipos, a las variables asociadas al rendimiento, siguiendo en importancia las variables de calidad de la fracción vegetativa. La variable ALTp fue la que explicó el mayor porcentaje de variabilidad del CP 1, superando a las variables de rendimiento e incluso al Ciclo. Dado que esta variable es de fácil y rápida determinación podría utilizarse en programas de selección indirecta. Este rasgo favorable para híbridos con destino de producción grano + biomasa lignocelulósica, es contrario al buscado en los híbridos graníferos de maíz modernos, donde se priorizan las plantas de menor altura, con mayor índice de cosecha y sembradas a mayores densidades (Duvick, 2005). Dhugga (2007) asume que la selección directa continuará contribuyendo a un aumento del rendimiento de grano y producción de biomasa y quizás logre aumentar el contenido de celulosa de la biomasa del rastrojo.



La variable BRIX tuvo bajo peso clasificatorio en ambos componentes, por lo cual se decidió quitarla del análisis. De esta manera resultó ser poco recomendable su uso como variable predictora de la calidad del rastrojo.

Conclusiones

En el estado de madurez de cosecha para silaje, las variables rendimiento de mayor peso clasificatorio fueron RMSe, Altp y RMSch, junto a las variables de calidad DFDNch y DIVch. Estas podrían ser empleadas en programas de mejoramiento para seleccionar genotipos de maíz con buena aptitud forrajera. Las poblaciones locales presentaron gran variabilidad fenotípica, resultando algunas de interés como fuentes de alelos favorables para la producción de silaje, y que podrían ser incorporados a otros grupos de germoplasma con distinto grado de mejora.

En el estado de madurez de cosecha de grano, las variables de rendimiento de mayor peso clasificatorio fueron Altp, RMSr, Ciclo y RG, junto a las variables de calidad DFDNch y DIVch. Estas podrían ser empleadas en programas de mejoramiento para seleccionar genotipos de maíz con buena aptitud doble propósito para la producción de grano y bioetanol lignocelulósico. Dentro de los genotipos con mejor comportamiento para la producción doble propósito de grano y rastrojo se destacaron híbridos comerciales, híbridos experimentales sileros, compuestos sintéticos y algunas poblaciones locales. Estas poblaciones locales serían una importante fuente de alelos favorables para la producción de biomasa lignocelulósica con calidad bioenergética para ser incorporados a otros grupos con diferente grado de mejora o bien incluirlas en un proceso de selección para la obtención de nuevas líneas endocriadas.



CAPÍTULO IV

Selección de genotipos con aptitud para la producción de grano y bioetanol lignocelulósico mediante índices de selección.



Objetivo

c. Clasificar el germoplasma a través de variables de rendimiento y calidad nutricional de la fracción vegetativa para identificar grupos con diferenciales aptitudes para la producción potencial de etanol celulósico.

Metodología de análisis

Se generaron índices de selección (IS) mediante la metodología suma de rangos propuesto por (Kang, 1993) para seleccionar genotipos con aptitud para producción de grano y bioetanol lignocelulósico. Para cada genotipo se generó un índice (IS) para cada año, utilizando las variables asociadas al rendimiento (RG y RMSr) y a la calidad del rastrojo (FDNr, FDAr, LDAr, DIVr y DFDNr) en el estado de madurez de cosecha de grano (M2). Se utilizaron como pesos económicos las razones CVg/CVe. Esta razón es una medida relativa de la variación genética con respecto a la variación ambiental (Falconer y Mackay, 1996). A las variables V y Q que se les adjudicó un valor arbitrario de -1. El signo negativo indica una disminución sobre el comportamiento agronómico deseado. LDAr se la consideró con signo negativo por ser una variable desfavorable para la producción de bioetanol (Lorenz et al., 2009a).

La selección de los genotipos se realizó a través de la suma total de índices por genotipos (IST), que fue calculada sumando los IS a través de las variables correspondientes a cada año. Los IST de cada genotipo se sumaron a través de los años, constituyendo el Índice de Selección General (ISG). Los genotipos se rankearon en orden decreciente por sus ISG. Luego se seleccionaron como superiores a aquellos genotipos con valores medios ajustados (VAj) mayores al promedio de los testigos + 1 DMS (diferencia mínima significativa) (Kang, 1993; Cotes y Núñez, 2001). Se decidió seleccionar el 20% superior de los genotipos con mayor índice debido a la incapacidad



de manejar mayor cantidad de germoplasma en programas de selección. A continuación, se graficaron los desvíos estándar de los IS de los 30 genotipos, para analizar gráficamente la estabilidad de los mismos. La ecuación para calcular el desvío estándar fue la siguiente:

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})}}{N - 1}$$

Donde xi son los valores observados de los elementos de la muestra,

\bar{x} es el valor medio de estas observaciones,

N es el número de observaciones de la muestra.

Luego se aplicó el método de la Ecovalencia de Wricke (1962) para evaluar la estabilidad agronómica de los índices a través de los ambientes (años). La ecovalencia mide la contribución de un genotipo i al total de la suma de cuadrados de la interacción $G \times E$, el genotipo con $Wi=0$ será el más estable a través de los años.

$$Wi = \sum_j (Xij - \frac{Xi}{q} - \frac{Xj}{p} + \frac{X...}{pq})^2$$

Donde: Wi : valor de i -ésimo genotipo.

Xij : media del i -ésimo genotipo en el j -ésimo ambiente.

Xi : suma del valor del genotipo i -ésimo en todos los ambientes.

Xj : suma del valor de todos los genotipos en el j -ésimo ambiente.

q : número de ambientes.

p : número de genotipos.

$X.../pq$: media general



Resultados y Discusión

Índices de selección de suma de rangos para la selección de genotipos doble propósito (grano y etanol lignocelulósico).

Al analizar la relación entre IS y RETP, encontramos una correlación positiva y significativa entre ambas ($r: 0,43, p < 0,01$), lo que indica que los índices IS podrían servir como una herramienta útil para seleccionar material con buena capacidad energética. Lewis et al. (2010) también utiliza índices de selección de rangos múltiples para el rendimiento de grano, rasgos agronómicos y de calidad del tallo para la selección de líneas en programas de mejoramiento. Cabe destacar que el RETP es una variable compuesta que proviene de la combinación de RMSr, LDAr, FDAr y FDNr, pero no tiene en cuenta las variables de rendimiento de grano, ni de calidad (DIVr y DFDNr) o de otras variables de interés agronómico (V y Q), que sí fueron utilizadas para el cálculo del índice de suma rangos (IS). Esta podría ser la razón del valor medio de la correlación encontrado, aunque fue significativo. Podemos confirmar, por lo tanto, que IS sería el mejor índice para identificar genotipos con un doble propósito: una buena capacidad potencial para el rendimiento de grano y etanol. Coincidiendo con nuestros resultados, Lewis et al. (2010) sugirieron que la calidad del rastrojo debe ser un objetivo de selección para materiales doble propósito (grano y biomasa lignocelulósica) y también propusieron el uso de un índice de selección para tal fin.



Tabla 19. Ranking de 30 Genotipos selectos mediante el índice de suma de rangos (IS1 (2012), IS2 (2013) y IS3 (2014)) y suma de rangos total (IST).

Rank (#)	Genotipo	Características/Obtendor	IS1	IS2	IS3	IST
1	HES 5	Híbrido Exp. Silaje/DAS	1434	923	1128	3485
2	HES 4	Híbrido Exp. Silaje/DAS	843	1001	1393	3236
3	CS Tropical 3	Compuesto Sintético Tropical/DAS	1130	1089	979	3198
4	ARZM03003	CAMELIA / INTA	1064	893	1148	3104
5	ARZM14063	CRISTALINO COLORADO Y DENTADO/INTA	1073	1073	958	3104
6	CS BMR	Compuesto Sintético BMR/DAS	921	735	1416	3071
7	HES 6	Híbrido Exp. Silaje/DAS	948	958	1152	3058
8	CS Silaje 2	Compuesto Sintético Silaje/DAS	999	870	1176	3045
9	HES 14	Híbrido Exp. Silaje/DAS	982	937	1095	3014
10	CS Silaje 3	Compuesto Sintético Silaje/DAS	895	833	1242	2971
11	CS Silaje 4	Compuesto Sintético Silaje/DAS	1000	775	1192	2966
12	CS Tropical 2	Compuesto Sintético Tropical/DAS	922	1068	950	2940
13	SY 900 VIPTERA	Híbrido Comercial/SYNGENTA	1032	797	1072	2901
14	CS Tropical 4	Compuesto Sintético Tropical/DAS	1088	941	872	2901
15	ARZM17008	CRISTALINO COLORADO/INTA	1063	759	1075	2898
16	CS Tropical 1	Compuesto Sintético Tropical/DAS	904	856	1130	2889
17	ARZM04011	NO CLASIFICABLE / INTA	896	735	1213	2843
18	DK 747 VT3P	Híbrido Comercial/ MONSANTO	806	951	1059	2817
19	HES 7	Híbrido Exp. Silaje/DAS	937	831	1033	2802
20	ARZM17035	CRISTALINO COLORADO/INTA	1162	703	915	2780
21	ARZM06051	CRISTALINO COLORADO/INTA	926	929	917	2772
22	CS Grano	Compuesto Sintético Grano/DAS	798	891	1047	2736
23	ARZM18022	NO CLASIFICABLE/INTA	936	735	1062	2733
24	ARZM03026	CALCHAQUI/INTA	1083	469	1175	2727
25	CS Silaje 1	Compuesto Sintético Silaje/DAS	875	805	1043	2724
26	ARZM17029	CRISTALINO COLORADO / INTA	1101	824	796	2721
27	PAN 5E-203	Híbrido Comercial/PANNAR	900	733	1078	2711

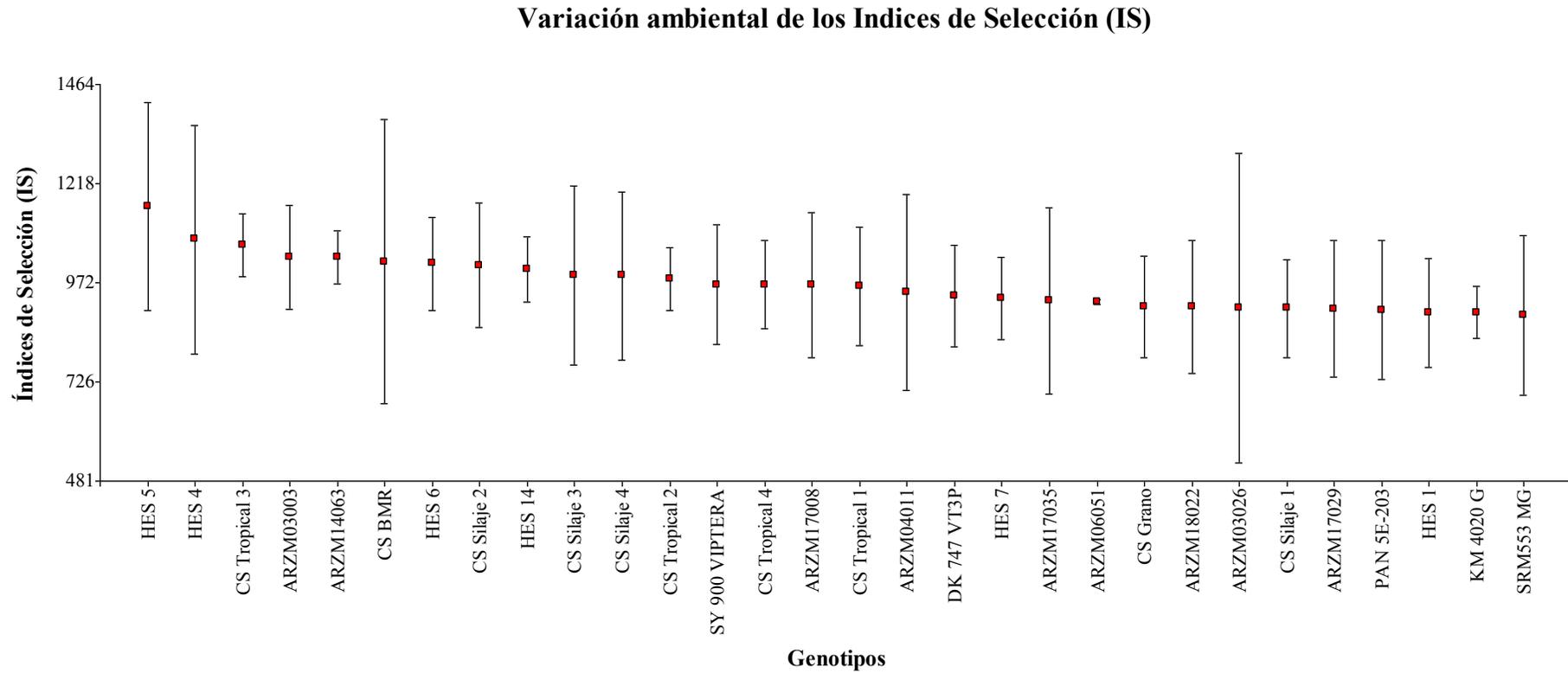


28	HES 1	Híbrido Exp. Silaje/DAS	817	1054	824	2694
29	KM 4020 G	Híbrido Comercial/KWS	855	972	867	2694
30	SRM553 MG	Híbrido Comercial/SURSEM	1005	662	1003	2670

Un ranking de genotipos fue conformado utilizando en forma creciente los índices de rango calculados para cada año y el índice de rango total. Posteriormente al cálculo de los índices, se seleccionó el 20 % de un total de 144 accesiones. Los rankings de este porcentaje de genotipos fueron presentados en la Tabla 19. Luego de aplicar los índices de selección, se seleccionó el 20 % de un total de 144 accesiones. Los genotipos seleccionados incluyeron: 9 variedades locales, 10 compuestos de maíz, 6 híbridos experimentales de ensilaje y 5 híbridos comerciales de doble propósito (grano y forraje). Algunos genotipos que ocupaban las primeras posiciones en el *Rank* (#), como en el caso de HES 5 (#1), HES 4 (#2) y CS BMR (#6), también presentaron elevados desvíos estándar al igual que ARZM03026 (#24). Es por esa razón que se procedió a aplicar el método de Wricke para determinar cuáles son los genotipos con mayor estabilidad agronómica (Wricke, 1962) (Figura 8).

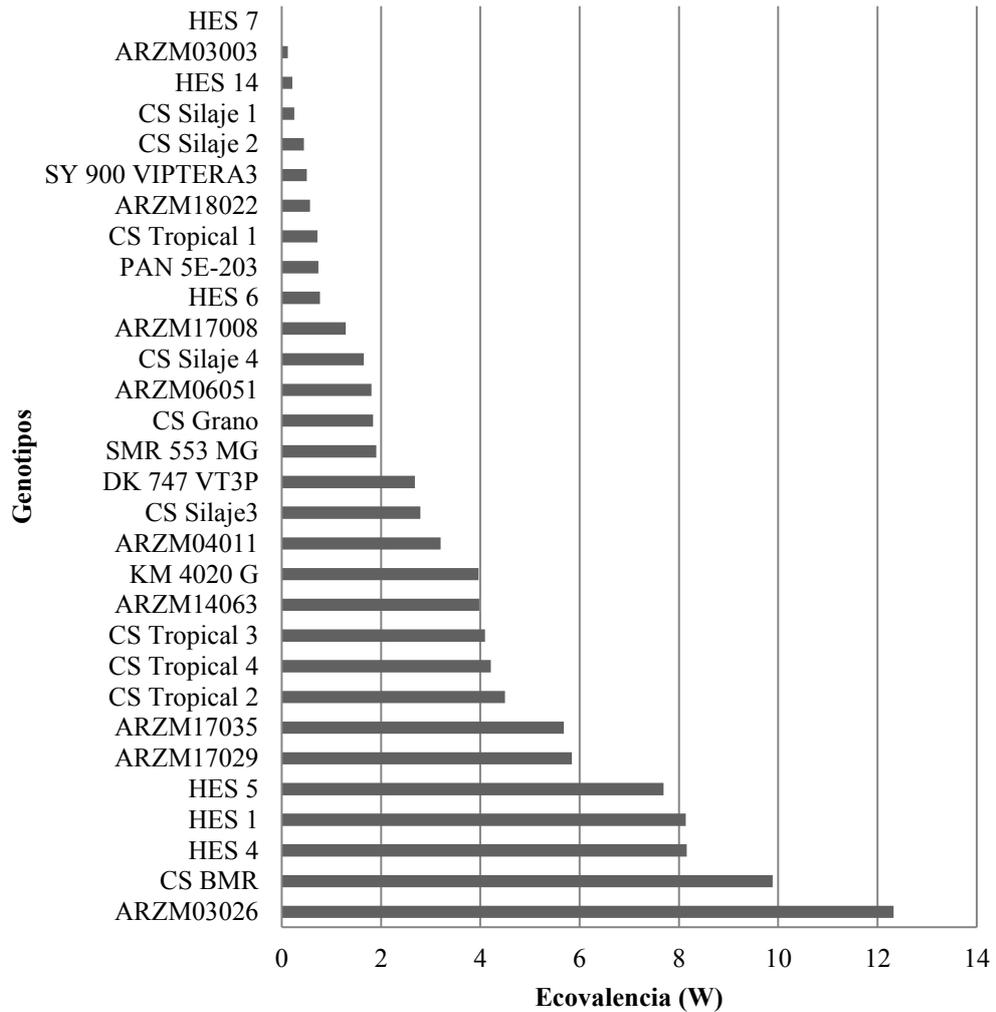


Figura 7. Variación ambiental de los Índices de Selección de los genotipos selectos representado por sus medias y desvío estándar.



Estimación de la estabilidad de los genotipos de maíz seleccionados con aptitud doble propósito.

Figura 8. Estabilidad Agronómica para la selección de genotipos con aptitud doble propósito (grano y biomasa lignocelulósica).



Luego de realizar el análisis de estabilidad agronómica (Figura 8), se seleccionaron los diez genotipos con menor ecovalencia ($W = 0,01$ a $0,77$) (Tabla 20): 3 híbridos experimentales de ensilaje (HES 7, HES 14, HES 6), 2 híbridos comerciales (SY 900 VIPTERA, PAN 5E-203), 3 Compuestos Sintéticos (CS Silaje 1, CS Silaje 2, CS Tropical 1) y 2 Poblaciones Locales (ARZM03003, ARZM18022).

Tabla 20. Valores medios de los genotipos seleccionados para las variables de Rendimiento y calidad en el estado de madurez de cosecha de grano (rastrajo).

Variable	ARZM03003	ARZM18022	PAN 5E-203	SY 900 VIPTERA	CS Silaje 1	CS Silaje 2	CS Tropical 1	HES 6	HES 7	HES 14
Altp	2,29	1,81	2,02	1,91	1,99	2,11	2,15	2,02	1,96	2,03
Ciclo	1049,4	907,94	1007,4	1043,1	1209,9	1145,8	1219,0	1141,0	996,68	1042,3
DFDNr	34,38	37,36	28,58	30,94	28,47	30,97	32,31	30,56	30,06	28,46
DIVr	44,47	46,44	46,30	44,64	46,02	42,97	47,41	45,22	48,00	46,56
FDAr	39,58	40,07	38,02	40,56	37,56	40,80	34,90	39,92	35,68	36,60
FDNr	76,81	78,30	72,70	78,10	70,72	76,34	69,24	74,89	70,12	70,75
LDAr	6,83	5,00	6,20	6,24	5,91	5,87	5,66	6,50	6,07	6,66
RG	9,35	7,17	12,10	11,94	13,18	11,95	11,61	11,74	13,82	14,52
RMSRr	11,19	6,12	9,70	7,62	9,24	7,47	10,40	7,84	9,11	10,22
RETP	4,09	2,36	3,33	2,87	3,12	2,70	3,46	2,74	3,02	3,39
Q	17,04	25,10	1,99	0,00	2,11	2,11	2,55	0,00	12,18	2,66
V	25,38	9,18	0,67	0,67	0,67	0,67	0,21	3,21	0,67	5,12

Referencias: Variables analizadas: Altura de Planta (Altp, m), Ciclo desde siembra a R₁ (Ciclo, °C día⁻¹), Digestibilidad de la Fibra (DFDNr, %), Digestibilidad *in vitro* (DIVr, %), Fibra Detergente Ácido (FDAr, %), Fibra Detergente Neutro (FDNr, %), Lignina Detergente Ácido (LDAr, %), Rendimiento de Grano (RG, t ha⁻¹), Rendimiento en Materia seca de Rastrajo (RMSr, t ha⁻¹), Rendimiento en Etanol Teórico Potencial (RETP, mil l ha⁻¹), Quebrado (Q, %), Vuelco (V, %).



El 20% de los genotipos seleccionados mostró baja ecovalencia, lo que indicaría una respuesta constante a los cambios ambientales, manteniendo las mismas posiciones relativas en las clasificaciones. Kang, (1993) propuso que un mayor énfasis de los investigadores sobre el componente de estabilidad durante el proceso de selección sería beneficioso para los productores. Disminuiría la probabilidad de errores de tipo II, cuando un genotipo inestable no se penaliza por inestabilidad. Los híbridos comerciales, que se destacaron en el *Rank* (#) por su elevado RG, RETP, buen comportamiento agronómico y estabilidad fueron: SY 900 VIPTERA (#13) y PAN 5E-203 (#27) (Tabla 19). Con similares características se encuentra los compuestos sintéticos CS Silaje 2 (#8), CS Tropical 1 (#16) y CS Silaje 1 (#25). Dentro del grupo de los híbridos experimentales para silaje, se destacaron HES 6 (#7), HES 14 (#9) y HES 7 (#19). Estos materiales de nueva generación podrían ser compatibles con una utilización forrajera, granífera y bioenergética. Es necesario señalar que dos de las poblaciones locales, ARZM03003 (#4) y ARZM18022 (#22) también mostraron buen desempeño y estabilidad, aunque su rendimiento en grano y desempeño agronómico (V y Q) fueron menores que el resto de los genotipos seleccionados (Tabla 20). Cabe destacar que estas poblaciones presentaron elevada estabilidad y elevados IST, destacándose sobre otros genotipos selectos. Otros autores (Hallauer y Sears, 1972; Holland et al., 1996; Bertoia et al., 2006) también remarcaron la importancia de incorporar germoplasma no adaptativo o exótico como fuente de alelos favorables, aunque su rendimiento en grano es más bajo y su comportamiento agronómico es deficiente. Lee et al. (2003) también encontraron poblaciones con estabilidad fenotípica para el rendimiento de grano, por ser este un carácter altamente heredable y en consecuencia predecible.

La introducción de recursos genéticos en los programas de mejoramiento genético es una tarea larga y laboriosa que a menudo ha sido desalentadora para los mejoradores



de maíz. La relación entre RETP y las variables de calidad de rastrojo para los 10 genotipos selectos puede verse en el Anexo (Figura 16, Figura 17, Figura 18, Figura 19 y Figura 20).

Conclusiones

La utilización de índices de selección de rangos múltiples resultó ser una herramienta útil y válida para la selección de germoplasma con altos niveles de RETP, sin omitir la producción de grano y los rasgos agronómicos. La utilización de la razón CVg/CVe como unidad de peso para la conformación los índices de selección, permitió ponderar el peso genético sobre el ambiental.

Algunos híbridos experimentales sileros de nueva generación (HES 6, HES 7 y HES 14), podrían ser compatibles con una utilización forrajera, granífera y bioenergética.

Algunas poblaciones locales (ARZM03003 y ARZM18022) presentan características similares a los híbridos modernos y compuestos sintéticos, pudiendo ser empleados como fuente de alelos favorables para la generación de nuevos genotipos con aptitud doble propósito (grano y biomasa lignocelulósica).

De este capítulo se desprende la siguiente publicación: **García Stepien L.E., M.B. Aulicino, J.L. Danelón y L.M. Bertoia. 2019. Genetic resources of maize (*Zea mays* L.): double purpose hybrids to generate grain and lignocellulosic biomass. *Maydica*. Vol 64 N° 1 pag. 1-9.**



CAPÍTULO V

Variaciones Cual-Cuantitativas en la fracción vegetativa de genotipos de maíz con distinto origen genético en dos estados de madurez de cosecha distintos (silaje y grano).



Objetivo

d. Evaluar las variaciones cuali-cuantitativas que sufre la fracción vegetativa de maíz al pasar del estado de madurez de cosecha para silaje al de grano, y su aptitud para la producción potencial de bioetanol lignocelulósico.

Metodología de análisis de los datos

Se aplicaron técnicas multivariadas con el objeto de analizar el comportamiento de los grupos de genotipos con patrones diferenciales asociados a las variables cuali-cuantitativas de la fracción vegetativa de los genotipos de maíz. Se tomó un subconjunto de rasgos medios descritos en el Capítulo I.

Cosecha en el estado de madurez de cosecha de Silaje (M1):

1. Rendimiento en Materia Seca de Caña+Hojas ($t\ ha^{-1}$), RMSch.
2. Digestibilidad in vitro de la Materia Seca de Caña+Hojas (%), DIVch.
3. Fibra Detergente neutro de Caña+Hojas (%), FDNch.
4. Fibra Detergente ácido de Caña+Hojas (%), FDAch.
5. Lignina Detergente ácido de Caña+Hojas (%), LDAch.
6. Digestibilidad de la Fibra de Caña+Hojas (%), FDNDch.

Cosecha en el estado de madurez de cosecha de grano (rastrajo) (M2):

1. Rendimiento en Materia Seca del Rastrojo ($t\ ha^{-1}$), RMSr.
2. Digestibilidad in Vitro de la Materia Seca del Rastrojo (%), DIVr.
3. Fibra Detergente Neutro del Rastrojo (%), FDNr.
4. Fibra Detergente Ácido del Rastrojo (%), FDAr.
5. Lignina Detergente Ácido del Rastrojo (%), LDAr.
6. Digestibilidad de la Fibra del Rastrojo (%), DFDNr.

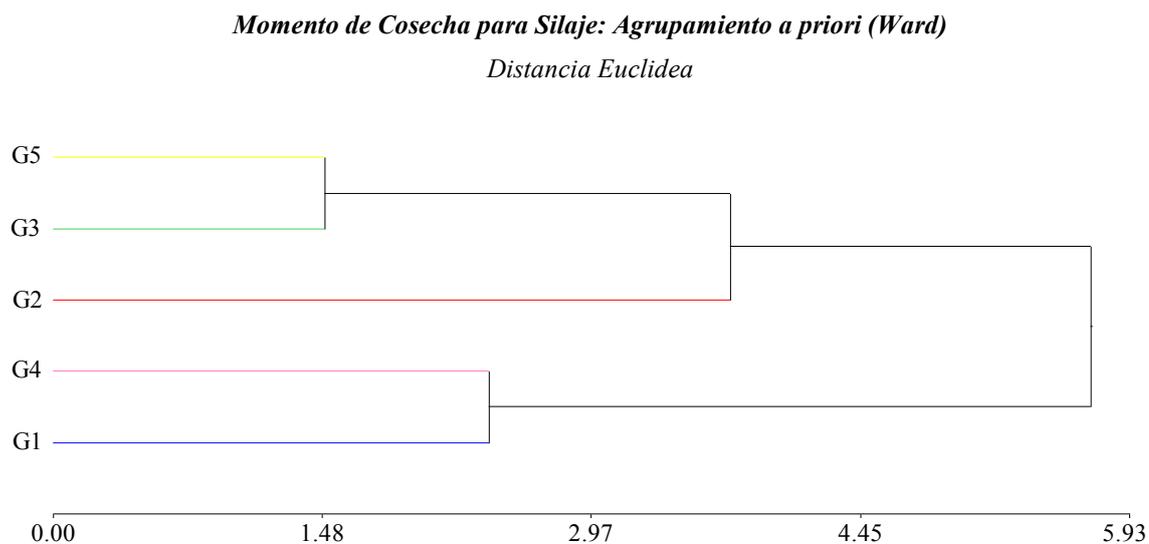


Los materiales se agruparon *a priori* en función del nivel de mejora que poseen, utilizando 5 clases: G1: Poblaciones locales, G2: Híbridos comerciales, G3: Híbridos sileros experimentales, G4: Híbridos precoces franceses y G5: Compuestos sintéticos. A los grupos se les aplicó un análisis de conglomerados (Sneath y Sokal, 1973) para los dos estados de madurez de cosecha por separado, M1 y M2, con el objeto de determinar la estructura de los grupos y las interrelaciones entre ellos en cada estado de madurez de cosecha. Posteriormente se realizó un análisis de varianza de los conglomerados para detectar diferencias significativas entre los mismos, los años fueron utilizados como repeticiones y no se analizó su efecto por separado. Se realizó un test de Diferencias Mínimas Significativas al 5% para detectar grupos homogéneos. Todos los análisis se realizaron con el software InfoStat versión 2011 (Di Rienzo et al., 2011).

Resultados y Discusión

Análisis de conglomerados *a priori* para estado de madurez de cosecha para silaje.

Figura 9. Fenograma del análisis de conglomerados *a priori* para las variables de calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje.



Referencias: Conglomerados *a priori*: G1: Poblaciones locales, G2: Híbridos comerciales, G3: Híbridos sileros experimentales, G4: Híbridos precoces franceses y G5: Compuestos Sintéticos.



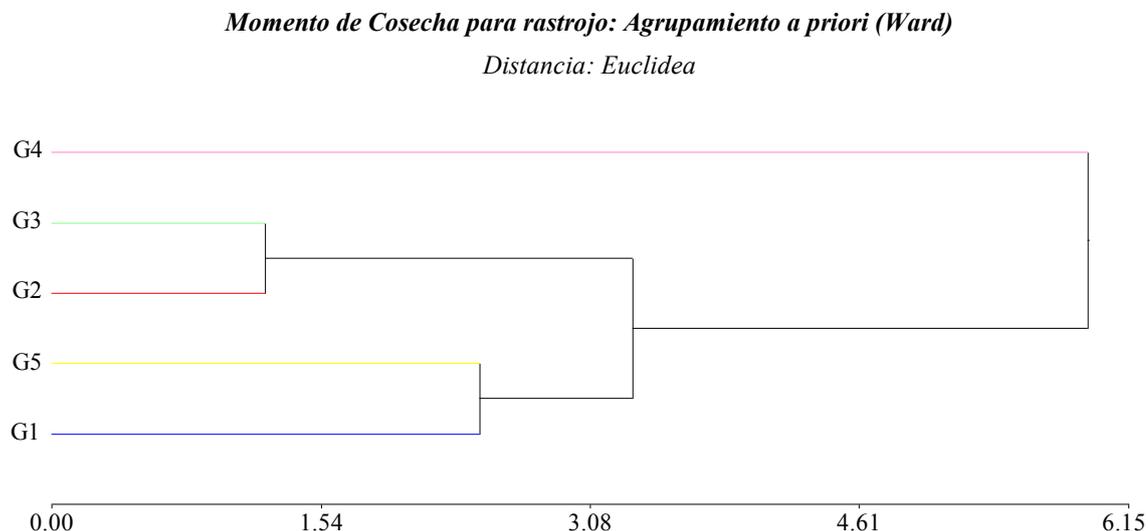
Se realizó un análisis de los conglomerados a los grupos de genotipos formados *a priori* en el estado de madurez de cosecha de silaje utilizando una distancia Euclídea y el método de agrupamiento de Ward y lo que permitió una mejor discriminación entre los grupos. La correlación cofenética fue de 0,77, lo que indicó un buen ajuste del modelo.

Al analizar la Figura 9, el fenograma del agrupamiento de los conglomerados *a priori* en M1, podemos ver la formación de 4 agrupamientos que difieren significativamente ($p < 0,01$) (Anexo). El primer agrupamiento lo componen los compuestos sintéticos y los híbridos experimentales de maíz (G5 y G3, respectivamente). Esto podría explicarse debido a que muchos de los componentes del G3 derivan de genotipos del grupo G5. Por otro lado, también hay una expresa cercanía entre los grupos de poblaciones locales (G1) y los híbridos precoces franceses (G4), aunque estos grupos se diferencian significativamente ($p < 0,01$). Estos dos grupos presentaron los mayores valores de calidad forrajera, pero son muy contrastantes en rendimiento (Anexo). Los híbridos comerciales (G2), presentan mayor cercanía a la primera agrupación, lo cual era esperable por su cercanía en el grado de mejora. No obstante, mantuvieron diferencias notorias de calidad: menor DIV y mayores valores de FDA y FDN (Tabla 21), debido a su objetivo original de selección granífera. Estos comportamientos entre grupos, son similares a los descritos por Barrière et al., (2005) al analizar híbridos forrajeros de distintas eras en Europa.



Análisis de conglomerados a priori para estado de madurez de cosecha de grano.

Figura 10. Fenograma del análisis de conglomerados *a priori* para las variables de calidad forrajera en el estado de madurez de cosecha de grano



Referencias: Conglomerados *a priori*: G1: Poblaciones locales, G2: Híbridos comerciales, G3: Híbridos sileros experimentales, G4: Híbridos precoces franceses y G5: Compuestos Sintéticos.

En el estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo), también se utilizaron la distancia Euclidea y el método de Ward, para realizar el análisis de conglomerados de los grupos de genotipos *a priori*. La correlación cofenética fue más elevada que en M1, alcanzando un valor de 0,95, lo cual refiere a un mejor ajuste del modelo. Desde el punto de vista biológico también demuestra una disminución en la variación intrínseca de los grupos. De esta forma, en el fenograma de los conglomerados de la Figura 10, se evidencian también 3 agrupamientos que difieren significativamente (Anexo). Esta situación es similar al caso de M1, pero con una configuración distinta debido al cambio que sufrieron las variables de calidad en M2, ya que no fueron proporcionales en todos los grupos (Tabla 21). Esto nos indica que hay grupos de genotipos más aptos para un doble propósito de selección, silero y granífero-bioenergético, y otros que sólo responden



a un solo objetivo. El primer agrupamiento está conformado por G2 y G3 (Híbridos comerciales y sileros experimentales, respectivamente) (Figura 10). El segundo, se conformó por G1 y G5, mientras que G4 quedó totalmente aislado del resto, posiblemente por poseer los mejores parámetros de calidad del rastrojo y la menor producción de biomasa.

Análisis de varianza de los conglomerados a priori en ambos estados de madurez de cosecha (Silaje y Rastrojo) para las variables de rendimiento y calidad de la fracción vegetativa.

Tabla 21. Comparación de medias de las variables de rendimiento y de calidad de la fracción vegetativa del maíz en dos estados de madurez de cosecha (Silaje y grano).

Conglomerado	Silaje (M1)											
	RMS	LDA	FDA	FDN	DIV	DFDN						
G1: Poblaciones locales	9,44	B	5,18	A	32,86	A	63,30	A	53,68	C	36,39	B
G2: Híbridos Comerciales	8,41	B	5,41	AB	35,57	C	67,80	B	50,21	A	34,55	AB
G3: Híbridos Sileros Experimentales	9,73	B	5,71	B	34,03	B	64,69	A	51,62	AB	34,13	A
G4: Híbridos precoces	5,30	A	5,36	AB	33,69	AB	64,37	A	53,54	BC	36,98	B
G5: Compuestos Sintéticos	11,13	C	5,48	AB	33,89	B	64,62	A	52,32	BC	34,36	AB

Conglomerado	Grano (M2)											
	RMS	LDA	FDA	FDN	DIV	DFDN						
G1: Poblaciones locales	8,89	B	5,76	A	37,09	B	73,09	C	47,15	A	33,18	B
G2: Híbridos Comerciales	8,83	B	6,03	AB	37,04	B	70,58	AB	47,55	AB	29,38	A
G3: Híbridos Sileros Experimentales	8,72	B	6,41	B	36,40	B	69,81	A	47,59	AB	29,32	A
G4: Híbridos precoces	6,02	A	5,51	A	33,53	A	68,84	A	49,40	B	32,80	AB
G5: Compuestos Sintéticos	9,80	B	6,21	B	37,77	B	72,28	BC	45,87	A	30,16	A

Referencias: Rendimiento en Materia Seca (RMS, t ha⁻¹), Lignina Detergente Ácido (LDA, %), Fibra Detergente Ácido (FDA, %), Fibra Detergente Neutro (FDN, %), Digestibilidad *in vitro* (DIV, %) y Digestibilidad de la Fibra (DFDN, %). Letras iguales dentro de las columnas indican grupos homogéneos (DMS 0,05).

En el ANVA entre los conglomerados en ambos estados de madurez de cosecha por separado, se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) para todas las variables



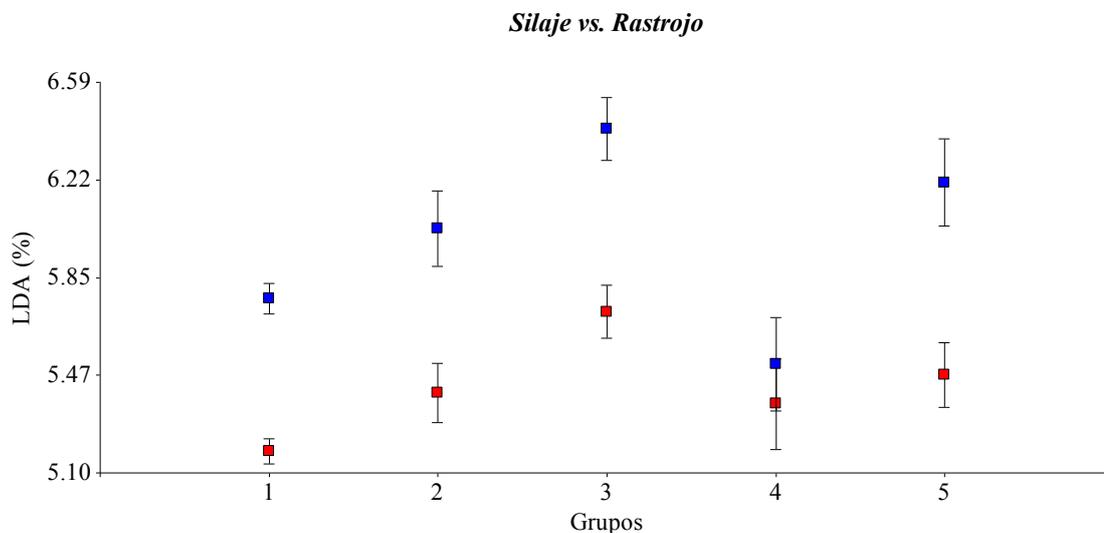
de estudio (Tabla 21). Al analizar el comportamiento de los grupos en ambos estados de madurez, podemos apreciar que en el rendimiento de la fracción vegetativa los compuestos sintéticos aventajan ampliamente a los otros grupos, posiblemente por contener en su composición genotipos tropicales y sileros de gran porte. Luego, es seguido por las poblaciones locales (recordemos que es el grupo más heterogéneo en cuanto a longitud de ciclo y altura de planta), los híbridos sileros experimentales y los comerciales (ambos grupos muy similares. Por último, y muy distantes, los híbridos precoces franceses, de escaso porte.

Comparación de ambos estados de madurez de cosecha para las variables de calidad de la fracción vegetativa.

Al analizar el comportamiento general de los genotipos, independientemente del grupo, podemos apreciar que al avanzar la madurez de la planta se produjo una disminución en la calidad de la fracción vegetativa, reflejándose en un aumento de LDA, FDA y FDN y una consecuente disminución de DIV y DFDN (Figura 11, Figura 12, Figura 13, Figura 14 y Figura 15). Este comportamiento coincidió con lo descripto por diversos autores (Darby y Lauer, 2002; Kruse et al., 2008; Arriola et al., 2012) cuando analizan los efectos de un retraso en momento de picado de materiales para silaje. Recordemos que todos los maíces, independiente del grado de mejora y de las condiciones ambientales, al avanzar el proceso de senescencia de la estructura vegetativa y la madurez la espiga, ésta se transforma en el destino dominante de la translocación de azúcares en mayor o menor grado del tallo (Tollenaar et al., 1997; Valentinuz y Tollenaar, 2004; Subedi y Ma, 2005).



Figura 11. Valores medios de LDA \pm error estándar para cada grupo *a priori* de genotipos de maíz en dos estados de madurez de cosecha, silaje vs. grano (rastrajo).



Referencias: Estado de madurez de cosecha para silaje (cuadrados rojos ■) y rastrajo (cuadrados azules, ■), promedios sobre años (2013, 2014 y 2015). Los genotipos se agruparon en: 1: Poblaciones locales, 2: Híbridos comerciales, 3: Híbridos sileros experimentales, 4: Híbridos precoces franceses y 5: Compuestos Sintéticos.

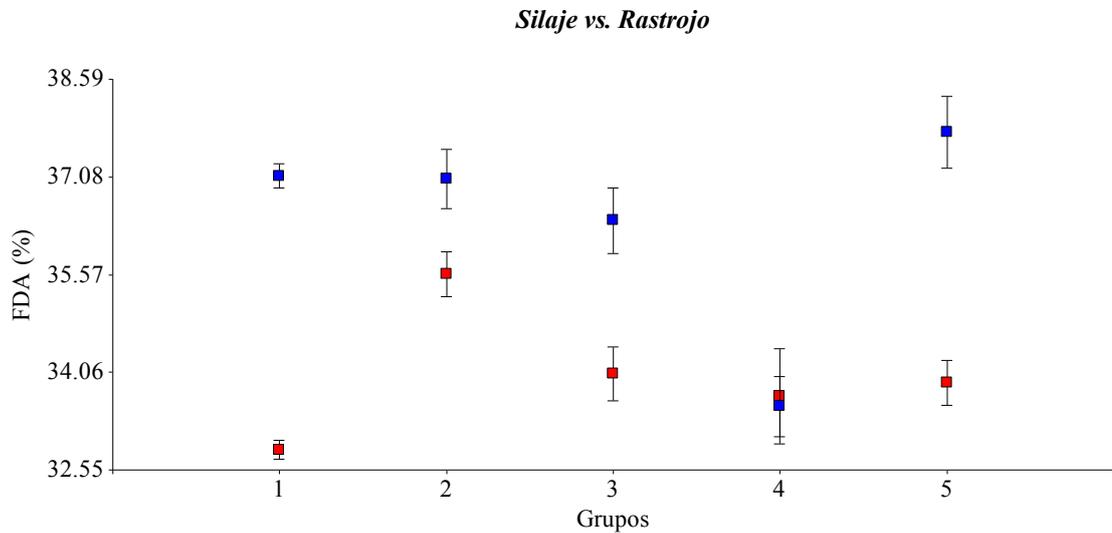
En todos los casos LDA fue mayor en M2 que en M1 (Figura 11), estos resultados coinciden con los de Zeng et al., (2014) quienes describen que durante la fase de crecimiento reproductivo del maíz, la lignina aumenta constantemente hasta la senescencia de la planta, mientras que la biomasa experimenta una leve caída y luego permanece constante. Por otro lado, Jung (2003) observó que la lignina del tallo se incrementa durante el período de elongación de los entrenudos, para luego disminuir su ritmo de acumulación. A su vez este proceso presenta una relación positiva entre la temperatura (Jung et al., 1998; Jung, 2003). En la Tabla 21, se aprecia que los grupos que presentaron menor contenido de lignina en ambos estados de madurez fueron G1 y G4, siendo este último el que presentó menor diferencias entre las medias obtenidas en M1 y M2. En general, los híbridos precoces (ciclo corto) poseen baja Altp y bajo RMS, por lo tanto, no necesitan un aumento elevado de la lignina durante el desarrollo vegetativo, necesario para sostener la planta y la espiga en el tiempo. Consecuentemente mantienen

altos valores de digestibilidad, posiblemente por la asociación negativa, controlada genéticamente, entre lignina y digestibilidad. Barrière et al., (2018) plantean que los híbridos de maíz para silaje registrados en Francia desde hace 20 años presentan, un elevado rendimiento, alta estabilidad, con valores nutricionales similares a los de los híbridos de finales de 1970 y principios de 1980.

Los híbridos experimentales sileros (G3), constituyeron el grupo que presentó mayores valores de LDA, siendo un carácter indeseable para su objetivo de selección. Esto pudo deberse a que los genotipos que conforman este grupo se originaron a partir de germoplasma tropical. Dentro de los componentes de la pared celular, la lignina juega un papel fundamental para la resistencia de plagas y enfermedades (Santiago et al., 2013). Comparado con el germoplasma templado, los genotipos tropicales suelen ser más altos, tienen mayor área foliar, tallos más gruesos y mayor producción de biomasa aparejado de una mayor estructura de sostén y una menor partición a grano (Giaveno y Ferrero, 2003; Muttoni et al., 2013; Infante et al., 2018).



Figura 12. Valores medios de FDA \pm error estándar para cada grupo *a priori* de genotipos de maíz en dos estados de madurez de cosecha, silaje vs. grano (rastrojo).

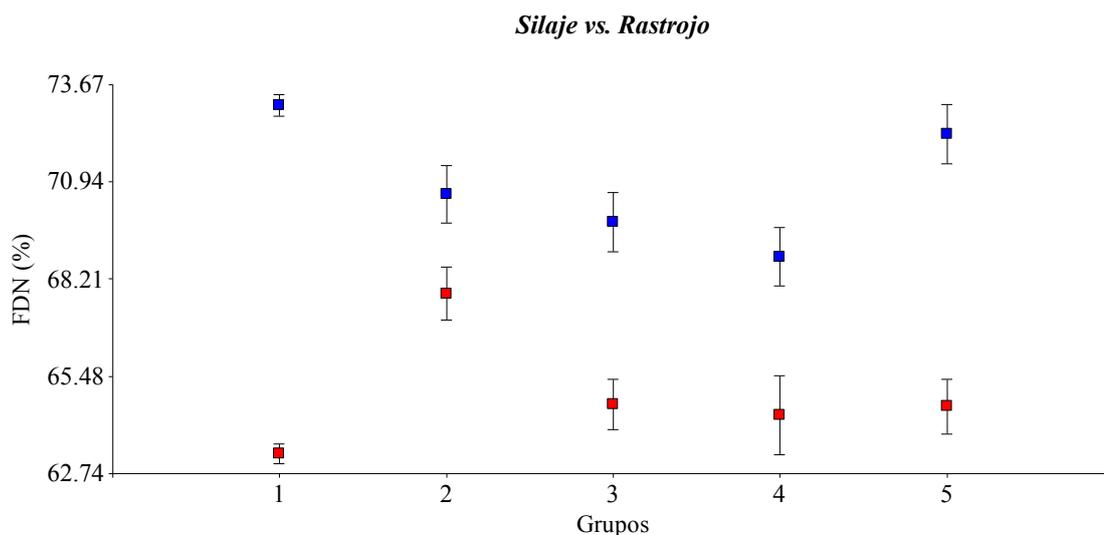


Referencias: Estado de madurez de cosecha para silaje (cuadrados rojos ■) y rastrojo (cuadrados azules, ■) sobre años (2013, 2014 y 2015). Los genotipos se agruparon en: 1: Poblaciones locales, 2: Híbridos comerciales, 3: Híbridos sileros experimentales, 4: Híbridos precoces franceses y 5: Compuestos Sintéticos.

El contenido de FDA fue mayor en M2 que en M1 (Figura 12), esto coincide con varios autores (Lewis et al., 2004; Darby y Lauer, 2002; Hansey et al., 2010) quienes asocian su incremento a los procesos de senectud que sufre la planta durante el llenado de granos. Recordemos que la FDA representa el contenido de celulosa + lignina + sílice de la célula vegetal (Van Soest et al., 1991). El G1 presentó los menores valores de FDA en M1, no obstante, fue el grupo con mayores diferencias entre M1 y M2 (4,23 %) (Tabla 21). El G4 lo siguió en cuanto al menor contenido de FDA, no mostrando variaciones apreciables entre ambos estados de madurez de cosecha, coincidiendo con los resultados de Barrière et al. (2018) al evaluar la línea INRA F4. El G2 presentó los valores más elevados en M1, aunque al ser evaluado en M2, no produjo grandes diferencias entre ambos estados de madurez (1,47 puntos, Tabla 21). Los híbridos de nueva generación para silaje (G3), presentaron una marcada diferencia en reducidos valores de FDA en M1 con respecto a los híbridos del mercado. Esta diferencia se redujo al ser evaluados en M2.

Resultados similares fueron encontrados por Hansey et al. (2010), al evaluar híbridos comerciales y experimentales para silaje en Wisconsin. El G5 junto al G1, fueron los grupos que más incrementaron la FDA al pasar de M1 a M2, posiblemente por sufrir una fuerte traslocación a grano durante el último tercio del llenado. Estos resultados, coinciden con los de Chen et al. (2015), quienes remarcan la importancia del tallo como reservorio de fotoasimilados y nitrógeno ante la necesidad de removilización a la espiga durante el llenado de granos.

Figura 13. Valores medios de FDN \pm error estándar para cada grupo *a priori* de genotipos de maíz en dos estados de madurez de cosecha, silaje vs. grano (rastrojo).

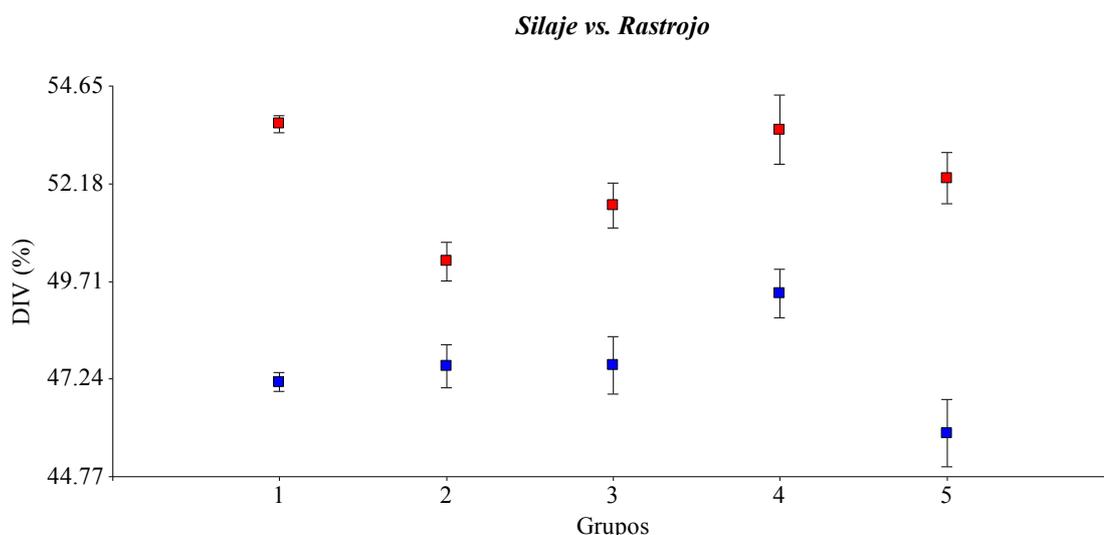


Referencias: Estados de madurez de cosecha para silaje (cuadrados rojos ■) y rastrojo (cuadrados azules, ■) sobre años (2013, 2014 y 2015). Los genotipos se agruparon en: 1: Poblaciones locales, 2: Híbridos comerciales, 3: Híbridos sileros experimentales, 4: Híbridos precoces franceses y 5: Compuestos Sintéticos.

Como era esperable el contenido de FDN fue mayor en M2 que en M1 (Figura 13), esto coincide con varios autores (Lewis et al., 2004; Hansey et al., 2010), también asociado al proceso de senectud de la planta durante el llenado de granos. La FDN representa el contenido de celulosa + hemicelulosa + lignina + sílice de la célula vegetal (Van Soest et al., 1991), por lo tanto es de esperar resultados más variables que con la

FDA por representar más compuestos de la célula vegetal. Los grupos que mayores diferencias produjeron para la variable FDN entre ambos estados de madurez de cosecha fueron G1 (9,79 puntos) y G5 (7,66 puntos) (Tabla 21). G2 fue el grupo que menos varió el contenido de FDN (2,78 puntos), a pesar de tener el mayor valor en M1. Los híbridos sileros experimentales, obtuvieron valores similares que los grupos G4 y G5 en M1, diferenciándose marcadamente de G2. Esto demuestra una mejora en los genotipos sileros de nueva generación, coincidiendo con los resultados encontrados por Hansey et al. (2010).

Figura 14. Valores medios de DIV \pm error estándar para cada grupo *a priori* de genotipos de maíz en dos estados de madurez de cosecha, silaje vs. grano (rastrajo).



Referencias: Estados de madurez de cosecha para silaje (cuadrados rojos ■) y rastrajo (cuadrados azules, ■) sobre años (2013, 2014 y 2015). Los genotipos se agruparon en: 1: Poblaciones locales, 2: Híbridos comerciales, 3: Híbridos sileros experimentales, 4: Híbridos precoces franceses y 5: Compuestos Sintéticos.

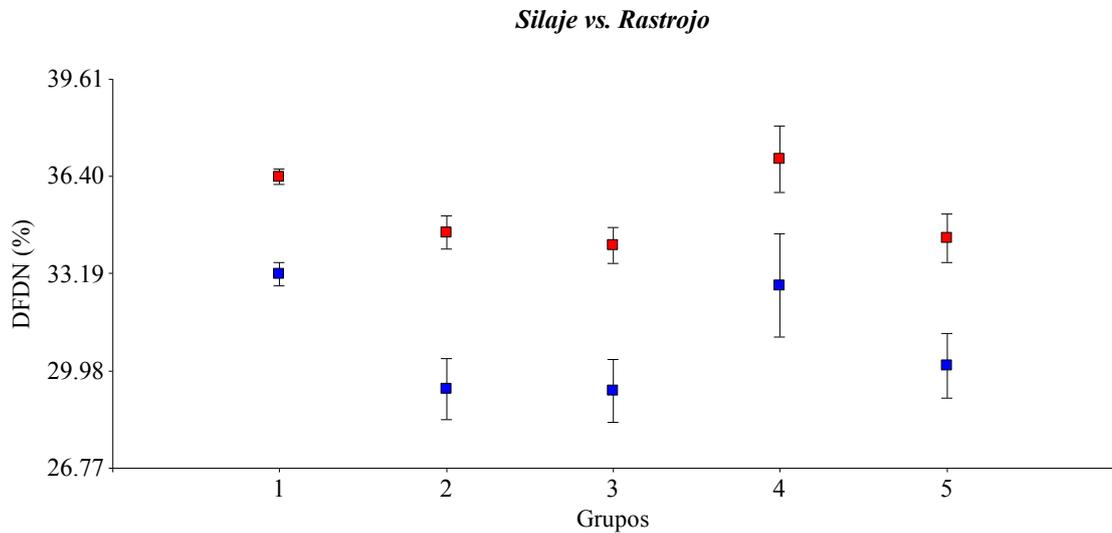
En todos los grupos la DIV se redujo al pasar de M1 a M2 (Figura 14), coincidiendo con los trabajos de varios autores (Lewis et al., 2004, 2010; Hansey et al., 2010). Los grupos donde se observó una mayor variación de la DIV entre ambos estados de madurez de cosecha fueron las poblaciones locales (G1, 6,53 puntos) y los compuestos



sintéticos (G5, 6,45 puntos) (Tabla 21), posiblemente por presentar una mayor traslocación a grano durante el llenado del mismo. Los híbridos comerciales (G2), en su mayoría de reciente lanzamiento al mercado, presentaron menores diferencias (2,66 puntos), posiblemente por presentar un marcado carácter *Stay green* (SG), característica común en los genotipos lanzados en los últimos años. En este sentido, varios autores (Thomas and Howarth, 2000; Valentinuz and Tollenaar, 2004) encontraron que los híbridos modernos con el carácter *Stay green*, presentan mayor duración de la actividad fotosintética, por ende una mayor fijación de carbono y mayores rendimiento en grano. No obstante, Kruse et al. (2008), encontraron que una mayor duración de la actividad fotosintética no debería asociarse con una mejora en la calidad forrajera. Según Arriola et al., (2012), el carácter SG puede o no estar asociado a una elevada calidad de la fracción vegetativa, estando esto más asociado al origen del germoplasma que al rasgo SG. Sin embargo, los genotipos del G2 y G3 presentaron mayores valores de DIV que los del G1, lo cual indica que, al estado de madurez de post cosecha de grano, no solo tienen un menor contenido de fibra, sino un mayor aprovechamiento.



Figura 15. Valores medios de DFDN \pm error estándar para cada grupo *a priori* de genotipos de maíz en dos estados de madurez de cosecha, silaje vs. grano (rastrojo).



Referencias: Estado de madurez de cosecha para silaje (cuadrados rojos ■) y rastrojo (cuadrados azules, ■) sobre años (2013, 2014 y 2015). Los genotipos se agruparon en: 1: Poblaciones locales, 2: Híbridos comerciales, 3: Híbridos sileros experimentales, 4: Híbridos precoces franceses y 5: Compuestos Sintéticos.

La DFDN se redujo en todos los grupos al pasar de M1 a M2 (Figura 15), coincidiendo con los trabajos de Hansey et al. (2010), quienes describieron una caída en la DFDN al avanzar la madurez de la planta de maíz. La DFDN mantiene diferencias relativamente constantes entre ambos estados de madurez de cosecha para todos los grupos evaluados, mostrando un rango de 5,17 a 3,21 puntos entre M1 y M2 (Tabla 21). Las mayores diferencias fueron para el G2 y las menores para G1, y G3 mostraron valores similares de aprovechamiento de la fibra, siendo un parámetro a mejorar en futuros planes de selección. Recordemos que DIV y DFDN son métodos comúnmente utilizados en la investigación sobre nutrición de rumiantes y autores como Lorenz et al. (2009), los recomiendan como adecuados para determinar la calidad de la biomasa bioenergética. (Lorenz et al., 2009a) encontraron que la digestibilidad de la pared celular (DFDN) resultó ser una de las mejores variables ya que predice mejor del rendimiento de etanol SSCF que la digestibilidad de la materia seca (DIV), posiblemente debido a que la



mayoría de los carbohidratos convertidos en etanol en este proceso son los derivados de la pared celular. Nuestros resultados demuestran un comportamiento diferencial de los valores de DIV y DFDN para G1 y G4. Un mayor valor de DFDN en el M1 condicionaría un alto valor de esta variable para el M2. Esto también se repite para la variable DIV, pero solo en G4.

Conclusiones

Los distintos grupos de genotipos evaluados presentaron distintos comportamientos de las variables de calidad del componente vegetativo al pasar del estado de madurez de cosecha de silaje al de grano (rastrojo).

Los híbridos experimentales sileros modernos aventajan a los híbridos comerciales por su mayor calidad del componente vegetativo, tanto en el estado de madurez de silaje como de grano, por lo que podrían ser utilizados como híbridos comerciales con triple propósito (forraje, grano y biomasa lignocelulósica).

Algunas poblaciones locales tendrían genes favorables para la producción de bioetanol lignocelulósico debido a su elevado rendimiento y calidad de la fracción vegetativa. Sin embargo, se destacan más sus rasgos favorables para la producción de silaje, debido a su calidad superior de la fracción vegetativa. Estos rasgos podrían ser incorporados a otros grupos en compuestos específicos para la generación de nuevas líneas endocriadas sileras después de 2 o 3 ciclos de selección recurrente.



CAPÍTULO VI

Conclusiones generales



Conclusiones generales

El presente trabajo permitió clasificar y caracterizar una gran cantidad de genotipos de maíz no sólo para usos actuales, sino también para futuros destinos como la producción de biocombustibles o biomateriales de celulosa. Esto fue posible gracias a la utilización de distintas herramientas estadísticas.

Al referirnos a la contrastación de las hipótesis del trabajo, las mismas fueron puestas en distintos capítulos de esta tesis como figura a continuación:

La **hipótesis I** enuncia que “**las principales variables que definen la calidad de la fibra de la fracción vegetativa de la planta de maíz están controladas por un importante efecto genético y un escaso efecto ambiental**” no se rechaza en ambos estados de madurez de cosecha, basados en los resultados del capítulo II. Si bien las variables de calidad mostraron un menor componente genético que las de rendimiento, siguen presentando una razón CV_g/CV_e mayor a 1. Esto demuestra un mayor efecto genético que ambiental, por lo cual podrían ser tenidas en cuenta a la hora de mejorar tanto genotipos con destino forrajero como con fines lignocelulósicos y graníferos. Las variables de calidad estuvieron muy correlacionadas con la temperatura en el período Siembra-R1. La variable LDA fue la más condicionada por el ambiente en ambos estados de madurez de cosecha.

La **hipótesis II** que enuncia “**Las poblaciones locales de mayor producción de rastrojo presentan mayor aptitud potencial para la producción de bioetanol de segunda generación debido a su mayor calidad del componente vegetativo**”, tampoco es rechazada basados en los resultados obtenidos en el capítulo III y IV. En el capítulo III



se analizó el comportamiento de las variables relacionadas con el rendimiento y la calidad forrajera en ambos estados de madurez de cosecha. Pudo apreciarse como los híbridos comerciales y experimentales (G2 y G3) presentaron mayor rendimiento en grano, aunque menor calidad de la fracción vegetativa. Por su parte, las poblaciones locales presentaron una amplia variabilidad genética tanto para rendimiento como para calidad de la fracción vegetativa. En el capítulo IV, al seleccionar genotipos doble propósito mediante el empleo de índices de selección para la producción de grano y biomasa lignocelulósica, se observó un buen comportamiento de algunas poblaciones locales, equiparable al de otros materiales con mayor nivel de mejora, tales como híbridos comerciales, híbridos forrajeros experimentales y algunos compuestos sintéticos.

La **hipótesis III** se puso a prueba en el capítulo V. Plantea que **“Los genotipos de maíz con elevada aptitud forrajera en el estado de madurez de cosecha para silaje, presentan elevados rendimientos potenciales para la producción de bioetanol lignocelulósico en el estado de cosecha de grano”**. Esta hipótesis no pudo ser aceptada en su totalidad ya que existieron grupos de genotipos, tales como las poblaciones locales que presentaron una elevada calidad forrajera al estado de madurez de cosecha de silaje, pero una marcada caída al pasar al estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo). Por otro lado, si bien los híbridos experimentales sileros presentaron menor calidad de la fracción vegetativa en el estado de madurez de cosecha de silaje que las poblaciones locales, mantuvieron un buen comportamiento al pasar al estado de rastrojo. De esta manera, demostraron un mejor desempeño para un planteo de aprovechamiento de silaje/grano y rastrojo lignocelulósico. Por último, el grupo de los híbridos precoces franceses (G4), tuvo un patrón de comportamiento diferencial para las variables de calidad en ambos momentos, manteniendo valores altos de digestibilidad, DIV y DFDN,



y bajos valores de LDA y FDA. Sin embargo, su escaso RMS los alejó del objetivo de producir bioamasa tanto para silaje, como para bioetanol.

En la actualidad existe una base genética muy estrecha para la generación de híbridos comerciales tanto para grano, como para silaje. Por lo que ampliarla es una labor prioritaria para los programas de mejoramiento actuales tendientes a la utilización de la biomasa de la planta completa y no solamente del grano. Ante estos nuevos desafíos del mejoramiento moderno de maíz, la incorporación de germoplasma debidamente clasificado y el uso de índices de selección de rasgos múltiples son de vital importancia para acelerar los procesos de selección para la introducción de alelos favorables.



PERSPECTIVAS FUTURAS

En función de los resultados obtenidos en el presente trabajo se podría continuar avanzando en líneas de investigación relacionadas con tecnologías que permitan la viabilidad y desarrollo de plantas de bioetanol de segunda generación en el país:

- a. Generar cruzamiento dentro del grupo de los individuos selectos para generar líneas endocriadas que contribuyan al desarrollo de híbridos comerciales doble propósito para la producción de grano y biomasa lignocelulósica con fines energéticos.
- b. Evaluar la variabilidad en genotipos de maíz para la producción de bioetanol a partir del almidón del grano. Este conocimiento sumado a lo generado en esta tesis permitiría lograr la selección de genotipos “Todo etanol”, contemplando tanto grano, como rastrojo para producir biocombustible.
- c. Evaluar, seleccionar y/o generar de microorganismos nativos y/o genéticamente mejorados, capaces de mejorar la eficiencia en el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica para producir bioetanol a partir del rastrojo, haciendo foco en lograr mejores eficiencias en la degradación de pentosas y hexosas.
- d. Desarrollar refinerías flexibles de bioetanol lignocelulósico a escala regional, capaces de procesar continuamente distintos tipos de rastrojos (Trigo, cebada, pasturas, maíz, sorgo, etc.) para abastecer de bioetanol a las poblaciones de zonas rurales del interior de país.
- e. Analizar el impacto ambiental producido por la extracción del rastrojo de maíz y sorgo. Cuantificación de la cantidad potencial máxima de extracción de rastrojo sin comprometer la conservación del suelo. Analizar según zonas y ambientes.

Esta información sumada a la generada en esta tesis podría ser de gran utilidad para el desarrollo de la tecnología de generación de bioetanol en la Argentina.



PRINCIPALES PRODUCCIONES DE LA TESIS

Publicaciones científicas con referato

1. GARCÍA STEPIEN, L.E.; BERTOIA, L.M.; DANELÓN, J.L. Y AULICINO, M.B. 2019. Genetic resources of maize (*Zea mays* L.): double purpose hybrids to generate grain and lignocellulosic biomass. *Maydica*. Vol 64 (1): 1-9. <https://journals-crea.4science.it/index.php/maydica/article/view/1862>

Publicaciones en congresos científicos

1. GARCÍA STEPIEN, L.E.; BERTOIA, L.M. Y AULICINO, M.B. 2018. SILAJE VS. RASTROJO: RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE CALIDAD DE LA FRACCIÓN VEGETATIVA EN GENOTIPOS DE MAÍZ (*ZEAMAYS* L.) CON DISTINTO NIVEL DE MEJORAMIENTO. Argentina, Pergamino. XI Congreso Nacional de Maíz. Organizado por AIANBA, INTA y UNNOBA.
2. GARCÍA STEPIEN, L.E.; AULICINO, M.B.; BERTOIA, L.M. 2016. Maize genotype selection with ability to production bioenergy and grain. Estados Unidos de América. San Francisco. Libro. Resumen. Conferencia. 2a Conferencia Panamericana sobre Sustentabilidad en Biocombustibles y Bioenergía. PanAm RCN (Research Coordination Network).
3. GARCÍA STEPIEN, L.E.; AULICINO, M.B.; BERTOIA, L.M. 2015. CARACTERIZACIÓN DE GERMOPLASMA DE MAÍZ (*Zea mays* L.) CON Y SIN MEJORA GENÉTICA PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DEL RASTROJO. Argentina. Buenos Aires. Revista. Resumen. Congreso. XLIV Congreso Argentino de Genética. Sociedad Argentina de Genética.
4. GARCÍA STEPIEN, L.E.; AULICINO, M.B.; BORLANDELLI, M.S.; BERTOIA, L.M. 2014. VARIABILIDAD GENÉTICA PARA LA APTITUD FORRAJERA Y SU RELACIÓN CON PRODUCCIÓN DE BIOETANOL LIGNOCELULÓSICO A PARTIR DEL RASTROJO DE MAÍZ (*Zea mays* L.). Argentina. Pergamino. Libro. Artículo Completo. Congreso. X Congreso Nacional de Maíz. Asociación de Ingenieros Agrónomos del Norte de la Provincia de Buenos Aires.
5. GARCÍA STEPIEN, L.E.; BERTOIA, L.M.; AULICINO, M.B. 2014. Variabilidad en la aptitud para la producción de forraje y bioetanol de la caña de maíz (*Zea mays* L.). Argentina. Balcarce. Revista. Resumen. Simposio. Simposio de Recursos Genéticos, Mejoramiento y Biotecnología de Especies Forrajeras. Unnoba – AAPA.

Registros de propiedad intelectual

1. BERTOIA, L.M.; AULICINO, M.B.; BORLANDELLI, M.S. y GARCÍA STEPIEN, L.E. 2015. SOFTWARE NIRS- UNLZ-FCA MAÍZ. 20/02/2015. Curvas de calibración para maíz. Derecho de autor de producciones tecnológicas. Informática (software). Producción vegetal-Forrajes. N° de Registro: 5216372



ANEXO

Fenología del cultivo de maíz.

Ilustración 9. Escala fenológica del maíz (adaptado de Ritchie and Hanway, 1982).

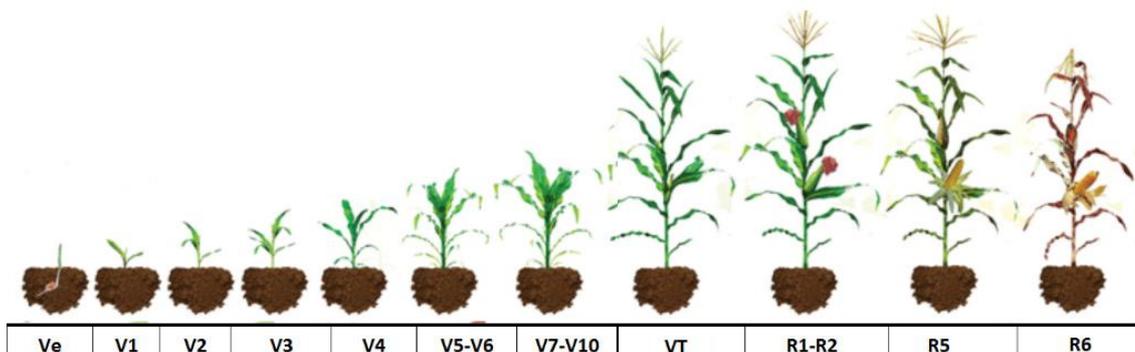


Tabla 22. Principales estados fenológicos del maíz (adaptado de Ritchie and Hanway, 1982).

Estados vegetativos		Estados reproductivos	
V_E	Emergencia	R₁	Emergencia de estigmas (Espiga)
V₁	Primera hoja expandida	R₂	Cuajado de grano
V₂	Segunda hoja expandida	R₃	Grano lechoso
V₃	Tercera hoja expandida	R₄	Grano pastoso
V_(n)	Enésima hoja expandida	R₅	Grano dentado o duro
V_T	Liberación de polen (Panoja)	R₆	Madurez fisiológica

Correlaciones entre la temperatura y las variables de rendimiento y calidad de la fracción vegetativa de maíz en dos estados de madurez (silaje y grano).

Tabla 23. Análisis de correlación de Pearson entre la temperatura media del aire (Siembra-R₁, °C) vs. variables de rendimiento y calidad del tallo de maíz en el estado de madurez de cosecha para silaje.

	Coefficientes	Probabilidad
RMSch	0,13	0,01
RMSDpc	0,01	0,77
FDAch	0,25	0,00
FDNch	0,21	0,00
LDAch	0,45	0,00
DIVch	-0,42	0,00
DFDNch	-0,54	0,00
BRIX	-0,17	0,00

Referencias: Variables: Rendimiento en Materia Seca de caña+hojas (RMSch, t ha⁻¹), Rendimiento en Materia Seca Digestible de planta completa (RMSDpc, t ha⁻¹), Fibra Detergente Ácido (FDAch, %), Fibra Detergente Neutro (FDNch, %), Lignina Detergente Ácido (LDAch, %), Digestibilidad in vitro (DIVch, %), Digestibilidad de la Fibra (DFDNch, %), Contenido de azúcares solubles (BRIX, °B).

Tabla 24. Análisis de correlación de Pearson entre la Temperatura media del aire (Siembra-R₁, °C) vs. variables de rendimiento y calidad del tallo de maíz en el estado de madurez de cosecha de grano.

	Coefficientes	Probabilidad
Altp	0,25	0,00
RMSr	0,47	0,00
RETP	0,49	0,00
FDAr	0,35	0,00
FDNr	0,08	0,00
LDAr	0,17	0,00
DIVr	-0,50	0,00
DFDNr	-0,51	0,00

Referencias: Variables: Altura de planta (Altp, m), Rendimiento en Materia Seca de rastrojo (RMSr, t ha⁻¹), Rendimiento en Etanol Teórico Potencial (RETP, mil l ha⁻¹) Fibra Detergente Ácido (FDAr, %), Fibra Detergente Neutro (FDNr, %), Lignina Detergente Ácido (LDAr, %), Digestibilidad in vitro (DIVr, %), Digestibilidad de la Fibra (DFDNr, %).



Relaciones entre el Rendimiento en Etanol Teórico Potencial (RETP) y las principales variables de calidad del rastrojo de maíz.

En los siguientes gráficos se muestra la asociación entre la variable respuesta RETP y las variables de calidad en M2: Celulosa (Figura 16), Hemicelulosa (Figura 17), Lignina (LDAr) (Figura 18), Digestibilidad (DIVr) (Figura 19) y Digestibilidad de la Fibra (DFDNr) (Figura 20). En dichos gráficos se compara el ajuste de los datos a una regresión simple para Todos los Genotipos y para los genotipos selectos en el capítulo IV. En los mismos se aprecia una escasa relación entre RETP y las variables antes enunciadas, por lo cual se decidió no incluirlo dentro del cuerpo de la Tesis. Recordemos que los Genotipos selectos en el capítulo IV, responden a un ideotipo doble propósito, con elevada producción de grano y biomasa lignocelulósica, sin descuidar atributos agronómicos como buen comportamiento al vuelco (V) y Quebrado (Q) de tallo y estabilidad agronómica. No obstante, dentro de las variables evaluadas, la que presenta una mayor asociación con RETP es DIVr (Figura 19), esto mismo puede apreciarse en la Tabla 17 del capítulo III, donde su muestra una correlación de -0,44 ($p < 0,001$). Por otra parte, no se encontraron grandes diferencias al evaluar Todos los Genotipos y los Genotipos Selectos, salvo en los casos de las variables Celr (Figura 16) y LDAr (Figura 18), donde se logró un mayor R^2 .



Figura 16. Relación entre Celulosa vs. Rendimiento de Etanol Teórico Potencial para todos los genotipos (Y1, ○) y los genotipos selectos (Y2, ●).

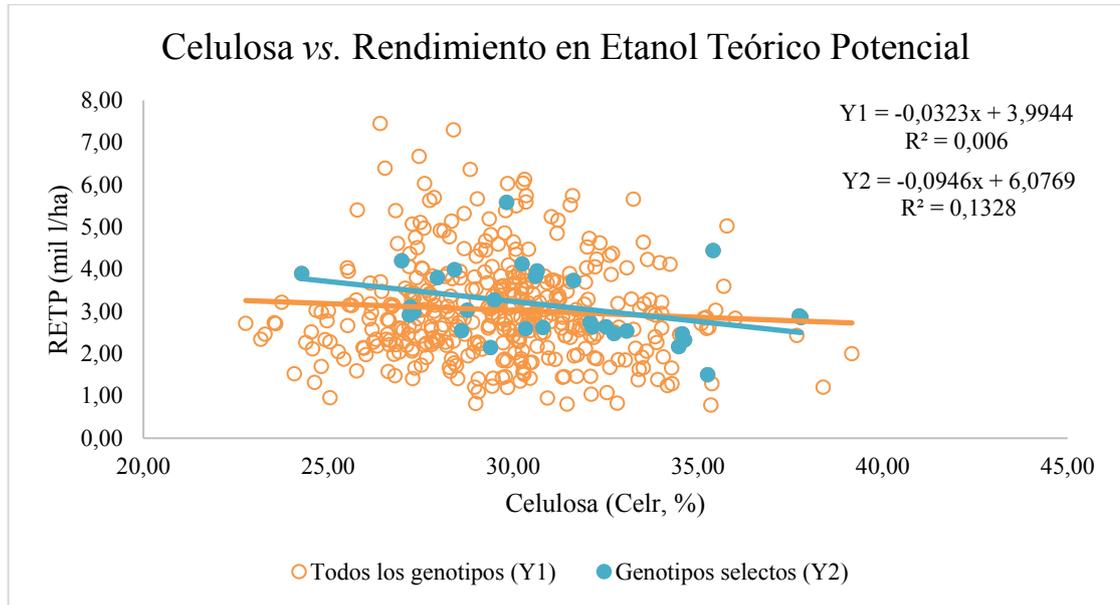


Figura 17. Relación entre Hemicelulosa vs. Rendimiento de Etanol Teórico Potencial para todos los genotipos (Y1, ○) y los genotipos selectos (Y2, ●).

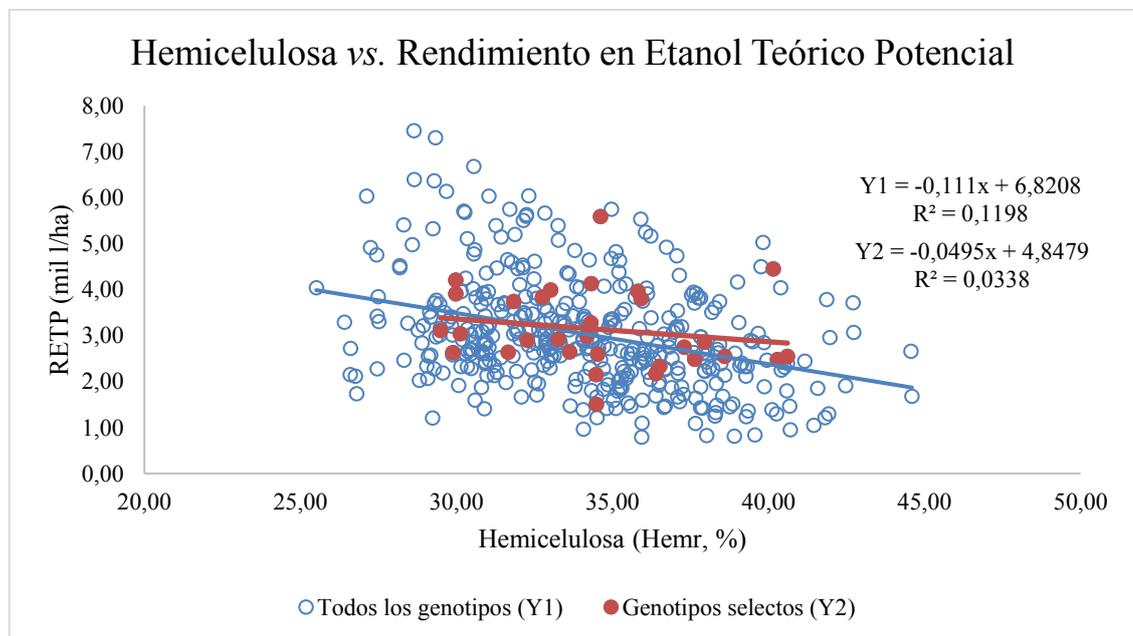


Figura 18. Relación entre Lignina vs. Rendimiento de Etanol Teórico Potencial para todos los genotipos (Y1, ○) y los genotipos selectos (Y2, ●).

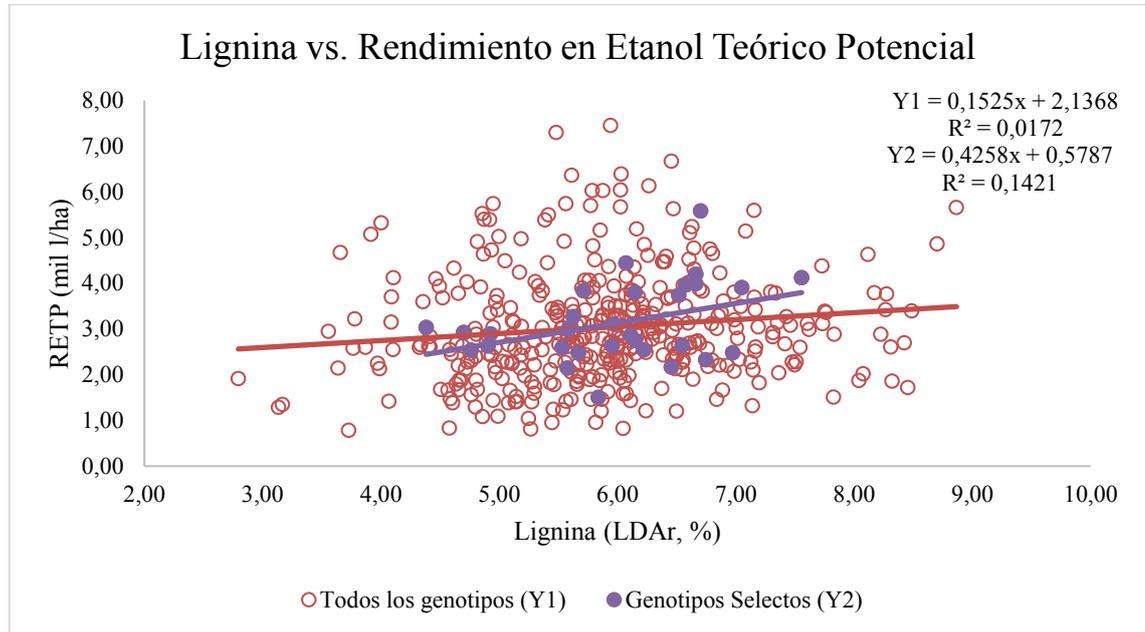


Figura 19. Relación entre Digestibilidad vs. Rendimiento de Etanol Teórico Potencial para todos los genotipos (Y1, ○) y los genotipos selectos (Y2, ●).

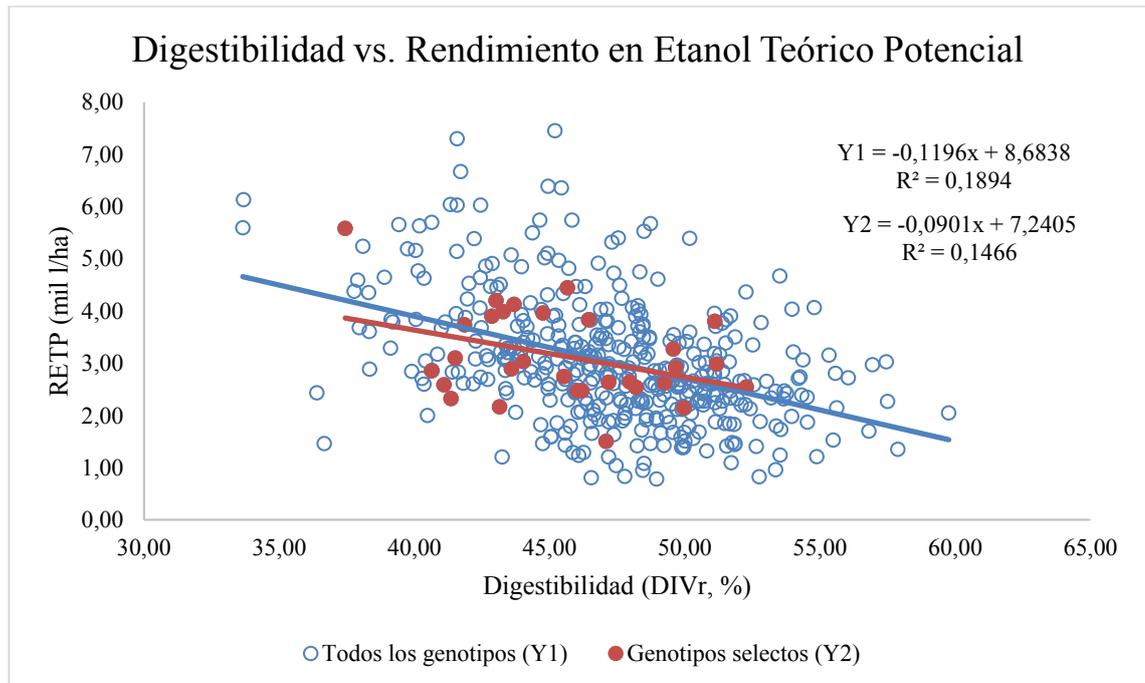
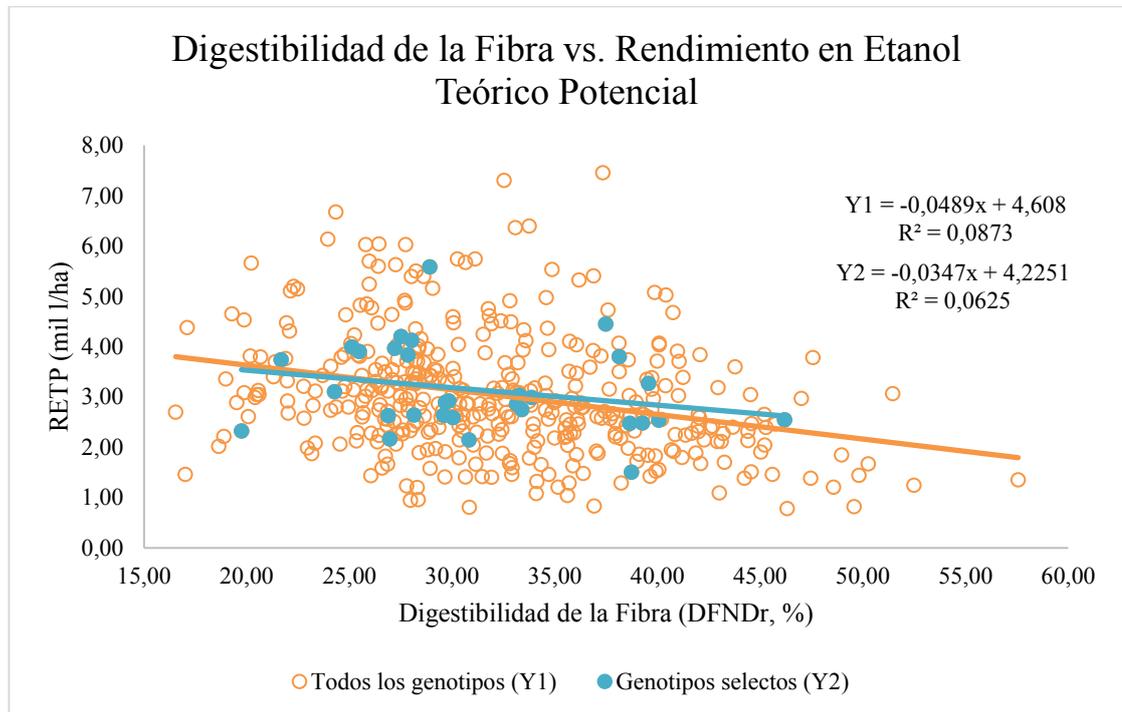


Figura 20. Relación entre Digestibilidad de la Fibra vs. Rendimiento de Etanol Teórico Potencial para todos los genotipos (Y1, ○) y los genotipos selectos (Y2, ●).



Análisis de la varianza multivariado de los conglomerados a priori en el estado de madurez de cosecha de silaje

Cuadro de Análisis de la Varianza (Wilks)

F.V.	Estadístico	F	gl(num)	gl(den)	p
Conglomerado	0,784,50	24	1473	<0,0001	

Cuadro de Análisis de la Varianza (Pillai)

F.V.	Estadístico	F	gl(num)	gl(den)	p
Conglomerado	0,244,44	24	1700	<0,0001	

Cuadro de Análisis de la Varianza (Lawley-Hotelling)

F.V.	Estadístico	F	gl(num)	gl(den)	p
Conglomerado	0,264,53	24	1682	<0,0001	

Cuadro de Análisis de la Varianza (Roy)

F.V.	Estadístico	F	gl(num)	gl(den)	p
Conglomerado	0,139,51	6	425	<0,0001	

Prueba Hotelling Alfa=0,05

Error: Matriz de covarianzas común gl: 427

Grupo	DFNCH	DIVCH	FDACH	FDNCH	LDACH	RMSCH	n	
4	36,98	53,54	33,69	64,37	5,36	5,30	15	A
2	34,55	50,21	35,57	67,80	5,41	8,41	36	B
1	36,39	53,68	32,86	63,30	5,18	9,44	300	C
5	34,36	52,31	33,89	64,62	5,48	11,13	30	D
3	34,13	51,62	34,03	64,69	5,71	9,73	51	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



Análisis de la varianza multivariado de los conglomerados a priori en el estado de madurez de cosecha de grano (rastrojo).

Cuadro de Análisis de la Varianza (Wilks)

F.V.	Estadístico	F	gl(num)	gl(den)	p
Conglomerado	0,765,02	24	1473		<0,0001

Cuadro de Análisis de la Varianza (Pillai)

F.V.	Estadístico	F	gl(num)	gl(den)	p
Conglomerado	0,264,90	24	1700		<0,0001

Cuadro de Análisis de la Varianza (Lawley-Hotelling)

F.V.	Estadístico	F	gl(num)	gl(den)	p
Conglomerado	0,295,10	24	1682		<0,0001

Cuadro de Análisis de la Varianza (Roy)

F.V.	Estadístico	F	gl(num)	gl(den)	p
Conglomerado	0,1611,68	6	425		<0,0001

Prueba Hotelling Alfa=0,05

Error: Matriz de covarianzas común gl: 427

Grupo	DFDNR	DIVR	FDAR	FDNR	LDAR	RMSR	n	
4	32,80	49,40	33,53	68,84	5,51	6,02	15	A
5	30,16	45,87	37,77	72,28	6,21	9,80	30	B
1	33,18	47,15	37,09	73,09	5,76	8,89	300	B
3	29,32	47,59	36,40	69,81	6,41	8,72	51	C
2	29,38	47,55	37,04	70,58	6,03	8,83	36	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En los ANVA se produjo una suma de cuadrados con un error de tipo III. Esto se debió al diseño desbalanceado utilizado, este tipo de error asume que la hipótesis nula es rechazada por la razón equivocada (Langsrud, 2003). El problema es que podría existir cierta relación entre las variables, pero por una razón diferente de la indicada en la hipótesis.



10.1104/pp.110.1.3.

- Carpita, N.C. 1996. Structure and Biogenesis of the Cell Walls of Grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47(1): 445-476. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.445.
- Cirilo, A.G., y F.H. Andrade. 1994. Sowing Date and Maize Productivity: I. Crop Growth and Dry Matter Partitioning. *Crop Sci.* 34(4): 1039. doi: 10.2135/cropsci1994.0011183X003400040037x.
- Cone, J.W., A.H. Van Gelder, H.A. Van Schooten, y J.A.M. Groten. 2008. Effects of forage maize type and maturity stage on in vitro rumen fermentation characteristics. *NJAS - Wageningen J. Life Sci.* 55(2): 139-154. doi: 10.1016/S1573-5214(08)80033-4.
- Cotes, J.M., y C.E. Núñez. 2001. Propuesta para el Análisis de Diseños Aumentados en Fitomejoramiento : Un Caso en Papa. *Rev. Latinoam. la Papa.* 12: 15-34.
- Cotton, J., G. Burow, V. Acosta-martinez, y J. Moore-kucera. 2013. Biomass and Cellulosic Ethanol Production of Forage Sorghum Under Limited Water Conditions. : 711-718. doi: 10.1007/s12155-012-9285-0.
- Cruz, C.D. 2006. Programa Genes: Versao Windows. Aplicativo computacional em genética e estatística. : 285.
- Darby, H.M., y J.G. Lauer. 2002. Planting date and hybrid influence on corn forage yield and quality. *Agron. J.* 94(2): 281-289. doi: 10.2134/agronj2002.5590.
- Delucchi, C., G.H. Eyherabide, R.D. Lorea, D.A. Presello, M.E. Otegui, et al. 2012. Classification of argentine maize landraces in heterotic groups. *Maydica* 57(1): 26-33.
- Dhugga, K.S. 2007. Maize biomass yield and composition for biofuels. *Crop Sci.* 47(6): 2211-2227. doi: 10.2135/cropsci2007.05.0299.
- Dien, B.S., H.J.G. Jung, K.P. Vogel, M.D. Casler, J.A.F.S. Lamb, et al. 2006. Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. *Biomass and Bioenergy* 30(10): 880-891. doi: 10.1016/j.biombioe.2006.02.004.
- Doebley, J., A. Stec, J. Wendelt, y M. Edwardst. 1990. Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population : Implications for the origin of maize. 87(December): 9888-9892.
- Dowe, N., y J. Mcmillan. 2001. SSF experimental protocols: lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation. *Natl. Renew. Energy Lab. Anal. Proced.* (January): 19. doi: Technical Report NREL/TP-510-42630.
- Duvick, D.N. 2005. Genetic progress in yield of United States maize (*Zea mays* L.). *Maydica* 50(3-4): 193-202.
- Ertiro, B.T., S. Twumasi-Afryie, M. Blümmel, D. Friesen, D. Negera, et al. 2013. Genetic variability of maize stover quality and the potential for genetic improvement of fodder value. *F. Crop. Res.* 153: 79-85. doi: 10.1016/j.fcr.2012.12.019.
- Fairey, N.A. 1983. Yield, Quality and Development of Forage Maize As Influenced By Dates of Planting and Harvesting. *Can. J. Plant Sci.* 63(1): 157-168. doi: 10.4141/cjps83-015.
- Falconer D. & Mackay T. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th ed. Addison Wesley Longman, Harlow, Essex U.K.
- FAO. 2017. PERSPECTIVAS AGRÍCOLAS 2017-2026. : 131. <http://www.fao.org/3/a-BT092s.pdf>.
- Federer, W.T. 1961. Augmented Designs with One-Way Elimination of Heterogeneity. *Biometrics* 17(3):



- 447-473. doi: <https://doi.org/10.2307/2527837>.
- Federer, W.T., M. Reynolds, y J. Crossa. 2001. Combining results from augmented designs over sites. *Agron. J.* 93(2): 389-395. doi: 10.2134/agronj2001.932389x.
- Gabrielsen, B.C. 1986. Evaluation of Marketed Cellulases for Activity and Capacity to Degirade Forage1. *Agron. J.* 78: 838-842. doi: 10.2134/agronj1986.00021962007800050019x.
- Gago, A., J.P. Gianatiempo, y M. López. 2018. La cadena del maíz en la Argentina: evolución del cultivo durante la últimas campaña.
- Garibay, S. V., P. Stamp, H.U. Ammon, y B. Feil. 1997. Yield and quality components of silage maize in killed and live cover crop sods. *Eur. J. Agron.* 6(3-4): 179-190. doi: 10.1016/S1161-0301(96)02043-6.
- Giaveno, C., y J. Ferrero. 2003. Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central area of Santa Fe, Argentina. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 3(2): 89-94. <http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/uploads/c8128f42-9c4b-0b4f.pdf>.
- Goering H.K. and P.J. Van Soest. 1970. Forage fiber analysis. Agricultural handbook no. 379. US Department of Agriculture, Washington, DC,.
- Grabber, J.H. 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci.* 45(3): 820-831. doi: 10.2135/cropsci2004.0191.
- Graham, R.L., R. Nelson, J. Sheehan, R.D. Perlack, y L.L. Wright. 2007. Current and potential U.S. corn stover supplies. *Agron. J.* 99(1): 1-11. doi: 10.2134/agronj2005.0222.
- Hallauer, A.R., M.J. Carena, y F.J.B. Miranda. 1988. Quantitative Genetics in Maize Breeding (J. PROHENS, F. NUEZ, y M.J. CARENA, editores). Second. Springer, New York.
- Hallauer, A.R., y J.H. Sears. 1972. Integrating Exotic Germplasm into Corn Belt Maize Breeding Programs1. *Crop Sci.* 12: 203-206. doi: 10.2135/cropsci1972.0011183X001200020016x.
- Hansey, C.N., A.J. Lorenz, y N. de Leon. 2010. Erratum to Cell wall composition and ruminant digestibility of various maize tissues across development (*Bioenerg. Res.*, (2010) 3, (28-37), 10.1007/s12155-009-9068-4). *Bioenergy Res.* 3(3): 295-304. doi: 10.1007/s12155-010-9100-8.
- Hatfield, R.D. 1993. Chapter 12 Cell Wall Polysaccharide Interactions.
- Holland, J.B., M.M. Goodman, y F. Castillo-Gonzalez. 1996. Identification of Agronomically Superior Latin American Maize Accessions via Multi-Stage Evaluations. *Crop Sci.* 36: 778-784. doi: 10.2135/cropsci1996.0011183X003600030041x.
- Hufford, M.B., X. Xu, J. Van Heerwaarden, T. Pyhäjärvi, J.M. Chia, et al. 2012. Comparative population genomics of maize domestication and improvement. *Nat. Genet.* 44(7): 808-811. doi: 10.1038/ng.2309.
- IASRI. 2013. Sas MACRO for Augmented Block Desings. Indian Agric. Stat. Res. Inst. <http://www.iasri.res.in/sscnars/Macros/ABD/augment.sas>.
- Incognito, S.J.P., G.H. Eyhéabide, L.M. Bertoia, y C.G. López. 2013. Breeding potential of elite maize landraces to improve forage yield and quality of two heterotic patterns. *Crop Sci.* 53(1): 121-131. doi: 10.2135/cropsci2012.05.0330.
- Incognito, S., G. Eyhéabide, y C. López. 2016. Can elite maize landraces help to improve forage yield and quality? A genetic analysis. *Maydica* 61(3).



- Infante, P.A., K.J. Moore, A.W. Lenssen, S. V. Archontoulis, P. Scott, et al. 2018. Phenology and biomass production of adapted and non-adapted tropical corn populations in central Iowa. *Agron. J.* 110(1): 171-182. doi: 10.2134/agronj2016.11.0666.
- INTA. 1997. *Catálogo de germoplasma de maíz argentino* (C. Senigaliesi, C.A. Scoppa, D.A. Fregiaro, A.J. Martínez, A. Clausen, et al., editores). 1ra edición. Instituto Agronómico Per L'Oltremare, Firenze, Italy.
- Johnson, J.M.F., D. Reicosky, B. Sharratt, M. Lindstrom, W. Voorhees, et al. 2004. Characterization of soil amended with the by-product of corn stover fermentation. *Soil Sci Soc Am J* 68(1973): 139-147. doi: 10.2136/sssaj2004.1390.
- Jung, H.J.G. 2003. Maize stem tissues: Ferulate deposition in developing internode cell walls. *Phytochemistry* 63(5): 543-549. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00221-8.
- Jung, H.G., y M.D. Casler. 2006. Maize stem tissues: Impact of development on cell wall degradability. *Crop Sci.* 46(4): 1801-1809. doi: 10.2135/cropsci2006.02-0086.
- Jung, H.J.G., M.A. Jorgensen, J.G. Linn, y F.M. Engels. 2000. Impact of accessibility and chemical composition on cell wall polysaccharide degradability of maize and lucerne stems. *J. Sci. Food Agric.* 80(3): 419-427. doi: 10.1002/1097-0010(200002)80:3<419::AID-JSFA544>3.0.CO;2-I.
- Jung, H.G., D.R. Mertens, y D.R. Buxton. 1998. Forage quality variation among maize inbreds: In vitro fiber digestion kinetics and prediction with NIRS. *Crop Sci.* 38(1): 205-210. doi: 10.2135/cropsci1998.0011183X003800010034x.
- Kang, M.S. 1993. Simultaneous Selection for Yield and Stability in Crop Performance Trials - Consequences for Growers. *Agron. J.* 85(3): 754-757. doi: 10.2134/agronj1993.00021962008500030042x.
- Kruse, S., A. Herrmann, A. Kornher, y F. Taube. 2008. Evaluation of genotype and environmental variation in fibre content of silage maize using a model-assisted approach. *Eur. J. Agron.* 28(3): 210-223. doi: 10.1016/j.eja.2007.07.007.
- Langsrud, Ø. 2003. ANOVA for unbalanced data: Use Type II instead of Type III sums of squares. *Stat. Comput.* 13(2): 163-167. doi: 10.1023/A:1023260610025.
- Lauer, J.G., J.G. Coors, y P.J. Flannery. 2001. Forage yield and quality of corn cultivars developed in different eras. *Crop Sci.* 41(5): 1449-1455. doi: 10.2135/cropsci2001.4151449x.
- Lee, E.A., T.K. Doerksen, y L.W. Kannenberg. 2003. Genetic Components of Yield Stability in Maize Breeding Populations. *Crop Sci* 43(6): 2018-2027. doi: 10.2135/cropsci2003.2018.
- Lewis, A.L., W.J. Cox, y J.H. Cherney. 2004. Hybrid, Maturity, and Cutting Height Interactions on Corn Forage Yield and Quality. *Agron. J.* 96(1): 267-274.
- Lewis, M.F., R.E. Lorenzana, H.J.G. Jung, y R. Bernardo. 2010. Potential for simultaneous improvement of corn grain yield and stover quality for cellulosic ethanol. *Crop Sci.* 50(2): 516-523. doi: 10.2135/cropsci2009.03.0148.
- Liu, Z.H., y H.Z. Chen. 2016. Simultaneous saccharification and co-fermentation for improving the xylose utilization of steam exploded corn stover at high solid loading. *Bioresour. Technol.* 201: 15-26. doi: 10.1016/j.biortech.2015.11.023.
- Lorenz, A.J., R.P. Anex, A. Isci, J.G. Coors, N. de Leon, et al. 2009a. Forage quality and composition



- measurements as predictors of ethanol yield from maize (*Zea mays* L.) stover. *Biotechnol. Biofuels* 2: 1-8. doi: 10.1186/1754-6834-2-5.
- Lorenz, A.J., J.G. Coors, C.N. Hansey, S.M. Kaeppler, y N. de Leon. 2010. Genetic analysis of cell wall traits relevant to cellulosic ethanol production in maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 50(3): 842-852. doi: 10.2135/cropsci2009.04.0168.
- Lorenz, A.J., J.G. Coors, N. De Leon, E.J. Wolfrum, B.R. Hames, et al. 2009b. Characterization, genetic variation, and combining ability of maize traits relevant to the production of cellulosic ethanol. *Crop Sci.* 49(1): 85-98. doi: 10.2135/cropsci2008.06.0306.
- Lundvall, J.P., D.R. Buxton, A.R. Hallauer, y J.R. George. 1994. Forage quality variation among maize inbreds: In vitro digestibility and cell-wall components. *Crop Sci.* 34(6): 1672-1678. doi: 10.2135/cropsci1994.0011183X003400060046x.
- Maddoni, G.A. 2012. Analysis of the climatic constraints to maize production in the current agricultural region of Argentina-a probabilistic approach. *Theor. Appl. Climatol.* 107(3-4): 325-345. doi: 10.1007/s00704-011-0478-9.
- Márquez-Sánchez, F. 2008. INBREEDING AND PREDICTION OF MAIZE SYNTHETICS FROM DOUBLE CROSSES Fidel Márquez-Sánchez. *Rev. Fitotec. Mex.* 31(3): 1-4.
- Méchin, V., O. Argillier, Y. Hébert, E. Guingo, L. Moreau, et al. 2001. Genetic analysis and QTL mapping of cell wall digestibility and lignification in silage maize. *Crop Sci.* 41(3): 690-697.
- Mercau, J.L., M.E. Otegui, L.R. Ahuja, L. Ma, y R.J. Lascano. 2014. A Modeling Approach to Explore Water Management Strategies for Late-Sown Maize and Double-Cropped Wheat–Maize in the Rainfed Pampas Region of Argentina. 5: 351-374. doi: 10.2134/advagricsystmodel5.c13.
- Minagri. 2020. Ministerio de Agroindustria de la República Argentina. Dirección de estimaciones agrícolas y delegaciones. <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>.
- Modernización, M. de. 2019. Producción Nacional de Bioenergías. https://datos.gob.ar/dataset/energia-estadisticas-biodiesel-bioetanol/archivo/energia_fd142c49-fa73-4e21-be1f-20120d6d67d05d.
- Muttoni, G., N. Palacios-Rojas, L. Galicia, A. Rosales, K. V. Pixley, et al. 2013. Cell wall composition and biomass digestibility diversity in Mexican maize (*Zea mays* L) landraces and CIMMYT inbred lines. *Maydica* 58(1): 21-33.
- Ojeda, K., E. Sánchez, M. El-Halwagi, y V. Kafarov. 2011. Exergy analysis and process integration of bioethanol production from acid pre-treated biomass: Comparison of SHF, SSF and SSCF pathways. *Chem. Eng. J.* 176-177: 195-201. doi: 10.1016/j.cej.2011.06.083.
- Passoth, V., y M. Sandgren. 2019. Biofuel production from straw hydrolysates: current achievements and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103(13): 5105-5116. doi: 10.1007/s00253-019-09863-3.
- Patrouilleau, R.D., C. Lacoste, P. Yapura, y M. Casanovas. 2007. Perspectivas de los biocombustibles en la Argentina, con énfasis en el etanol de base celulósica. : 70.
- Pedersen, J.F., K.P. Vogel, y D.L. Funnell. 2005. Impact of reduced lignin on plant fitness. *Crop Sci.* 45(3): 812-819. doi: 10.2135/cropsci2004.0155.
- Pollak, L.M. 2001. The History and Success of the public-private project on germplasm enhancement of maize (GEM). *Adv. Agron.* 78: 45-87. doi: 10.1016/S0065-2113(02)78002-4.



- Qin, L., X. Zhao, W.C. Li, J.Q. Zhu, L. Liu, et al. 2018. Process analysis and optimization of simultaneous saccharification and co-fermentation of ethylenediamine-pretreated corn stover for ethanol production. *Biotechnol. Biofuels* 11(1): 1-10. doi: 10.1186/s13068-018-1118-8.
- Ramirez-Cabral, N.Y.Z., L. Kumar, y F. Shabani. 2017. Global alterations in areas of suitability for maize production from climate change and using a mechanistic species distribution model (CLIMEX). *Sci. Rep.* 7(1): 1-13. doi: 10.1038/s41598-017-05804-0.
- Riboulet, C., B. Lefèvre, D. Dénoue, y Y. Barrière. 2008. Genetic variation in maize cell wall for lignin content, lignin structure, p-hydroxycinnamic acid content, and digestibility in set of 19 lines at silage harvest maturity. *Maydica* 53(1): 11-19.
- Di Rienzo, J., F. Casanoves, M. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, et al. 2011. InfoStat. www.infostat.com.ar.
- Ritchie, S. and, y J.J. Hanway. 1982. How a corn plant develops. Iowa State Univ. Technol. Spec. Rep.: 48 p.
- Rohlf, F.J., y R.R. Sokal. 1981. Comparing Numerical Taxonomic Studies. *Syst. Zool.* 30(4): 459. doi: 10.2307/2413054.
- Rossi, D. 2007. Evolución de los cultivares de maíz utilizados en la argentina. *Rev. extensión Agropecu. agromensajes* 22.
- Sah, R.P., S. Ahmed, D.R. Malaviya, y P. Saxena. 2016. Identification of consistence performing dual purpose maize (*Zea mays* L.) genotypes under semi-arid condition. *Range Manag. Agrofor.* 37(2): 162-166.
- Santiago, R., J. Barros-Rios, y R.A. Malvar. 2013. Impact of cell wall composition on maize resistance to pests and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 14(4): 6960-6980. doi: 10.3390/ijms14046960.
- Shenk, J. S. y Westerhaus, M.O. 1995. Routine operation, calibration, development and network system management manual. NIRSystems, Inc., 12101 Tech Road, Silver Spring.
- Shenk, J.S. and Westerhaus, M.O. 1996. Calibration the ISI way. In *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. (P.C. Davies, A.M.C. and Williams, editor). Chichester, UK.
- Shinners, K.J., G.S. Adsit, B.N. Binversie, M.F. Digman, R.E. Muck, et al. 2007. Single-pass, split-stream harvest of corn grain and stover. *Trans. ASABE* 50(2): 355-363. <http://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=10724&content=PDF>.
- Sneath, P.H.A., y R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B.A. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.* 74(10): 3583-3597. doi: doi:10.3168/jds.s0022-0302(91)78551-2.
- Steel, R.G.D., y J.H. Torrie. 1960. [Book] Principles and Procedures of statistics. : 473.
- Sticklen, M.B. 2007. Feedstock crop genetic engineering for alcohol fuels. *Crop Sci.* 47(6): 2238-2248. doi: 10.2135/cropsci2007.04.0212.
- Sticklen, M.B. 2008. Plant genetic engineering for biofuel production: Towards affordable cellulosic ethanol. *Nat. Rev. Genet.* 9(6): 433-443. doi: 10.1038/nrg2336.
- Subedi, K.D., y B.L. Ma. 2005. Nitrogen uptake and partitioning in stay-green and leafy maize hybrids.



- Crop Sci. 45(2): 740-747. doi: 10.2135/cropsci2005.0740.
- Sun, Y., y J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production. *Appl. Chem.* 83: 1-272.
- Tang, C., S. Li, M. Li, y G.H. Xie. 2018. Bioethanol potential of energy sorghum grown on marginal and arable lands. *Front. Plant Sci.* 9(April 2018): 1-11. doi: 10.3389/fpls.2018.00440.
- Thevenot, M., M.F. Dignac, y C. Rumpel. 2010. Fate of lignins in soils: A review. *Soil Biol. Biochem.* 42(8): 1200-1211. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.03.017.
- Thomas, H., y C.J. Howarth. 2000. Five ways to stay green. *J. Exp. Bot.* 51(suppl_1): 329-337. doi: 10.1093/jexbot/51.suppl_1.329.
- Tollenaar, M., S.P. Nissanka, I. Rajcan, y T.W. Bruulsema. 1997. Yield response of old and new corn hybrids to nitrogen. *Better Crop. with Plant Food* 81(4): 3-5.
- Torney, F., L. Moeller, A. Scarpa, y K. Wang. 2007. Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18(3): 193-199. doi: 10.1016/j.copbio.2007.03.006.
- Torres, A.F., R.G.F. Visser, y L.M. Trindade. 2015. Bioethanol from maize cell walls: Genes, molecular tools, and breeding prospects. *GCB Bioenergy* 7(4): 591-607. doi: 10.1111/gcbb.12164.
- Valentinuz, O.R., y M. Tollenaar. 2004. Vertical profile of leaf senescence during the grain-filling period in older and newer maize hybrids. *Crop Sci.* 44(3): 827-834. doi: 10.2135/cropsci2004.0827.
- Wang, Z., B.S. Dien, K.D. Rausch, M.E. Tumbleson, y V. Singh. 2019. Improving ethanol yields with deacetylated and two-stage pretreated corn stover and sugarcane bagasse by blending commercial xylose-fermenting and wild type *Saccharomyces* yeast. *Bioresour. Technol.* 282(March): 103-109. doi: 10.1016/j.biortech.2019.02.123.
- Weimer, P.J., B.S. Dien, T.L. Springer, y K.P. Vogel. 2005. In vitro gas production as a surrogate measure of the fermentability of cellulosic biomass to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(1): 52-58. doi: 10.1007/s00253-004-1844-7.
- Wiersma, D.W., P.R. Carter, K.A. Albrecht, y J.G. Coors. 1993. Kernel milkline stage and corn forage yield, quality, and dry matter content. *J. Prod. Agric.* 6(1): 94-99. doi: 10.2134/jpa1993.0094.
- Wilts, A.R., D.C. Reicosky, R.R. Allmaras, y C.E. Clapp. 2004. Long-term corn residue effects: Harvest alternatives, soil carbon turnover, and root-derived carbon. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68(4): 1342-1351.
- Wricke G. 1962. Evaluation Method for Recording Ecological Differences in Field Trials. *Z Pflanzenzücht.* 47: 92-96.
- Yang, B., y C.E. Wyman. 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 2(2): 26-40. doi: 10.1002/bbb.
- You, F.M., S.D. Duguid, D. Thambugala, y S. Cloutier. 2013. Statistical analysis and field evaluation of the type 2 modified augmented design (MAD) in phenotyping of flax (*Linum usitatissimum*) germplasms in multiple environments. *Aust. J. Crop Sci.* 7(11): 1789-1800.
- Zeng, Y., S. Zhao, S. Yang, y S.Y. Ding. 2014. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27: 98-45. doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.008.
- Zhang, Q., y J. Bao. 2017. Industrial cellulase performance in the simultaneous saccharification and co-



fermentation (SSCF) of corn stover for high-titer ethanol production. *Bioresour. Bioprocess.* 4(1).
doi: 10.1186/s40643-017-0147-7.

Zhang, G.C., J.J. Liu, I.I. Kong, S. Kwak, y Y.S. Jin. 2015. Combining C6 and C5 sugar metabolism for enhancing microbial bioconversion. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 29(July 2018): 49-57. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.09.008.

Zhao, Y.L., A. Dolat, Y. Steinberger, X. Wang, A. Osman, et al. 2009. Biomass yield and changes in chemical composition of sweet sorghum cultivars grown for biofuel. *F. Crop. Res.* 111(1-2): 55-64. doi: 10.1016/j.fcr.2008.10.006.

