



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

**Estrés térmico y/o hídrico durante el llenado de
grano en soja: impacto sobre el funcionamiento de la
fuente y su efecto sobre el rendimiento**

Tesinista: Ergo, Verónica Vanesa Firma:.....

Directora: Dra. Carrera, Constanza Soledad Firma:.....

Co-director: Dr. Lascano, Hernán Ramiro Firma:.....

Lugar de trabajo: EEA INTA Manfredi, IFRGV-CIAP-INTA (ex IFFIVE), Cátedra de Fisiología Vegetal, FCEFN-UNC.

Año: 2013

**Estrés Térmico y/o Hídrico Durante el Llenado de Granos en
Soja: IMPACTO SOBRE EL FUNCIONAMIENTO de la Fuente
Fotosintética Y SU EFECTO SOBRE EL RTO**

- Tribunal examinador:

Dr. Marcelo Desimone

Firma.....

Dr. Claudio González

Firma.....

Dr. Hernán Lascano

Firma.....

Calificación.....

Fecha.....

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Dra. Constanza Carrera por ser mi guía durante el cursado de la carrera y durante la tesina, gracias por apoyarme, aconsejarme, por tu paciencia y por darme la posibilidad de trabajar y formarme. Gracias por la amistad que me regalas cada día y por confiar en mí.

Al Dr. Ramiro Lascano, por su codirección, tiempo dedicado, y por permitirme trabajar en los laboratorios del IFRGV-CIAP-INTA (ex IFFIVE) y en la Cátedra de Fisiología Vegetal para la realización de este trabajo.

A Claudia Vega por permitirme trabajar en la EEA-INTA Manfredi, por mostrarme y abrirme caminos, por sus consejos y acompañamiento diario.

A Rodrigo Parola, por su gran colaboración en trabajos a campo y laboratorio, por la paciencia, buena predisposición y por responder a cada una de mis consultas.

Gracias el tribunal examinador de esta tesina por aceptar la revisión, por el tiempo dedicado y las observaciones realizadas.

Además quiero agradecer a las Instituciones: INTA, EEA-Manfredi, IFRGV-CIAP-INTA (ex IFFIVE) y a la Cátedra de Fisiología Vegetal, FCEfyN-UNC por permitirme desarrollar este estudio.

A los compañeros de la sección de ecofisiología: Francisco, Claudio y Emanuel por haberme brindado sus conocimientos en consultas técnicas y por compartir experiencias laborales y personales día a día. También agradecer a las personas que me acompañaron en el trabajo a laboratorio: Nacira, Ignacio, Marianela, Germán, Pablo y a los ayudantes de campo del EEA-Manfredi: Diego, Diego y Facundo.

A los amigos que me regaló la carrera: Cintia, Ale, Fede, Vangi, Mariano y especialmente a Daniela por todo lo vivido en estos siete años, por su compañerismo y gran amistad.

A mis querido grupo de amigas: Vanesa, Noelia, Micaela, Pamela y especialmente a Magalí y Macarena por tantos días y noches de estudio compartido.

A mis primas, tíos, tías y abuelas por compartir conmigo cada momento de la carrera y por ser personitas tan importantes en mi vida.

A Mónica, Ricardo, Silvana y Luciano por el apoyo incondicional, paciencia y amor brindado, por ser parte de mi vida, por confiar en mí y por haberme dado la posibilidad de estudiar lo que siempre quise.

¡Muchas gracias a todos por haberme acompañado en esta hermosa etapa de mi vida!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Ciclo Ontogénico del Cultivo de Soja y Generación del Rendimiento.....	2
2. Estrés Térmico y Estrés Hídrico: Definición.....	5
3. Efectos del Estrés Térmico y/o Hídrico en Relación al Momento de Ocurrencia Durante el Ciclo Ontogénico de la Soja.....	7
4. Respuestas Bioquímicas-Fisiológicas del Funcionamiento de la Fuente de Asimilados en Soja al Estrés Térmico y/o Hídrico	
4.1 Fotosíntesis y Carbohidratos.....	8
4.2 Estrés oxidativo.....	10
4.3 Ureídos.....	12
HIPOÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
1. Diseño experimental y tratamientos.....	16
2. Determinaciones Bioquímicas.....	18
2.1 Ensayo para actividad antioxidante total no enzimática.....	19
2.2 Malondialdehído.....	19
2.3 Clorofilas Totales.....	20
2.4 Almidón.....	20
2.5 Azúcares Solubles Totales.....	20
2.6 Proteínas.....	21
2.7 Contenido de Ureídos.....	21
3. Determinaciones Eco-Fisiológicas.....	21

3.1 Eficiencia Cuántica del Fotosistema II.....	21
3.2 Contenido Relativo de Agua.....	22
3.3 Rendimiento, Número y Peso de Granos.....	22
4. Análisis de Datos.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema del ciclo ontogénico del cultivo de soja. Se representa la morfología en algunos estadios de desarrollo según la escala de Fehr y Caviness (1997). VE: emergencia; VC: estado cotiledonar; V2: 2^{do} nudo; V4: 4^{to} nudo R1: inicio de floración; R5: inicio del llenado de granos; R7: inicio de madurez fisiológica.

Figura 2. Evolución de los componentes del rendimiento en soja en relación a los días de emergencia del cultivo y del estadio fenológico del mismo (R1: inicio de floración; R5: inicio de llenado de grano; R6: máximo tamaño de semilla).

Figura 3. Alteración de la membrana biológica debida a daños oxidativos causados por radicales libres, los cuales producen oxidación de proteínas y peroxidación en fosfolípidos de membrana.

Figura 4. Metabolismo del nitrógeno en nódulos de soja. El nitrógeno (N₂) ingresa a la célula infectada de la planta para luego ser transportado en forma de alantoína o ácido alantoico a la corriente xilemática.

Figura 5. Diseño experimental del ensayo realizado a campo en el EEA INTA Manfredi con dos repeticiones (bloque 1 y 2). La parcela principal correspondió a estrés hídrico (EH), la sub-parcela al genotipo (SPS 4×4 RR cuadrado blanco, SPS 4×99 RR cuadrado negro) y la sub-sub parcela al estrés térmico (ET). Los cuatro tratamientos fueron: control (C), ET, EH y ET × EH.

Figura 6. Fotos del ensayo realizado a campo en el EEA INTA Manfredi: A) carpas de polietileno cerradas desde las 10:00 hasta las 16:00 h para lograr el incremento de temperatura; B) estructuras móviles denominadas *rainout shelters* que permiten la exclusión del agua de lluvias y C) parcelas que combinan *rainout shelters* con carpas de polietileno para lograr la interacción de ambos estrés (ET × EH).

Figura 7. Momento de imposición (flecha rojo-azul) del estrés térmico (ET) y/o estrés hídrico (EH) en relación al ciclo ontogénico del cultivo de soja. Duración del ET: línea roja y del EH: línea azul.

Figura 8. Promedio de la temperatura media (°C) en relación a la fecha de inicio de aplicación de tratamientos (R5.5) hasta 21 días después de su imposición en parcelas bajo los tratamientos *control* (C: verde), *estrés térmico* (ET: amarillo) y *estrés térmico con estrés hídrico* (ET×EH: rojo). Se marca línea continua a los 32°C, temperatura por encima de la cual se considera ET.

Figura 9. Foto del ensayo que evidencia el amarillamiento precoz y por lo tanto, el acortamiento del ciclo en las parcelas bajo déficit hídrico (plantas por encima de la línea roja) con respecto a las plantas regadas (plantas por debajo de la línea roja).

Figura 10. Valores de eficiencia cuántica máxima del fotosistema dos (Fv/Fm) para los diferentes tratamientos (C: control; ET: estrés térmico; EH: estrés hídrico; ET × EH: estrés térmico por hídrico) para el set de datos correspondientes al momento después. Expresados como medias (+) error estándar. Letras distintas expresan diferencias significativas (p<0,05).

Figura 11. Biplot del Análisis de Componentes Principales para el set de datos

correspondientes al momento *después*. CRA: contenido relativo de agua; Fv/Fm eficiencia cuántica máxima; PSII: rendimiento cuántico del del fotosistema dos; Rto: rendimiento; NG: número de granos; PG: peso de granos; FRAP: capacidad reductora férrico de plasma.

Figura 12. Valores de malondialdehído (MDA) para los diferentes tratamientos (C: control; ET: estrés térmico; EH: estrés hídrico; ET × EH: estrés térmico por hídrico) para el set de datos correspondientes al momento *después*. Expresados como medias (+) error estándar. Letras distintas expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 13. Regresión para la relación entre proteínas en (PrH) y MDA. Las formas y colores círculo azul, triángulo verde, cuadrado amarillo y rombo rojo representan los tratamientos *control*, *estrés térmico*, *estrés hídrico* y *estrés térmico con estrés hídrico*, respectivamente.

Figura 14. Valores de proteínas en hojas (PrH) para los diferentes tratamientos (C: control; ET: estrés térmico; EH: estrés hídrico; ET × EH: estrés térmico por hídrico) para el set de datos correspondientes al momento *después*. Expresados como medias (+) error estándar. Letras distintas expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 15. Regresión para la relación entre número de granos (NG) y azúcares (Az) para el set de datos correspondientes al momento *después*. Las formas y colores círculo azul, triángulo verde, cuadrado amarillo y rombo rojo representan los tratamientos *control*, *estrés térmico*, *estrés hídrico* y *estrés térmico con estrés hídrico*, respectivamente.

Figura 16. Regresión para la relación entre número de granos y FRAP para el set de datos correspondientes al momento *después*. Las formas y colores círculo azul, triángulo verde, cuadrado amarillo y rombo rojo representan los tratamientos *control*, *estrés térmico*, *estrés hídrico* y *estrés térmico con estrés hídrico*, respectivamente.

Figura 17. Valores de la capacidad férrico reductora de plasma (FRAP) para los diferentes tratamientos (C: control; ET: estrés térmico; EH: estrés hídrico; ET × EH: estrés térmico por hídrico) para el set de datos correspondientes al momento después. Expresados como medias (+) error estándar. Letras distintas expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 1. Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) máximas, mínimas y medias del aire alcanzadas en los tratamientos *control*, *estrés térmico* con riego (Temperaturas $>32^{\circ}\text{C}$) y *estrés térmico con estrés hídrico* (20% contenido de agua útil) durante episodio de ET (durante 21 días a partir de R5.5)

Tabla 2. Contenido de agua útil (%) medido hasta los 2m de profundidad en las parcelas bajo los tratamientos *control* y *estrés hídrico* (20% agua útil) en los momentos *antes* (R3), *durante* (R5.5) y *después* (21 días a partir de R5.5 para ET y R8 para estrés hídrico) del inicio de los tratamientos.

Tabla 3. Valores de media y desvío estándar para las diferentes variables analizadas para el set de datos correspondientes al momento *después*.

Tabla 4. Modelos de regresión lineal para rendimiento, peso y número de granos, en relación a variables bioquímicas-fisiológicas para el set de datos correspondientes al momento *después*.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcA: ácido alantoico

ACP: análisis de componentes principales

Alm: almidón

Az: azúcares

C: control

CIAP: Centro de Investigaciones Agropecuarias

Clo: clorofilas

cm: centímetros

cm²: centímetros cuadrados

CO₂: dióxido de carbono

CP: componentes principales

CRA: contenido relativo de agua

EAO: especies activas del oxígeno

EEA: Estación Experimental Agropecuaria

EH: estrés hídrico

ET: estrés térmico

ET × EH: estrés térmico por estrés hídrico

FCEFyN: Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

FRAP: Capacidad reductora férrico de plasma

Fv/Fm: Eficiencia cuántica máxima del PSII

g: gramos

h: horas

ha: hectáreas

IFRGV: Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

kg ha⁻¹: kilogramos por hectárea

M: molar

m: metros

m²: metros cuadrados

MDA: malondialdehído

mM: milimolar

MPa: megapascales

NG: número de granos

nm: nanómetros

PG: peso de granos

PSII: fotosistema dos

PrH: proteína de hoja

P/V: relación peso- volumen

Rto: rendimiento

rpm: revoluciones por minuto

R5: comienzo de llenado de granos

R7: comienzo de madurez

R8: plena madurez

UNC: Universidad Nacional de Córdoba

VBF: variables bioquímicas fisiológicas

μ l: microlitros

μ moles: micromoles

$^{\circ}$ C: grados centígrados

%: porcentaje

Φ PSII: rendimiento cuántico del PSII

RESUMEN

Durante el cultivo de soja son frecuentes episodios de estrés térmico (ET) combinados con insuficiente disponibilidad hídrica, que pueden afectar tanto el rendimiento (Rto) y sus componentes número de granos (NG) y peso de granos (PG), como la fisiología de la planta, dependiendo del momento de ocurrencia y la intensidad de los estreses. El objetivo del presente trabajo, fue analizar el impacto de episodios de altas temperaturas y estrés hídrico durante el llenado de granos de soja sobre el metabolismo primario de la fuente y como esto afecta el rendimiento y sus componentes. Para ello se realizó un experimento en la EEA INTA Manfredi durante la campaña agrícola 2012-2013. El experimento consistió en manipular la disponibilidad hídrica y la temperatura durante el llenado de granos en soja. Esto dio lugar a cuatro tratamientos: control, estrés térmico (ET), estrés hídrico (EH) y ET \times EH. Se cuantificó el nivel de ET y de EH logrado y se determinaron además del Rto, NG y PG, las siguientes variables bioquímicas-fisiológicas (VBF) antes, durante y después de aplicado los estreses: capacidad férrico reductora de plasma (FRAP), malondialdehído (MDA), clorofilas (Clo), almidón (Alm), azúcares (Az), proteína de hoja (PrH), alantoína (Al), y ácido alantóico (AcA), rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ PSII) y eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm). Los tratamientos de ET, EH y ET \times EH causaron disminución del Rto del orden del 20%, 43%, 41%, respectivamente comparado con el control. Las reducciones en el Rto a través de los diferentes tratamientos, fueron explicadas por las disminuciones tanto del NG como del PG. Bajo ET regado se produjo efecto compensatorio de la caída del NG, alcanzando el PG valores similares al control. Las disminuciones del Rto y sus componentes pudieron explicarse a partir del efecto negativo de los estreses estudiados sobre el funcionamiento de la fuente fotosintética caracterizado en este estudio a través de las VBF. Aunque bajo ET se produjeron modificaciones en los valores de las VBF, las disminuciones más drásticas de estas (i.e. Fv/Fm, Φ PSII, Alm, Az, FRAP, Clo) fueron observadas en las parcelas bajo déficit hídrico, indicando alteraciones en el estado fotosintético de las plantas sometidas a EH y ET \times EH. Lo cual fue confirmado por el amarillamiento precoz de las plantas en estos tratamientos, comparadas con las parcelas regadas (con o sin ET). El biplot explicó 88,3% de la variación total de los datos estandarizados. Las variables Rto, NG, PG, Alm, Φ PSII, Fv/Fm, FRAP, Az y PrH estuvieron asociadas positivamente entre sí, alcanzando niveles elevados en el control regado; el contenido de MDA, Clo y AcA fue mayor bajo ET y Al fue elevada en

situaciones de EH y ETxEH. Además, se observó que el Rto y sus componentes estuvieron correlacionados positivamente con Alm, Φ PSII, Fv/Fm, Az, FRAP y negativamente con Al. Esto se vio parcialmente reflejado en los modelos de regresiones encontradas, donde se observó que Alm y Φ PSII fueron buenas predictoras de Rto, mientras que Alm, Φ PSII y PrH fueron predictores robustos del PG. Las variaciones del NG fueron explicadas significativamente por FRAP, Az, PrH, Alm y Φ PSII pero a través de modelos lineales simples. Además, se pueden considerar al MDA y PrH como indicadores de ET, al Fv/Fm de ET \times EH y al FRAP como indicador de los tres tratamientos de estrés: ET, EH y ET \times EH. Según nuestro conocimiento este trabajo es el primero que a partir de ensayos realizados a campo contribuyó a la identificación de VBF asociadas al Rto y sus componentes en soja expuesta simultáneamente a la interacción de breves periodos de ET con EH durante el llenado de granos. Esto podría ser de suma utilidad para el mejoramiento genético en estudios de *screening* de genotipos.

Palabras Claves: *Glycine max* (L.) Merr, llenado de granos, interacción de breves periodos de estrés térmico con estrés hídrico, relación rendimiento, número y peso de granos, variables bioquímico-fisiológicas.

INTRODUCCIÓN

La soja [*Glycine max* (L.) Merr] presenta múltiples usos tanto para la alimentación humana como animal, presentando características que le permitieron ser el cultivo con más rápida adopción y expansión en la agricultura del país (Buyatti *et al.*, 2006). Argentina es el principal exportador de productos derivados como harina y aceite y es el tercer exportador mundial de granos luego de USA y Brasil (USDA, 2013). Actualmente se siembran en el país 20 millones de hectáreas con una producción estimada en 49,3 millones de toneladas (campaña 2012/13, SAGPyA, 2013).

La región sojera argentina cubre una vasta área ecológica que se extiende desde la latitud 23° a la 39° Sur, lo que representa un amplio rango de condiciones ambientales. El cultivo se realiza mayoritariamente bajo secano y crece en condiciones ambientales muy contrastantes en términos de precipitaciones, radiación solar y temperatura (Carrera *et al.*, 2009). El agua es el factor más limitante en la producción de cultivos extensivos en secano (Micucci y Alvarez, 2004) y es en muchas ocasiones, acompañado por episodios de elevadas temperaturas lo cual representa una grave amenaza para la producción de cultivos en todo el mundo (Tennant y Hall, 2001).

Según el informe del Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC, 2012), la temperatura media mundial aumentará 0,3°C por década y se producirán cambios en la distribución de las precipitaciones, dando lugar a la ocurrencia de sequías, inundaciones y fenómenos meteorológicos extremos. Bajo este pronóstico, el estudio de los mecanismos de respuestas de la fuente fotosintética en soja expuesta a estreses abióticos durante el llenado de granos adquiere gran relevancia. Más aun, las investigaciones que involucren experimentos a campo estudiando variables ecofisiológicas, simultáneamente con variables bioquímicas-fisiológicas (VBF) son de suma importancia ya que combinan escalas y sub-disciplinas dentro de la biología vegetal que promueven el entendimiento de mecanismos complejos como lo son las respuestas de los cultivos a condiciones de estrés. Resulta importante destacar que se han producido significativos avances en el entendimiento del efecto de los factores ambientales sobre el funcionamiento de la fuente fotosintética, el rendimiento (Rto) y sus componentes en cereales como trigo y maíz. No obstante, son escasos los estudios que abordan las relaciones funcionales y procesos involucrados en la generación del Rto y sus componentes en soja, cultivo más sembrado en el país. Según nuestro conocimiento, no han sido aún investigados en soja los efectos de

episodios de estrés térmico (ET) y déficit hídrico simultáneos sobre el funcionamiento de la fuente de asimilados. La identificación de estrategias para mitigar y compensar los efectos negativos de los estreses abióticos en la producción de los cultivos, hace necesario como punto de partida mejorar la comprensión de las bases eco-fisiológicas subyacentes que regulan las respuestas del cultivo a los estreses abióticos. Los conocimientos generados podrían ser útiles en programas de mejoramiento genético para el *screening* de genotipos por caracteres bioquímico-fisiológicos asociados con mejor comportamiento ante ET y/o estrés hídrico (EH).

1. Ciclo Ontogénico del Cultivo de Soja y Generación del Rendimiento

Existen diferentes escalas propuestas para identificar los diversos estadios fenológicos en soja, la más difundida es la escala desarrollada por Fehr y Caviness (1977) (Fig. 1). Esta escala realiza una descripción morfológica del cultivo, la cual es independiente del genotipo utilizado y de condiciones como el sitio, fecha de siembra y densidad ya que tiene en cuenta los cambios morfológicos ocurridos en el tallo principal del 50 % de las plantas del cultivo (Kantolic *et al.*, 2006). Distingue dos etapas principales, una que describe los estados vegetativos (V) y la otra los reproductivos (R). Dentro de este último, los estadios que se destacan a continuación son los abordados en el presente trabajo: R5 “inicio de formación de semillas” (una vaina, ubicada en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal, contiene una semilla de 3 mm de largo), R7 “inicio de maduración” (una vaina normal ubicada en el tallo principal ha alcanzado su color típico de madurez), R8 “madurez fisiológica” (95 % de las vainas de la planta han alcanzado el color de madurez).

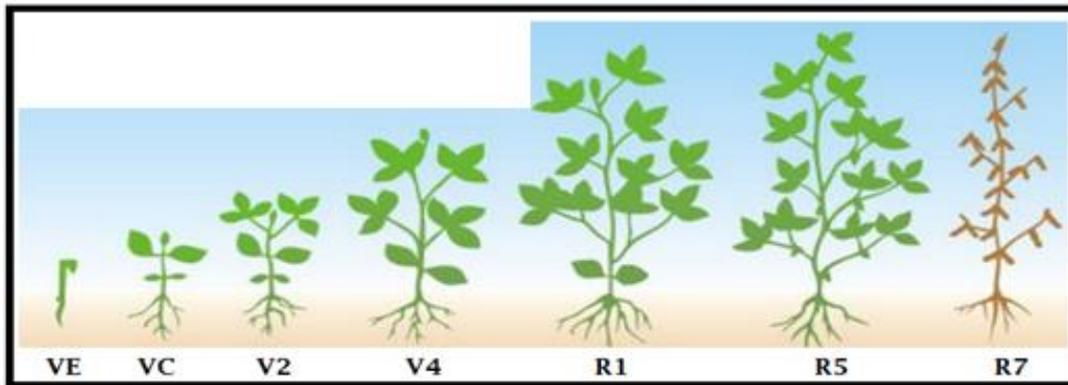


Figura 1. Esquema del ciclo ontogénico del cultivo de soja. Se representa la morfología en algunos estadios de desarrollo según la escala de Fehr y Caviness (1997). VE: emergencia; VC: estado cotiledonar; V2: 2^{do} nudo; V4: 4^{to} nudo R1: inicio de floración; R5: inicio del llenado de granos; R7: inicio de madurez fisiológica.

La soja es un cultivo de gran uso comercial y conocer su Rto es de suma importancia. El Rto del cultivo de soja resulta de dos componentes numéricos principales que no son independientes entre sí: el número de granos (NG) que se establecen por unidad de área y el peso (PG) que ellos alcanzan. A pesar de que ambos componentes explican el Rto, las variaciones en el NG en soja provocadas por distintos factores ambientales, en general están más estrechamente asociadas con cambios en el Rto comparado con las variaciones en el PG (Kantolic *et al.*, 2006).

El NG se divide principalmente en tres subcomponentes: número de nudos por unidad de área del cultivo, número de vainas por nudo y número de granos por vaina (Kantolic *et al.*, 2006). Comenzando con la descripción del número de nudos por unidad de área del cultivo, la aparición de éstos en el tallo principal empieza en emergencia y progresa hasta después de la floración (Fig. 2), sobre todo en genotipos indeterminados (Board y Settimi, 1986, citado por Kantolic *et al.*, 2006). La elongación y supervivencia de los nudos está, además, condicionada por la tasa de crecimiento del cultivo y los factores ambientales que la regulan. Continuando con el número de vainas por nudo, su determinación comienza con el inicio de formación de los primordios florales, seguido de su desarrollo y crecimiento hasta su transformación en estructuras florales maduras, la fecundación y el cuaje (Carlson, 1973 citado por Kantolic *et al.*, 2006) (Fig. 2). El número de vainas depende de la fotosíntesis y de la tasa de crecimiento del cultivo, ya que si las mismas se reducen, aumenta el aborto de flores, disminuyendo el número de vainas por nudo. Terminando con los subcomponentes del NG, el NG por vaina es mucho más estable que los demás subcomponentes ante

variaciones ambientales aunque uno o más granos de una vaina pueden abortar antes de ingresar en su fase de llenado efectivo, modificando el NG logrado por vaina (Egli, 1998). En resumen, a lo largo del ciclo del cultivo se van generando, en forma secuencial, los subcomponentes que determinan el NG, los cuales están condicionados por la tasa de crecimiento del cultivo y la cantidad de asimilados disponibles (provenientes de la fuente fotosintética) los que a su vez, están regulados por las condiciones ambientales (Kantolic *et al.*, 2006).

El segundo componente numérico de Rto, el PG, se establece durante el comienzo de llenado de grano (R5) (Fig. 2) y puede describirse como una función de su tasa de crecimiento y de la duración del período de llenado (Egli *et al.*, 1981). Las principales diferencias entre genotipos en el PG son atribuibles a diferencias en la tasa de crecimiento de los granos la cual es sensible a factores ambientales (Kantolic *et al.*, 2006). Sin embargo, gran parte de las variaciones ambientales (como por ejemplo déficit hídrico) afectan el tamaño de la semilla y no la tasa de crecimiento, debido a cambios en la duración del período efectivo de llenado (Egli, 1998).

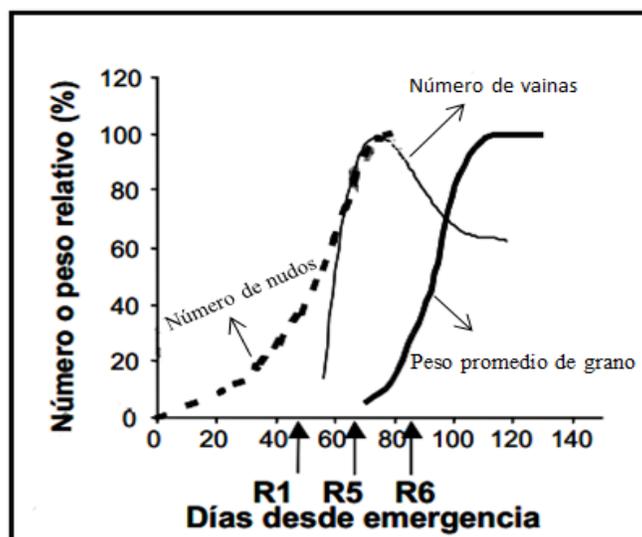


Figura 2. Evolución de los componentes del rendimiento en soja en relación a los días de emergencia del cultivo y del estadio fenológico del mismo (R1: inicio de floración; R5: inicio de llenado de grano; R6: máximo tamaño de semilla).

Los subcomponentes del Rto (NG y PG) se definen durante un período muy extenso del ciclo. Sin embargo, para definir el Rto, no todo el ciclo resulta igualmente crítico. En soja, está determinado que el período crítico comienza en R1 y finaliza 10 a 12 días después de

R5 (Board y Tan, 1995; citado por Kantolic *et al.*, 2006) o puede prolongarse hasta el comienzo de R6 (Egli, 1997), donde la aparición de nudos y la fijación del NG se superponen parcialmente con la etapa de crecimiento de los granos (R5-R6), que finaliza en madurez fisiológica (R7-R8) (Fig. 2) (Kantolic *et al.*, 1995). Durante el período crítico, se maximiza la producción y se define la supervivencia de los subcomponentes del NG anteriormente citados. Esta supervivencia, está íntimamente asociada a la disponibilidad de asimilados presentes en la fuente fotosintética de las plantas (Kantolic *et al.*, 2006). Cuando ocurren variaciones en la fotosíntesis durante el período crítico puede existir un efecto compensatorio entre el PG y NG si aún este último no está completamente establecido, manteniendo así, la disponibilidad de asimilados por unidad de semilla (Kantolic *et al.*, 2006). Sin embargo, a medida que se avanza en el ciclo ontogénico de la soja, particularmente durante el período de llenado de granos, el NG va siendo fijado y la capacidad de compensación frente a situaciones de estrés disminuye al mismo tiempo que las pérdidas de Rto se incrementan (Egli, 1998). Por lo tanto, las relaciones entre NG y PG dependen del momento del estadio fenológico y del grado de limitaciones en la asimilación de carbono.

2. Estrés Térmico y Estrés Hídrico: Definición

Se considera estrés a la alteración de la condición fisiológica causada por factores externos que alteran la homeostasis (Gaspar *et al.*, 2002), que dependiendo de la intensidad del mismo provoca disminución en crecimiento y desarrollo y, por ende consecuencias negativas sobre la productividad de los cultivos (Prasad, 2008). El ET se define a menudo como el aumento de la temperatura más allá de un nivel de umbral para un período de tiempo suficiente como para causar daños en el crecimiento y desarrollo de plantas. Si la elevación de la temperatura es mayor a 10–15°C sobre la temperatura ambiental, se considera ET (Wahid *et al.*, 2007). Dentro de los daños que causa este tipo de estrés en las plantas se puede citar la inhibición de crecimiento, reducción en el flujo de iones, producción de especies activas del oxígeno, desnaturalización y agregación de proteínas, incremento en fluidez de lípidos de membranas, inactivación de enzimas cloroplásticas y mitocondriales e inhibición de síntesis de proteínas, entre otros (Howarth, 2005; citado por Wahid *et al.*, 2007). Es importante caracterizar correctamente el ET, dado que temperaturas moderadamente altas durante todo el llenado de granos (25 a 32°C) o breves períodos (3-5

días) de muy altas temperaturas (33 a 40°C) pueden tener efectos muy diferentes en el Rto y calidad de los granos (Wardlaw y Wrigley, 1994). Wardlaw *et al.*, (2002) concluyeron que los episodios de temperaturas muy altas resultan más perjudiciales sobre el PG que temperaturas moderadamente elevadas sostenidas durante un período más largo. Rondanini *et al.*, (2003) también reportaron efectos detrimentales de breves períodos de ET durante el llenado en el PG de girasol. Esta distinción en los tratamientos de ET es relevante dado que en muchos casos, lo que ocurre en condiciones de campo son episodios de alternancia de altas temperaturas.

El EH ocurre inicialmente cuando la tasa perdida de agua por transpiración supera la tasa de absorción, ocasionado por disminuciones en el potencial hídrico del agua del suelo (Jaleel *et al.*, 2007b-e). Los efectos de EH depende de la intensidad y duración del mismo, los que se traducen en menores contenidos de agua en la planta, e inducen: pérdida de la turgencia, disminución del crecimiento celular por elongación, cierre de estomas, disminución de la disponibilidad de CO₂, caída de la tasa de fotosíntesis, aumento de la generación de especies activas del oxígeno y procesos oxidativos, cambios en los contenidos de azúcares y almidón y finalmente marchitamiento y muerte (Bohnert y Jansen, 1996). Hsiao (1973) definió tres grados de EH teniendo en cuenta el contenido relativo de agua (CRA), medida que normaliza el contenido real de agua en tejido con respecto al potencial de agua que el tejido podría tener (Lawlor, 1995). Los tres grados de clasificación fueron: i) estrés leve: disminución del potencial hídrico de algunos bares (décimas de MPa) o del CRA en un 8-10% respecto a plantas bien regadas bajo leve demanda evaporativa; ii) estrés moderado: disminución del potencial hídrico más acentuada, aunque menor a 1,2-1,5 MPa o una disminución del CRA entre un 10 y un 20% y, iii) estrés severo: disminución del potencial hídrico mayor a 15 bares (1,5 MPa) o disminución del CRA mayor a un 20%.

Prasad (2008), establece que cuando existen episodios que combinan estreses abióticos (*i.e.* ET, EH, estrés salino, entre otros) los efectos deletéreos se incrementan, de forma que no se registran los mismos daños frente a un estrés en forma individual que en combinación con otros estreses y en condiciones de campo, el EH y ET usualmente coocurren. Mittler (2006), observó que las respuestas moleculares y metabólicas de las plantas a una combinación de ET × EH son únicas, no pudiéndose extrapolar directamente a las respuestas de las plantas a cada uno de los mencionados estreses de forma individual.

3. Efectos del Estrés Térmico y/o Hídrico en Relación al Momento de Ocurrencia Durante el Ciclo Ontogénico de la Soja

Es conocido que existe un efecto diferencial sobre los componentes del Rto de los cultivos a la ocurrencia de eventos de ET y/o EH según la etapa fenológica que atraviesa el cultivo. Por ejemplo, ocurrencias de episodios de ET (35°C) en la etapa final de fijación de vainas en soja, disminuye el NG (Spears *et al.*, 1997; citado por Egli, 1998), mientras que en situaciones de EH las reducciones en el NG pueden ocurrir entre la floración y la fijación de la vaina (Shaw y Laing, 1966; citado por Egli, 1998;). Estos descensos son consistentes con lo planteado párrafos anteriores donde se especifica que cambios en las condiciones ambientales como el ET y EH a lo largo del período crítico, reducen la disponibilidad de asimilados debido a alteraciones en la fotosíntesis, lo que produce modificaciones en los subcomponentes que determinan el NG. El PG, que depende de la tasa de crecimiento y de la duración del llenado de grano, se reduce tanto en condiciones de ET (Tollenaar y Bruulsema, 1988: citado por Egli, 1998) como de EH severo durante el llenado de grano en soja (de Souza *et al.*, 1997). Está reportado que la tasa de crecimiento en condiciones de ET, aumenta a temperaturas mayores a los 30°C (Gibson y Mullins, 1996; citado por Egli *et al.*, 1998), al igual que la duración de llenado, pero al momento de explicar las reducciones en los valores de PG, pareciera que las reducciones en la tasa de crecimiento son más explicativas que las disminuciones en la duración de llenado (Tollenaar y Bruulsema, 1988; citado por Egli, 1998). Bajo EH severo, a pesar de que la tasa de crecimiento es levemente afectada, la duración del llenado de grano es notablemente reducida (18-29%), lo que produce disminuciones del PG (7-32%) y por ende del Rto (26-44%), además de acelerar procesos de removilización asociados a senescencia (de Souza *et al.*, 1997). En trigo, Perrotta *et al.*, (1998), registró durante el período de llenado, alteraciones en el PG y la calidad, incluyendo cambios en el contenido de proteínas en relación a otros componentes del grano, pudiendo cambiar el tipo de proteínas sintetizado, afectándose la relación gluteninas:gliadinas en detrimento de la calidad panadera del trigo (Stone y Nicolas, 1994). El mecanismo de reducción de la duración de llenado de grano, lo que reduce el tamaño de las semillas, permite desviar los recursos para hacer frente a los estreses, optimizando la disponibilidad de fotoasimilados a cada uno de los granos ya

establecidos en un lapso menor de tiempo comparado con condiciones controladas, lo que permite mantener constante la tasa de crecimiento individual por semilla (Egli, 1998).

4. Respuestas Bioquímicas-Fisiológicas del Funcionamiento de la Fuente de Asimilados en Soja al Estrés Térmico y/o Hídrico

4.1 Fotosíntesis y Carbohidratos

La sacarosa y el almidón (Alm) son los principales productos primarios de la fotosíntesis y como tales, son indicadores del funcionamiento fotosintético de las plantas. Tanto el ET como el EH pueden influir negativamente en la fotosíntesis ya sea a través del cierre de los estomas, lo que disminuye el flujo de dióxido de carbono (CO₂) (Chaves *et al.*, 2003; Flexas *et al.*, 2004) o bien, afectando las actividades metabólicas (Farquhar *et al.*, 1989). Estas alteraciones, producen disminuciones en las concentraciones de sacarosa y Alm, reduciendo la disponibilidad de asimilados en toda la planta. Por ejemplo, Chaitanya *et al.*, (2001), observaron en plantas de *Morus alba* que episodios de ET (40°C) provocaron reducciones en las concentraciones de sacarosa y Alm debido a la disminución de la actividad de la enzima sacarosa fosfato sintasa, la cual interviene en la síntesis de sacarosa. También se conoce en algunos cereales que elevadas temperaturas, reducen los niveles de Alm (Maestri *et al.*, 2002). Brevedan y Egli (2003) y de Souza *et al.*, (1997), en plantas de soja en macetas bajo condiciones de EH durante el llenado de grano, registraron disminuciones en la concentración de Alm y azúcares (Az), al mismo tiempo que se redujeron los valores del Rto, PG y NG (en menor medida) indicando que el proceso de fotosíntesis fue alterado ya sea a nivel bioquímico y/o fisiológico, observado por la disminución en la disponibilidad de asimilados (Alm y Az).

Las clorofilas (Clo) son moléculas complejas encargadas de la absorción, transferencia y conversión fotoquímica de la energía lumínica que sustentan la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2008). Está demostrado, que ante condiciones de ET y/o EH las Clo disminuyen (Farooq *et al.*, 2009; Anjum *et al.*, 2003b). Una posible explicación de por qué esto sucede, es la propuesta por Howarth (2005) (citado por Wahid *et al.*, 2007) quien reportó que el ET afecta las enzimas presentes en las Clo. Por otro lado, resulta interesante destacar que, si el ET y/o EH se produce durante el llenado de grano, se acelera la senescencia de la canopia del cultivo, disminuyendo los valores de Clo (de Souza, 1997). La reducción en la

concentración de estos pigmentos fotorreceptores, responsables de la primera etapa en la transformación de la energía de la luz solar en energía química, conlleva a una reducción de la de fotosíntesis, acelerando el período de llenado (Wittenbach *et al.*, 1980).

En situaciones de campo se conoce que, bajo condiciones de EH, las temperaturas de la canopia se elevan frecuentemente al reducirse la transpiración, superando a menudo la temperatura del ambiente (Idso *et al.*, 1981; Rose, 1988). En cultivos bajo EH se podría esperar entonces que temperaturas altas generen mayor estrés si son acompañadas por sequía inductora del cierre estomático (Stone, 1999). Esta combinación de estreses (ET × EH) modifica los procesos fotosintéticos (Rizhysky *et al.*, 2004) produciendo alteraciones de tipos aditiva o multiplicativa (Prasad, 2004), debido a que la combinación tiene varios aspectos únicos como la superposición de elevados niveles de respiración con bajos niveles de fotosíntesis, estomas cerrados y altas temperaturas en hoja (Mittler, 2006). Pese a estas consecuencias diferenciales existentes entre la combinación de estreses y la manifestación individual de cada uno de ellos, no se ha podido registrar evidencias que analicen el Alm, Az y Clo como marcadores indirectos del estado fotosintético de la plantas bajo situaciones de ET × EH y la asociación de estos con el Rto y sus componentes.

Además de las variables ya citadas para conocer el estado fotosintético de las plantas, se puede determinar la eficiencia cuántica del fotosistema II, variable indicadora de la eficiencia fotosintética del cultivo, que se determina a través de la emisión de fluorescencia de clorofilas y diagnostica la presencia de factores de estrés (cómo el ET y el EH) que afectan este proceso (Andrews *et al.*, 1995; Mohammed *et al.*, 1995). A través de la emisión de fluorescencia de clorofilas se puede calcular el rendimiento cuántico del fotosistema dos (Φ PSII), el cual cuantifica la proporción de energía absorbida por el fotosistema dos (PSII) que es utilizada en el transporte fotosintético de electrones y está fuertemente correlacionada con la tasa de fijación de CO₂ (Bilger y Björkman, 1990). Otra variable posible de ser calculada es la eficiencia cuántica máxima del PSII (Fv/Fm) la cual es un parámetro muy estable entre las distintas especies vegetales e indicativa de procesos de fotoinhibición dados por daños fotooxidativos de proteínas esenciales del PSII (Greer, 1998). Este valor disminuye cuando la planta está sometida a algún tipo de estrés, tanto biótico como abiótico. La disminución de la tasa de transporte electrónico suele ser de menor magnitud que la caída de la fotosíntesis (Flexas *et al.*, 1998), lo que sugiere que otros procesos (distintos que la asimilación de CO₂) se convierten en destinos alternativos

de electrones. Los principales destinos alternativos de la energía absorbida son la disipación en forma de calor y las transferencias de electrones o energía hacia el oxígeno.

Willits y Peet (2001) encontraron en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sometidas a ET (40°C) en invernadero, valores Fv/Fm de 0,83 en hojas con temperatura de 15°C y de 0,79 en hoja con temperatura de 40°C. Inamullah e Isoda (2005) observaron en plantas de soja en macetas bajo condiciones de EH, disminuciones tanto en los valores de Fv/Fm como de Φ PSII, más aún, si aumentaba la temperatura de las hojas. La disminución en los valores de eficiencia cuántica bajo ET y EH demuestran alteraciones en la fotosíntesis, lo que se traduce en disminuciones en la disponibilidad de asimilados y cómo se citó párrafos anteriores, reducciones en la disponibilidad de asimilados podrían afectar el Rto final del cultivo y sus componentes. Sin embargo, no se ha podido encontrar antecedentes que consideren a la Fv/Fm y al Φ PSII como predictores del Rto, NG y PG.

4.3 Estrés oxidativo

El oxígeno molecular en estado basal es una molécula triplete con los electrones de su último orbital desapareados, lo que lo torna relativamente poco reactivo (Foyer *et al.*, 1994). Las vías de activación son dos: i) absorción de energía y cambio del spin de uno de los electrones desapareados generando oxígenos singulete (O_2^1) y, ii) reducción monovalente consecutiva hasta llegar a agua con la consecuente formación de radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^-). En conjunto estos compuestos se denominan especies activas del oxígeno (EAO) (Mittler, 2002)

La generación de EAO es parte del metabolismo aeróbico normal y aumenta bajo toda condición de estrés. Tanto el ET como el EH, reduce la utilización del poder reductor en el aparato fotosintético, debido a una baja en la disponibilidad de CO_2 o a la caída en la actividad de procesos metabólicos, intensificando así, el suministro de energía de excitación a la molécula de oxígeno (Tambussi, 2004), lo que genera EAO. Éstas, son altamente reactivas e inducen modificaciones oxidativas en las macromoléculas celulares: lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. Los efectos deletéreos de las EAO configuran lo que se conoce como estrés oxidativo. La peroxidación de lípidos inducida por EAO produce compuestos como etanol y el malondialdehído (MDA), considerados como marcadores de la peroxidación, los que a su vez pueden actuar sobre las membranas alterando su funcionalidad (Fig. 3), sobre el ADN, desnaturalizándolo (Fujimoto *et al.*,

1984), sobre el ARN mensajero inhibiendo la síntesis proteica (Dhindsa, 1982), sobre las proteínas modificándolas mediante enlaces covalentes y sobre los aminoácidos oxidándolos (Priestley, 1986). Los niveles de EAO son controlados por el llamado sistema antioxidante, el cual incluye componentes enzimáticos y componentes no enzimáticos que funcionan en forma coordinada (Foyer, 1994). Los mismos, en ciertas condiciones, pueden superar los niveles de EAO, disminuyendo así, posibles eventos de estrés oxidativo (Mittler, 2002). En este trabajo, se determinaron concentraciones de antioxidantes no enzimáticos a partir de la capacidad férrico reductora de plasma (FRAP), ensayo reportado por Benzie y Strain (1996), el cual permite conocer en parte, el estado actual del sistema antioxidante en la fuente fotosintética bajo diferentes condiciones ambientales.

Existen trabajos que analizaron los valores de MDA y antioxidantes bajo situaciones de ET y/o EH. Por ejemplo Xu y Zhou (2006), reportaron en su ensayo con *Leymus chinensis* en macetas, que las altas temperaturas (32°C), en forma individual, o en combinación con EH (25-40% CRA), da lugar a la acumulación de MDA lo que provocaría daño celular. Estos mismos autores observaron que plantas aclimatadas a altas temperaturas tuvieron bajos valores de EAO explicado por altos niveles de antioxidantes no enzimáticos entonces, mientras mayor era la concentración de antioxidantes, menor era la posibilidad de que la planta sufriera daño oxidativo. Grumberg *et al.*, (2013) detectaron en ensayos en macetas en soja una correlación entre mayor daño oxidativo (medido a partir de MDA) y menor tolerancia al estrés por sequía, deduciendo que altos valores de MDA se relacionan con situaciones de EH.

Los daños ya ocasionados por el ET y/o EH sobre la fotosíntesis, sumado a la reducción de las macromoléculas que intervienen en dicho proceso, producen conjuntamente disminuciones en la disponibilidad de fotoasimilados provocando consecuencias adversas en el crecimiento general de la planta (Tambusi, 2004). Considerando que la poca disponibilidad de asimilados afecta el Rto, NG y PG, estudiar como impactan fenómenos de ET y/o EH en el Rto de la soja y sus componentes, teniendo en cuenta valores de EAO y antioxidantes, podría contribuir a un nuevo abordaje en el tema ya que no se han registrado antecedentes en el mismo.

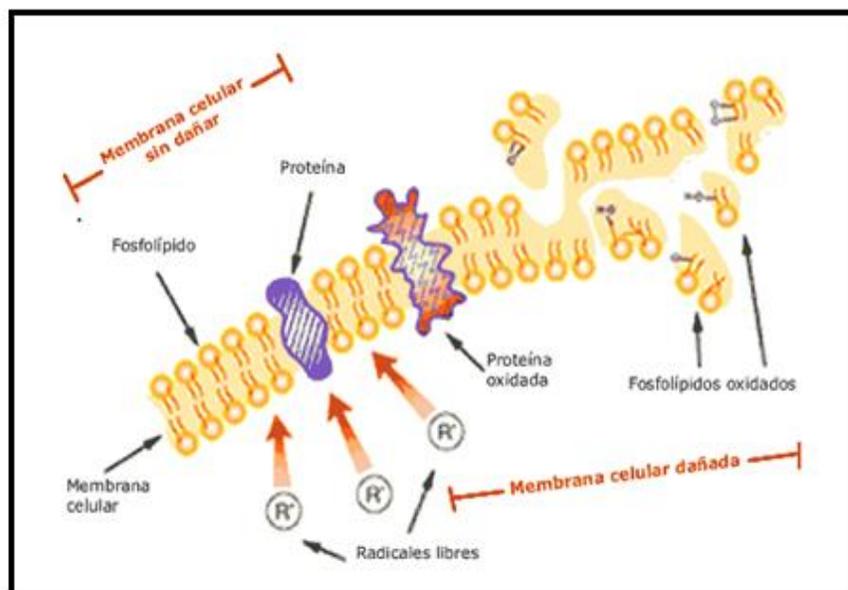


Figura 3. Alteración de la membrana biológica debido a daños oxidativos causados por radicales libres, los cuales producen oxidación de proteínas y peroxidación en fosfolípidos de membrana.

4.4 Ureídos

La soja establece simbiosis con bacterias fijadoras del nitrógeno del grupo de los rizobios, específicamente del género *Bradyrhizobium* sp, durante la cual se desarrolla un nuevo órgano en el córtex externo de la raíz, el nódulo donde ocurre la fijación biológica del nitrógeno. El nitrógeno fijado biológicamente es inicialmente incorporado como asparragina, aspartato, glutamina y glutamato, luego éstos compuestos son metabolizados en los nódulos en forma de ureídos: principalmente alantoína (Al) y ácido alantoico (AcA) (Vance, 2005). La vía de formación de los ureídos incluye en sus primeras etapas al ácido úrico, producto de la metabolización de las bases de purina, el cual se convierte en Al. Este último, presenta dos vías, una de transporte y otra de transformación. La primera consiste en introducirse en forma directa a la corriente xilemática y la segunda, en la conversión de Al en AcA, ureído que se suma luego a la corriente xilemática, llegando así a los diferentes órganos de la planta (Schubert, 1986). Por ello, son los ureídos la principal forma de transporte de N a larga distancia en leguminosas tropicales (Lodwig, 2003) (Fig. 4).

Ante ausencia de estreses, la concentración de ureídos es mayor en tallos y flores y menor en hojas (Ladrera *et al.*, 2007; King y Purcell, 2005; Vadez *et al.*, 2000). Esto se debe a que los ureídos, al llegar a las hojas, son metabolizados para dar lugar a otros

compuestos nitrogenados (Atkins *et al.*, 1982; Herridge *et al.*, 1978). Por el contrario, bajo condiciones de estrés, particularmente de EH, los ureídos se acumulan en hojas. Este aumento en la concentración de ureídos, donde la disponibilidad de esqueletos carbonados se ve reducida por el EH, es consistente con la teoría de que los ureídos son una forma más eficiente de transporte de N (Atkins, 1991), la cual consume bajas concentraciones de C y permite a la planta una mayor eficiencia en el uso de fotoasimilados (Pate, 1983). Diversos autores, entre ellos Serraj *et al.*, (1999 a, b) y Ladrera *et al.*, (2007) observaron que el aumento de ureídos en hojas de soja durante el EH en la etapa vegetativa, era acompañado por disminuciones en la fijación biológica de N, lo cual podría responder a un mecanismo de retroalimentación negativa, donde el aumento de ureídos en hojas inhibe la fijación de N en los nódulos de las raíces (Serraj y Sinclair, 2003). Sinclair *et al.*, (2007) también reportó para EH, que la fijación simbiótica del nitrógeno disminuye ante modestos déficits de agua en el suelo. Esta reducción en los niveles de N, reduce la fuente de proteínas que aportan al peso final de los granos, logrando reducciones en el Rto del cultivo. Por ejemplo, genotipos tolerantes al EH tienen la capacidad de ser sensibles a la baja disponibilidad hídrica logrando una correcta fijación biológica del N, que se traduce en un Rto mayor comparado con genotipos no tolerantes (Sinclair *et al.*, 2007).

A pesar de que se han registrado numerosos trabajos en soja acerca del contenido de ureídos en condiciones de EH, pocos son los estudios que analizan los ureídos bajo ET y la combinación de estreses (ET × EH), más aún, teniendo en cuenta en forma aislada el comportamiento de la Al y AcA, los dos tipos de ureídos predominantes en soja que se metabolizan en vías diferentes. Además, sería interesante aportar que sucede con el Rto y sus componentes bajo ET y ET × EH en relación al contenido de ureídos.

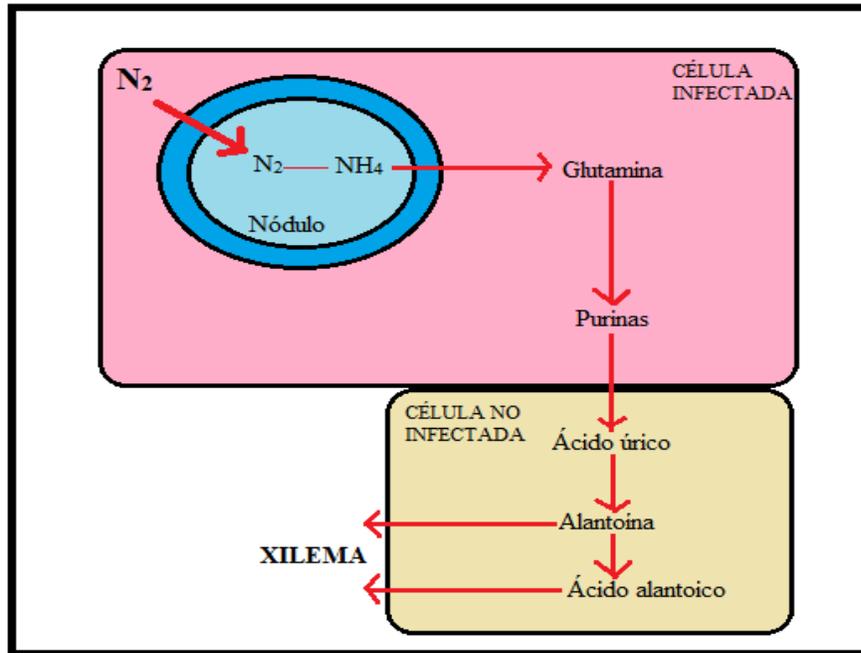


Figura 4. Metabolismo del nitrógeno en nódulos de soja. El nitrógeno (N_2) ingresa a la célula infectada de la planta para luego ser transportado en forma de alantoína o ácido alantoico a la corriente xilemática.

HIPÓTESIS

La combinación del estrés térmico con el hídrico durante el llenado de granos en soja, producen alteraciones en la fuente fotosintética observándose una aceleración del proceso de senescencia foliar y modificaciones en los contenidos de las distintas variables bioquímico-fisiológica que caracterizan el funcionamiento de la fuente. Estos efectos sobre la fuente se traducen en alteraciones sobre el rendimiento y sus componentes (número y peso de granos).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Analizar el impacto de episodios de altas temperaturas y estrés hídrico durante el llenado de granos de soja sobre el metabolismo primario de la fuente y como esto afecta el rendimiento y sus componentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

En genotipos de soja sometidos a breves intervalos de altas temperaturas, déficit de agua y su interacción durante el llenado de granos se propone:

- 1) Cuantificar los cambios producidos en el rendimiento y sus componentes.
- 2) Caracterizar los efectos sobre el metabolismo primario y oxidativo de las hojas fuente,
- 3) Establecer asociaciones entre las variables bioquímicas-fisiológicas y, entre estas y el rendimiento, peso y número de granos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en la EEA INTA Manfredi (31° 49' S, 63° 46' O) durante la campaña agrícola 2012-2013, utilizando 2 genotipos de soja SPS 4x4 RR y SPS 4x99 RR ambos cultivares de grupo de madurez IV largo y hábito de crecimiento indeterminado (es decir, que presentan superposición de estados vegetativos con reproductivos). El ensayo se implantó sobre suelo Haplustol éntico, perteneciente a la serie Oncativo. Previo a la siembra se realizaron análisis de suelo de: fósforo disponible, nitrógeno de nitratos, pH y materia orgánica, determinaciones realizadas por el laboratorio de suelos del INTA Manfredi. Se efectuó el control de plagas y enfermedades para evitar reducciones en el Rto. Se registraron diariamente datos de temperatura, radiación solar y humedad relativa obtenidas de estaciones meteorológicas (Cavadevices, Buenos Aires, Argentina) ubicadas en el sitio experimental.

1. Diseño experimental y tratamientos

Se efectuó un diseño experimental en parcelas sub-subdivididas con 2 repeticiones (bloque 1 y 2), donde la parcela principal correspondió al EH, la sub-parcela al genotipo y la sub-sub parcela al ET (Fig. 5). El tamaño de cada parcela fue de 4 surcos de 4 metros de largo distanciados a 0,52 metros entre ellos con una densidad aproximada de 25 plantas m⁻².

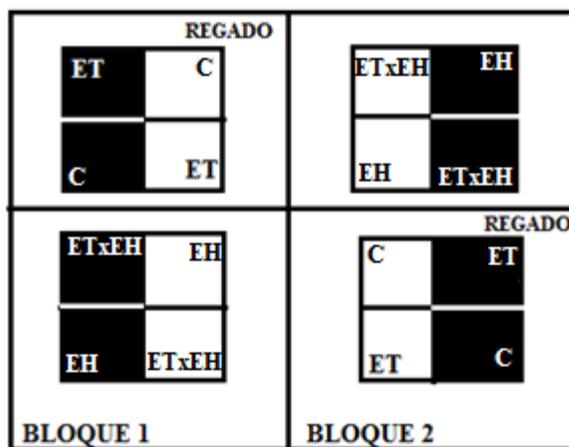


Figura 5. Diseño experimental del ensayo realizado a campo en el EEA INTA Manfredi con dos repeticiones (bloque 1 y 2). La parcela principal correspondió a estrés hídrico (EH), la sub-parcela al genotipo (SPS 4×4 RR cuadrado blanco, SPS 4×99 RR cuadrado negro) y la sub-sub parcela al estrés térmico (ET). Los cuatro tratamientos fueron: control (C), ET, EH y ET × EH.

El experimento consistió en manipular la disponibilidad hídrica y la temperatura durante el llenado de granos en soja, a partir de R5.5 (semillas con longitud de 6mm según Fehr y Caviness, 1977), una vez que la división celular cotiledonar ha finalizado. Esto dio lugar a cuatro tratamientos: control, estrés térmico, estrés hídrico y estrés térmico × estrés hídrico. Los niveles de ET fueron: i) sin estrés (temperatura ambiente) y ii) episodios que superaron los 32°C durante 6 horas alrededor del mediodía. Se utilizó como temperatura de referencia 32°C; porque numerosos experimentos han mostrado que temperaturas por encima de este valor reducen tanto la tasa de crecimiento del grano como la duración del llenado de granos en soja (Egli y Wardlaw, 1980; Gibson y Mullen, 1996; Egli, 1994). El incremento de temperatura se logró mediante carpas de polietileno (Fig. 6A) cerradas desde las 10:00 hasta las 16:00 h durante 21 días a partir de R5.5 (Fig. 7). El nivel de ET se monitoreó mediante sensores de temperatura. Los niveles de EH fueron: i) sin estrés (próximo a capacidad de campo) lo cual se logró mediante riego por goteo y ii) con estrés moderado (20% agua útil aproximadamente) donde el aporte de agua por las lluvias fue excluido por medio de estructuras móviles (*rainout shelters*) (Fig. 6B). Dicho estrés se impuso a partir de R5.5 (según Fehr y Caviness, 1977) hasta el final del ciclo (Fig. 7). El nivel hídrico objetivo fue monitoreado a través de mediciones gravimétricas del agua en el suelo en cuatros momentos: antes de la siembra, en R3 (comienzo de fructificación) al final del tratamiento de ET y al final del ciclo del cultivo.



Figura 6. Fotos del ensayo realizado a campo en el EEA INTA Manfredi: A) carpas de polietileno cerradas desde las 10:00 hasta las 16:00 h para lograr el incremento de temperatura; B) estructuras móviles denominadas *rainout shelters* que permiten la exclusión del agua de lluvias y C) parcelas que combinan *rainout shelters* con carpas de polietileno para lograr la interacción de ambos estrés (ET × EH).

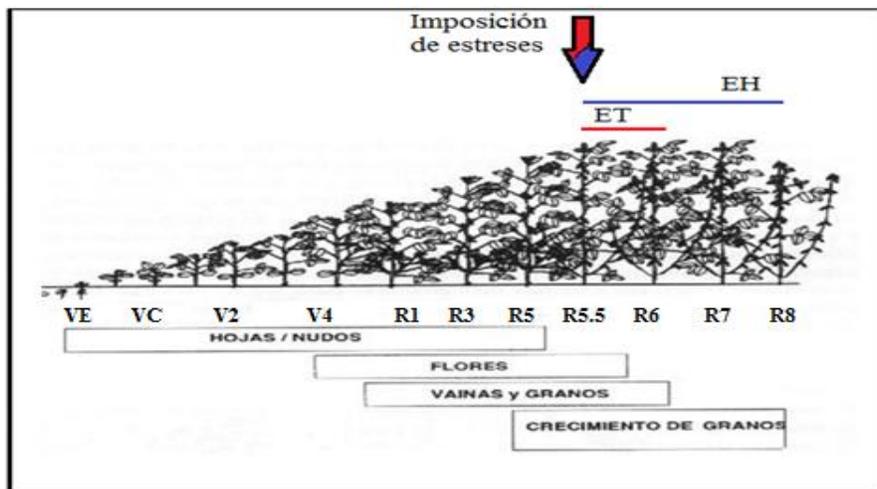


Figura 7. Momento de imposición (flecha rojo-azul) del estrés térmico (ET) y/o estrés hídrico (EH) en relación al ciclo ontogénico del cultivo de soja. Duración del ET: línea roja y del EH: línea azul.

2. Determinaciones de variables Bioquímicas

Tanto las determinaciones bioquímicas como las ecofisiológicas fueron realizadas en el estrato superior del canopeo del cultivo. Se estudió éste estrato en particular, debido a que el mismo recibe el 90 % de interceptación incidente de la radiación fotosintéticamente activa (Hatfield y Carlson, 1978), dispone mayores concentraciones de CO₂, (Baldocchi *et al.*, 1983), y es por lo tanto, el estrato que aporta la mayor cantidad de fotoasimilados (Hatfield y Carlson (1978). Además, como lo reportaron Rotundo y Westgate (2010) en soja, la parte superior del canopeo es la más afectada respecto a la inferior ante una situación de estrés a campo. De los tres folíolos que constituyen la hoja de soja, se escogió el folíolo central debido a que el grupo de trabajo realizó distintas determinaciones fisiológicas comparativas, no encontrando diferencias entre los tres folíolos, razón por la cual, se unificó trabajar en el folíolo central.

Para las determinaciones bioquímicas se seleccionó por unidad experimental una hoja correspondiente al tercer nudo superior del tallo principal de tres plantas, ubicadas en los surcos centrales en los momentos: antes, durante y después de la aplicación del ET, EH y ET × EH. Se obtuvo un número total de muestras de 144, resultando de la combinación de 16 unidades experimentales (8 por genotipo) x 3 momentos de muestreo (antes, durante y después) x 3 repeticiones. Inmediatamente luego del corte, las hojas fueron congeladas en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento en *freezer* a una temperatura de -20°C, hasta el momento de realizar las determinaciones. Las determinaciones se realizaron en la Cátedra de Fisiología Vegetal de la FCEFYN-UNC y en el área de Fisiología de la Producción del IFRGV-CIAP-INTA (ex IFFIVE). Para los análisis se utilizaron por unidad experimental 6 discos de 2 cm² c/u, pertenecientes al folíolo central de la hoja de cada planta muestreada, obteniendo como resultado 18 discos por unidad experimental (6 discos x 3 plantas por unidad experimental). Los discos se molieron en un mortero conteniendo nitrógeno líquido. El tejido molido se resuspendió en 1500 µl de etanol 80% frío y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de FRAP. Luego la extracción etanólica fue calentada a 80°C durante 20 minutos, se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos y se separó el sobrenadante del pellet. El primero fue utilizado para determinación de malondialdehído, clorofilas totales y azúcares totales, mientras que el pellet fue utilizado para determinación de almidón y proteínas totales.

2.1 Capacidad férrico reductora de plasma (FRAP):

Esta determinación se realizó según el protocolo de Benzie y Strain (1996). Para esto se tomaron 5 µl de la extracción etanólica y se hicieron reaccionar con 100ul de una mezcla que contenía *buffer* acetato de Na 0,25 M pH 3,6, TPTZ 0,83 mM y FeCl₃ 16,6 mM. Luego de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió mediante espectrofotometría la absorbancia a 600 nm. Los resultados fueron referidos en umoles cm⁻² utilizando para esto una curva de concentraciones conocidas de TROLOX (Benzie y Strain 1996).

2.2 Malondialdehído (MDA)

Para la determinación de MDA se utilizó el protocolo de Heath y Packer (1968). Se hicieron reaccionar 200 µl de la extracción etanólica con 200 µl de una mezcla que contenía ácido tricloroacético 20% (P/V) y ácido tiobarbitúrico 0,5% (P/V). La mezcla se calentó a 90°C durante 20 minutos a baño maría y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5min. Luego se procedió a la determinación espectrofotométrica de la absorbancia a 532 y 600 nm. La concentración de MDA se calculó a partir de la absorbancia a 532 nm (la corrección se realizó restando la absorbancia a 600 nm para la turbidez no específica) utilizando un coeficiente de extinción molar de 155 mM⁻¹cm⁻¹ y expresándola como mmoles de MDA cm⁻².

2.3 Clorofilas Totales (Clo)

Para esta determinación se siguió el protocolo propuesto por Tetley y Thimann (1974), utilizando 100 µl de la extracción alcohólica y se midió su absorbancia a 652 nm mediante espectrofotometría. Para el cálculo se utilizó un coeficiente de extinción molar de 39,8 Mm⁻¹cm⁻¹. El resultado se expresó en g m⁻².

2.4 Almidón (Alm)

La determinación de este compuesto se realizó según el protocolo de Guan y Janes (1991). Al sobrenadante pellet obtenido de la extracción alcohólica de la solución madre se

lo resuspendió en agua destilada, se lo incubó a 100°C durante 30min y luego se hizo un tratamiento de 16 h a 55°C con la enzima amiloglucosidasa y se incubó durante toda la noche. Se centrifugó la muestra a 1200 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 60 µl del sobrenadante y se los hizo reaccionar con 500 µl de reactivo de *sumner* (1.76M NaOH, 4,4mg de tartrato de KNa tetrahidrato, 2 mg de Ácido 3,5 dinitrosalicílico) a 100°C durante 5 minutos. Se enfrió la reacción y se midió por espectrofotometría su absorbancia a 550 nm. Para el cálculo de concentración de Alm se utilizó una curva de concentraciones conocidas de Glucosa y los resultados se expresaron en g m⁻².

2.5 Azúcares Solubles Totales (Az)

La fracción sobrenadante de la extracción alcohólica se secó en estufa a 60°C durante 24 h, luego se resuspendió en 1500 µl de *buffer* HEPES-KOH 50 mM pH 8.3 y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. Se tomaron 10 µl de esta solución y se hicieron reaccionar con 1000 µl de reactivo de *anthrona* a 100°C durante 5 minutos en baño maría. Se midió la absorbancia a 620 nm. Para el cálculo de la concentración de Az totales se utilizó una curva de Glucosa de concentraciones conocidas y el resultado se expresó en m gm⁻². El protocolo, al igual que para la determinación de Alm fue el de Guan y Janes (1991).

2.6 Proteínas (PrH)

Esta medición se realizó a partir de lo propuesto por Lowry *et al.*, (1951). Se utilizó una fracción del pellet resuspendido en agua, a la cual se le agregó SDS 1% (P/V) y se lo incubó a 100°C durante 5 minutos, luego se lo centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. Se mezclaron 10 µl de esta solución con 800 µl de la solución ABC, se incubó por 15 minutos y se agregó 32 µl de reactivo de *foling*. Se midió la absorbancia a 578 nm. Para el cálculo de la concentración de PrH totales se utilizó una curva de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) y se expresó como mg cm⁻².

2.7 Contenido de Ureídos

Para esta medición se utilizó la técnica de determinación química propuesta por Vogels y Van der Drift (1970). A diferencia del resto de las determinaciones, se trabajó con hojas

(se utilizaron los folíolos laterales y lo que restaba de los folíolos centrales) previamente secadas con un peso aproximado de 0,05 g y se sumergieron en *Buffer* K₃PO₄ 0,025 M pH 6. Se trabajó paralelamente con tres tubos (A, B y C) los cuales sufrieron diferentes procesos de hidrólisis. Para esto se utilizaron 100 µl del sobrenadante. Luego, a estos tres tubos se le agregó fenilhidrazina 3 mg ml⁻¹ y HCl concentrado además de 100 µl de ferricianuro de potasio 16 mg ml⁻¹. Se midió la absorbancia a 520 nm inmediatamente. Se calcularon las cantidades de glioxilato en cada reacción a partir de una curva de calibración (0-0,01 µmoles). La concentración de AcA se calculó a partir de la diferencia de las cantidades de glioxilato entre las reacciones B y A. La cantidad de Al se calculó a partir de la diferencia de las cantidades de glioxilato entre las reacciones C y B. Los resultados fueron expresados en µmoles g PS⁻¹.

3. Determinaciones de variables Eco-Fisiológicas

3.1 Eficiencia Cuántica del Fotosistema II (Φ PSII y Fv/Fm)

Con el objetivo de analizar el impacto del ET, EH y ET × EH sobre la eficiencia cuántica del fotosistema II, se muestreó el folíolo central de cada hoja correspondientes al segundo, tercer o cuarto nudo superior del tallo principal de seis plantas por unidad experimental ubicadas en los surcos centrales, durante los momentos antes, durante y después de la aplicación de los mencionados estreses. Se obtuvo un número total de muestras de 288 resultando de la combinación de 16 unidades experimentales (8 por genotipo) x 3 momentos de muestreo (antes, durante y después) x 6 repeticiones. Mediante un medidor de pulso modulado (FMS2, Hansatech Instruments, Pentney King's Lynn, U.K.) se determinó el Φ PSII y la Fv/Fm), esta última en hojas adaptadas a la oscuridad durante 30 minutos. Se realizaron seis repeticiones para Fv/Fm y Φ PSII por unidad experimental y las mediciones se efectuaron entre las 10:30 h y 15:00 h sobre el folíolo central de cada hoja, durante días soleados y despejados.

3.2 Contenido Relativo de Agua (CRA):

La fórmula utilizada para el cálculo de este parámetro es la siguiente (Kramer, 1974; citado por Medina, 2007):

$$\text{CRA} = \frac{\text{Peso Fresco} - \text{Peso Seco}}{\text{Peso Saturado} - \text{Peso Seco}} \times 100$$

Para ello se obtuvieron los pesos frescos de segmentos foliares (cuatro cm²) correspondientes al tercer y cuarto nudo superior, muestreando 3 plantas por unidad experimental. Luego los segmentos foliares fueron sumergidos en agua destilada durante 24 h para así obtener el peso saturado. Por último se secaron en estufa durante 72 h a 60°C para la obtención del peso seco.

3.3 Rendimiento, Número y Peso de Granos

La cosecha del ensayo se realizó cuando las parcelas alcanzaron la humedad de cosecha, en forma manual cortando las plantas a nivel del suelo y tomando los dos surcos centrales de cada tratamiento. Posteriormente se procesaron las muestras en una trilladora experimental estacionaria (Forti, Pergamino, Argentina). Se estimó el Rto ajustado a la humedad base del cultivo (13,5%) (kg ha⁻¹), peso de mil semillas (gramos) ajustado a la humedad base (PM), número de grano por m² (NG). Los componentes de Rto fueron determinados de la siguiente manera: el peso de mil semillas se calculó para cada tratamiento y repetición tomando tres muestras de las semillas cosechadas y contando las semillas manualmente. Luego se pesaron las semillas contadas y se determinó la humedad de cada alícuota a través de un humedímetro para granos modelo Tesma A-79 (Tesma SAIC, Argentina). Posteriormente, se ajustó a la humedad base de comercialización (13,5%). El NG por unidad de superficie (m²) se obtuvo dividiendo el Rto por el peso de mil granos.

4. Análisis de Datos

Se calcularon las medidas de resumen media y desvío estándar para todas las variables analizadas mediante la utilización del programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2010). Con el fin de explorar asociaciones entre Rto, NG, PG y VBF se efectuó un análisis de componentes principales (ACP) (Johnson y Wichern, 2002). Los resultados de este análisis se visualizan a través de gráficos biplot (Gabriel, 1971) construidos a partir de las dos primeras componentes principales (CP1 y CP2) derivadas del ACP. Las VBF también

se procesaron mediante análisis de varianza (ANAVA) para detectar diferencias significativas en las medias de los distintos tratamientos, se trabajó con un nivel de significancia de $p < 0,05$ y un test a posteriori de DCG utilizando el programa estadístico Infostat, (Di Rienzo *et al.*, 2010). Finalmente, se ajustaron regresiones lineales simples y múltiples para modelar el Rto, NG y PG en función de las variables bioquímico-fisiológicas más relevantes. Para la selección de dichas variables, se consideraron: un nivel de significancia del 5% para la prueba t en los parámetros de regresión estimados, los coeficientes de determinación (R^2) y el análisis de los residuos, mediante InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 8 se muestra la evolución de la temperatura durante los 21 días que duró el tratamiento de ET, donde se puede observar los aumentos de temperatura por encima de la temperatura ambiente alcanzados en los tratamientos de ET y ET × EH durante 14 días que se utilizaron las carpas. La temperatura máxima promedio durante los episodios de ET superó en 11,4°C bajo riego y en 13,9°C bajo EH, a la registrada en los tratamientos control (Tabla 1).

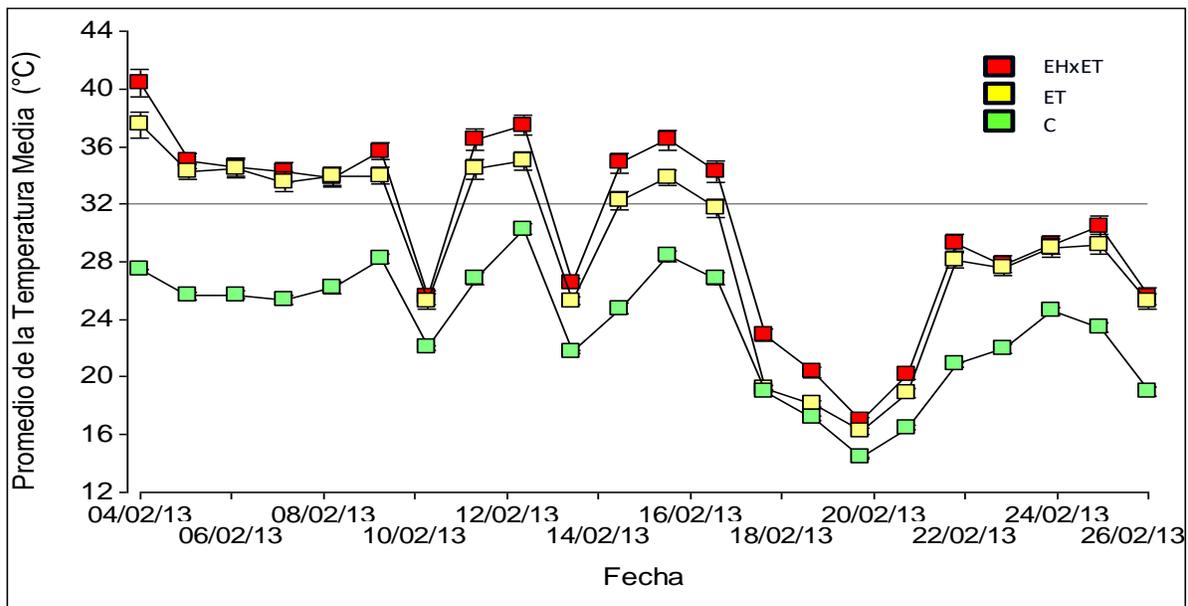


Figura 8. Promedio de la temperatura media (°C) del aire durante el episodio de estrés térmico (durante 21 días a partir de R5.5) para parcelas bajo los tratamientos *control* (C: verde), *estrés térmico* (ET: amarillo) y *estrés térmico con estrés hídrico* (ET × EH: rojo). En el eje de las ordenadas se marca línea continua a los 32°C, temperatura por encima de la cual se considera ET.

Tabla 1. Temperaturas (°C) del aire máximas, mínimas y medias alcanzadas en los tratamientos *control*, *estrés térmico* con riego (Temperaturas >32°C) y *estrés térmico con estrés hídrico* (20% contenido de agua útil) durante episodio de ET (durante 21 días a partir de R5.5)

Tratamiento	Media	Mínimo	Máximo
Control	23.3	12.6	34.6
Estrés Térmico (ET)	28.6	11.5	46.0
ET x Estrés Hídrico (EH)	29.9	13.0	48.5

Respecto a la caracterización del EH logrado a campo, en la Tabla 2 se puede observar el promedio de agua útil en las parcelas bajo EH (es decir en zona de *shelters*) y en los controles regados en los cuatros momentos en los que se realizaron las mediciones gravimétricas del agua en el suelo: antes de la siembra, en R3 (comienzo de fructificación), al final del tratamiento de ET y al final del ciclo del cultivo. Se puede constatar que al inicio de los tratamientos (R5.5) el nivel hídrico alcanzado en las parcelas bajo deficiencia de agua fue en promedio de 16% de agua útil, valor próximo al objetivo planteado de 20% agua útil. Resulta interesante notar que una vez finalizado el ciclo del cultivo el contenido de agua útil en las parcelas bajo EH fue de 3%, mientras que en los controles regados fue de 84%, lo que estaría señalando un déficit hídrico muy acentuado hacia el final del ciclo del cultivo.

Tabla 2. Contenido de agua útil (%) medido hasta los 2m de profundidad en las parcelas bajo los tratamientos *control* y *estrés hídrico* (20% agua útil) en los momentos *antes* (R3), *durante* (R5.5) y *después* (21 días a partir de R5.5 para ET y R8 para estrés hídrico) del inicio de los tratamientos.

Momento	Control	Parcelas bajo Estrés Hídrico
Comiendo de fructificación (R3)	71	74
Inicio tratamientos (R5.5)	75	16
Fin Estrés Térmico (21días)	111	7
Fin Estrés Hídrico (R8)	84	3

Es importante aclarar que si bien, para las diferentes VBF determinadas se registraron valores correspondientes a los momentos *antes*, *durante* y *después*, sólo se muestran los resultados referidos al momento *después*, ya que dicho momento mostró los valores más contrastantes y robustos respecto a los otros dos, permitiendo dar respuesta a los objetivos planteados en el presente trabajo.

En la Tabla 3 se muestran los valores de Rto, NG y PG para los 4 tratamientos aplicados. Bajo condiciones de episodios de altas temperaturas en las parcelas regadas se observaron caídas del Rto de 20% ($383 \text{ g m}^{-2} \pm 44 \text{ g m}^{-2}$) con respecto al control. En estos tratamientos de ET el NG disminuyó 25% ($2086 \text{ NG m}^{-2} \pm 247 \text{ NG m}^{-2}$), mientras que el PG aumentó ($184 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$) con respecto al control ($174 \text{ g} \pm 13 \text{ g}$). Estos resultados difieren de los encontrados por Dornbos y Mullen (1991), quienes también observaron en ensayos en maceta en cámaras de crecimiento, caídas del Rto (30%) en situaciones de ET (temperaturas de alrededor de 35°C), pero a diferencia de lo encontrado en este estudio, esa reducción se debía a una disminución similar tanto del NG como del PG. Las diferencias entre ambos estudios tal vez puedan deberse a que en este trabajo el ET consistió en la exposición del cultivo a episodios que superaron los 32°C durante 6 horas alrededor del mediodía durante 21 días a partir de R5.5, mientras que Dornbos y Mullen (1991) expusieron las plantas a temperaturas elevadas ($33\text{-}35^{\circ}\text{C}$) durante todo el período de llenado de granos, desde R5 hasta R7. La menor duración del ET del presente trabajo habría permitido a los tratamientos de ET compensar parcialmente la caída del NG a través del aumento del PG, permitiendo a dichos tratamientos alcanzar un PG final similar al alcanzado en la situación control (Tabla 3). En las parcelas bajo EH el Rto se redujo 43%

($277 \text{ g m}^{-2} \pm 11 \text{ g m}^{-2}$), disminuyendo un 25% ($2117 \text{ NG m}^{-2} \pm 126 \text{ NG m}^{-2}$) el NG y un 20% ($131 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$) el PG (Tabla 3). Estos resultados son coincidentes con los de Dornbos y Mullen (1991), quienes encontraron reducciones similares tanto del Rto como de sus componentes bajo EH. Rotundo y Westgate (2010), en ensayos a campo observaron una disminución del 20% del Rto, que los autores atribuyeron principalmente a la caída del PG y en menor medida al NG (21% y 4%, respectivamente). Con lo cual estos resultados parecieran ser diferentes de los encontrados en el presente trabajo, pero ambos estudios trabajaron con metodologías para la imposición del EH totalmente diferentes, dado que en el caso de Rotundo y Westgate (2010) las parcelas fueron realizadas en seco y cuando el cultivo alcanza el estadio fenológico de R5.5 por medio de riego suplementario se mantuvo control sin EH, con lo cual durante el periodo crítico de fijación de granos el cultivo pudo haber experimentado cierto nivel de estrés hídrico reflejado en el bajo Rto exhibido por los controles de 2195 kg ha^{-1} . Por lo tanto, al partir de una situación control con un Rto inferior al potencial y por lo tanto menor NG, luego cuando se compara el Rto de los controles versus los tratamientos de EH se exageran más las diferencias en el PG que en el NG.

La combinación de los estreses produjo una disminución del Rto del 41% ($286 \text{ g m}^{-2} \pm 60 \text{ g m}^{-2}$), debido tanto a la caída del NG ($2064 \text{ NG m}^{-2} \pm 303 \text{ NG m}^{-2}$) como del PG ($137 \text{ g} \pm 12 \text{ g}$) con respecto al control, cayendo ambos componentes en similares proporciones (26 y 21%, respectivamente) (Tabla 3). Estas reducciones tanto del Rto, como del NG y PG son ligeramente inferiores (~10%) a las reportadas por Dornbos y Mullen (1991), lo cual podría deberse a que dichos autores impusieron ambos estrés (ET y EH) simultáneamente durante todo el período de llenado de granos, es decir de R5-R7. Mientras que en nuestro estudio el ET se aplicó durante 21 días desde R5.5 y el EH desde R5.5 hasta el final del ciclo del cultivo.

Tabla 3. Valores de media y desvío estándar para las diferentes variables analizadas para el set de datos correspondientes al momento *después*.

Variables	Control	Estrés Térmico (ET)	Estrés Hídrico (EH)	ET×EH
Rto (g m ⁻²)	488 ± 51	383 ± 44	277 ± 11	286 ± 60
NG (NG m ⁻²)	2791 ± 176	2086 ± 247	2117 ± 126	2064 ± 303
PG (g)	174 ± 13	184 ± 2	131 ± 5	137 ± 12
CRA (%)	54 ± 11	57 ± 5	60 ± 4	48 ± 7
Fv/Fm	0,77 ± 0,07	0,75 ± 0,08	0,72 ± 0,08	0,62 ± 0,10
ΦPSII	0,31 ± 0,11	0,30 ± 0,06	0,26 ± 0,06	0,27 ± 0,08
FRAP(umoles cm ⁻²)	14 ± 3	11 ± 3	12 ± 3	10 ± 3
MDA(umoles cm ⁻²)	0,40 ± 0,10	0,60 ± 0,14	0,40 ± 0,10	0,40 ± 0,10
Clo (g m ⁻²)	1 ± 0,40	2 ± 0,30	1 ± 0,60	0,80 ± 0,50
Az (mg m ⁻²)	6 ± 3	4 ± 2	5 ± 2	4 ± 2
Alm (g m ⁻²)	5 ± 2	5 ± 2	3 ± 2	4 ± 1
PrH (mg m ⁻²)	27 ± 13	15 ± 5	22 ± 8	22 ± 7
Ureídos (umol gPS ⁻¹)	2,67 ± 0,96	2,95 ± 3,58	2,99 ± 1,95	3,97 ± 1,59
AcA (umol gPS ⁻¹)	0,80 ± 0,50	2 ± 1	0,80 ± 0,70	1 ± 0,50
Al (umol gPS ⁻¹)	2 ± 0,90	2 ± 1	3 ± 2	3 ± 1

CRA: contenido relativo de agua; Fv/Fm eficiencia cuántica máxima; ΦPSII: rendimiento cuántico del del fotosistema dos; Rto: rendimiento; NG: número de granos; PG: peso de granos; FRAP: capacidad férrico reductora de plasma; MDA: malondialdehido; Clo: clorofilas; Az: azúcares; Alm: almidón; PrH: proteínas de hoja; AcA: ácido alantoico; Al: alantoína.

Como se mencionó anteriormente, en situaciones de ET bajo riego se observó que el PG final en estos tratamientos fue similar al alcanzado en la situación control (Tabla 3), sugiriendo un claro efecto compensatorio, dado que bajo ET se produjo disminución del NG (Tabla 3). Este efecto compensatorio habría permitido que el Rto alcanzado bajo ET fuera mayor que el exhibido por las parcelas bajo EH y ET × EH. Las reducciones en el Rto a través de los diferentes tratamientos respecto a la situación control, fueron explicadas por las disminuciones tanto del NG como del PG. Una de las razones que podrían estar explicando la caída en el NG es que los estreses hayan afectado la última parte del período crítico para la definición del NG. Aunque la imposición del ET y/o EH fue realizada a partir de R5.5, con el objetivo de afectar el periodo de llenado de granos, en soja es

conocido que el final del período crítico para la definición del NG no está unánimemente establecido, ya que el mismo se ha estimado que finaliza 10 a 12 días después de R5 para algunos autores (Board y Tan, 1995), mientras que para otros, puede prolongarse hasta el comienzo de R6 (Egli, 1997). Además, a esto resulta importante agregar que la soja es un cultivo que presenta crecimiento indeterminado, en el cual se origina una mayor superposición entre los diferentes estados, con lo cual una vez iniciado el llenado de granos continúan ocurriendo simultáneamente la floración, fructificación; además de proseguir la aparición de hojas y elongación de entrenudos. Está reportado, que la determinación del PG depende entre otros factores de la duración de llenado de granos, el cual a su vez, está controlado por la tasa de senescencia de las hojas del canopeo y regulado al mismo tiempo, por los niveles de N en hoja (de Souza *et al.*, 1997). Los cloroplastos y sus componentes como las Clo representan más del 70% del N foliar (Taiz y Zeiger, 2008). Durante la senescencia foliar del cultivo de soja se produce una disminución del N foliar y por ende, de las Clo y fotosíntesis (Wittenbach *et al.*, 1980; Hayati *et al.*, 1996). Por lo tanto, bajas concentraciones de Clo en hoja son indicadoras de senescencia foliar (Wittenbach *et al.*, 1980). Considerando que bajo EH o ET \times EH el cultivo alcanzó valores de Clo 50% menores ($1 \text{ g m}^{-2} \pm 0,6 \text{ g m}^{-2}$) que las plantas bajo ET ($2 \text{ g m}^{-2} \pm 0,30 \text{ g m}^{-2}$) (Tabla 3), se puede inferir que independientemente del ET, bajo deficiencia hídrica las plantas mostraron senescencia anticipada. Esto fue confirmado por el amarillamiento precoz exhibido por las plantas sometidas a condiciones de EH y/o ET \times EH, comparadas con las parcelas regadas (con o sin ET) como lo muestra la Fig. 9. Más aun, los tratamientos bajo condiciones de déficit hídrico exhibieron menor duración del llenado de granos con respecto al control, 15 días menos (datos no mostrados), lo cual estaría explicando la disminución de aproximadamente 21% observada para PG.



Figura 9. Foto del ensayo que evidencia el amarillamiento precoz y por lo tanto, el acortamiento del ciclo en las parcelas bajo déficit hídrico (plantas por encima de la línea roja) con respecto a las plantas regadas (plantas por debajo de la línea roja).

Las variables de eficiencia de la fotosíntesis, estimadas a partir de F_v/F_m y ϕ_{PSII} junto con la concentración de Az y Alm son indicativas del estado fotosintético de la planta. Los valores de F_v/F_m , en condiciones ambientales normales (760 mm Hg de presión, 25°C), son próximos a 0,8 los cuales concordaron con los observados en la situación control. Las disminuciones más marcadas de F_v/F_m fueron observadas bajo condiciones de $ET \times EH$, donde los valores disminuyeron significativamente en un 20% respecto al control ($0,62 \pm 0,1$) (Tabla 3) (Fig. 10).

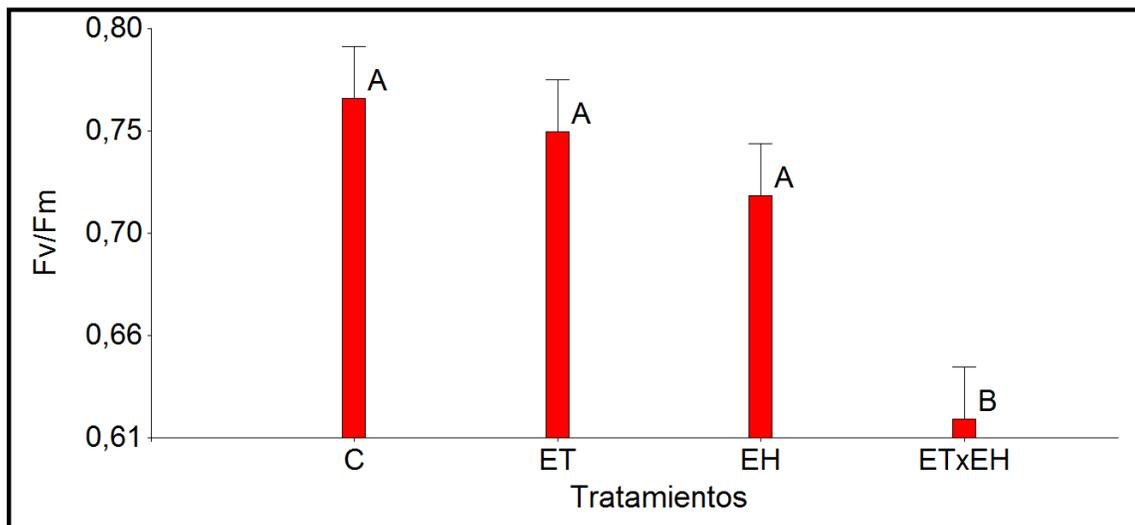


Figura 10. Valores de eficiencia cuántica máxima del fotosistema dos (Fv/Fm) para los diferentes tratamientos (C: control; ET: estrés térmico; EH: estrés hídrico; ET × EH: estrés térmico por hídrico) para el set de datos correspondientes al momento después. Expresados como medias (+) error estándar. Letras distintas expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Para Φ PSII las diferencias con respecto al control sólo se observaron en las parcelas no regadas, es decir bajo EH y ET × EH registrándose una reducción aproximada del 13% (Tabla 3). Similares resultados fueron reportados por Xu y Zhou (2006) en plantas de *Leymus chinensis*, ya que observaron disminuciones significativas (42%) en los valores de Fv/Fm en el tratamiento ET × EH (32°C × 25-40% CRA). La variable Φ PSII, mostró reducciones en condiciones de EH (33%) y ET × EH (83%), pero a diferencia del presente trabajo, también reportaron caídas bajo situaciones de ET (16%). Los autores concluyeron que las importantes disminuciones observadas bajo condiciones ET × EH se debieron a que los efectos adversos del EH agravan los daños causados por las altas temperaturas, lo que produce mayores pérdidas en el funcionamiento de PSII. En el presente estudio, los Az disminuyeron 33% en los tratamientos de ET y ET × EH ($4 \text{ mg m}^{-2} \pm 2 \text{ mg m}^{-2}$) y 15% en EH ($5 \text{ mg m}^{-2} \pm 2 \text{ mg m}^{-2}$). Por otro lado, el Alm cayó 40% ($3 \text{ g m}^{-2} \pm 2 \text{ g m}^{-2}$) y 20% ($4 \text{ g m}^{-2} \pm 1 \text{ g m}^{-2}$) para EH y ET × EH, respectivamente. Similares resultados bajo condiciones de EH moderado (CRA 30%) observaron de Souza *et al.*, (1997) en plantas de soja, quienes registraron reducciones en las concentraciones de Alm (85%) con respecto al control. Estas disminuciones fueron más acentuadas que las reportadas en el presente trabajo, pero las diferencias se pueden deber a que el ensayo de Souza *et al.*, (2007) se realizó en macetas y las variables fueron medidas 20 días después de R6,

momento en el que se impuso el EH, mientras que en este estudio a campo los datos fueron registrados en R8.

Las relaciones antes mencionadas entre el Rto, NG, PG y las VBF fueron exploradas a partir del biplot obtenido de los dos primeros componentes principales del ACP (Fig. 11), el cual explicó 88% de la variación total de los datos estandarizados. Dichas correlaciones fueron analizadas a través de los ángulos entre los vectores de las variables, donde ángulos agudos indican correlaciones positivas y ángulos obtusos corresponden a correlaciones negativas entre las variables. En la CPI de la Fig. 11 se pudo observar que niveles elevados de Rto y sus componentes estuvieron asociados positivamente a Fv/Fm, ϕ PSII, Az y Alm. La Fig. 11 también mostró que los vectores de las mencionadas variables se orientaron hacia los controles regados, ubicándose en el extremo opuesto a las parcelas bajo déficit hídrico. Esto coincide con los resultados de la Tabla 3, de la cual se desprende que las disminuciones más drásticas en los valores de las variables anteriormente citadas fueron observadas en las parcelas bajo déficit hídrico, indicando alteraciones en el estado fotosintético de las plantas sometidas a EH. Lo cual tiene sentido si consideramos que bajo situaciones de EH se producen cambios fisiológicos en las plantas, como por ejemplo el cierre de los estomas, con la consecuente reducción en la asimilación de CO₂, y alteración de las actividades metabólicas propias de la fotosíntesis (Prasad, 2008). Si la sequía inductora del cierre estomático es además, acompañada de temperaturas altas las temperaturas de la canopia se elevan (Stone, 1999) frecuentemente al reducirse la transpiración, superando a menudo la temperatura del ambiente (Idso *et al.*, 1981; Rose, 1988) generando mayor estrés. Si bien en el presente trabajo no se midieron conductancia estomática ni fotosíntesis las reducciones observadas en las variables Fv/Fm y ϕ PSII, junto con caída de la concentración de Az y Alm apoyaron la suposición de que en las parcelas bajo EH los procesos fotosintéticos se modificaron negativamente. La disminución de los estimadoras de la eficiencia fotosintética del cultivo (Fv/Fm y ϕ PSII) y de los principales productos de la fotosíntesis (Az y Alm) se tradujeron en reducciones en la disponibilidad de asimilados para el crecimiento de la planta precisamente durante la etapa más crítica para la determinación del Rto, cuando el cultivo está fuertemente limitado por fuente (*i.e.* fotoasimilados requeridos para sostener el crecimiento de los granos) (Borrás *et al.*, 2004), afectando seriamente tanto el NG como el PG, y consecuentemente también el Rto.

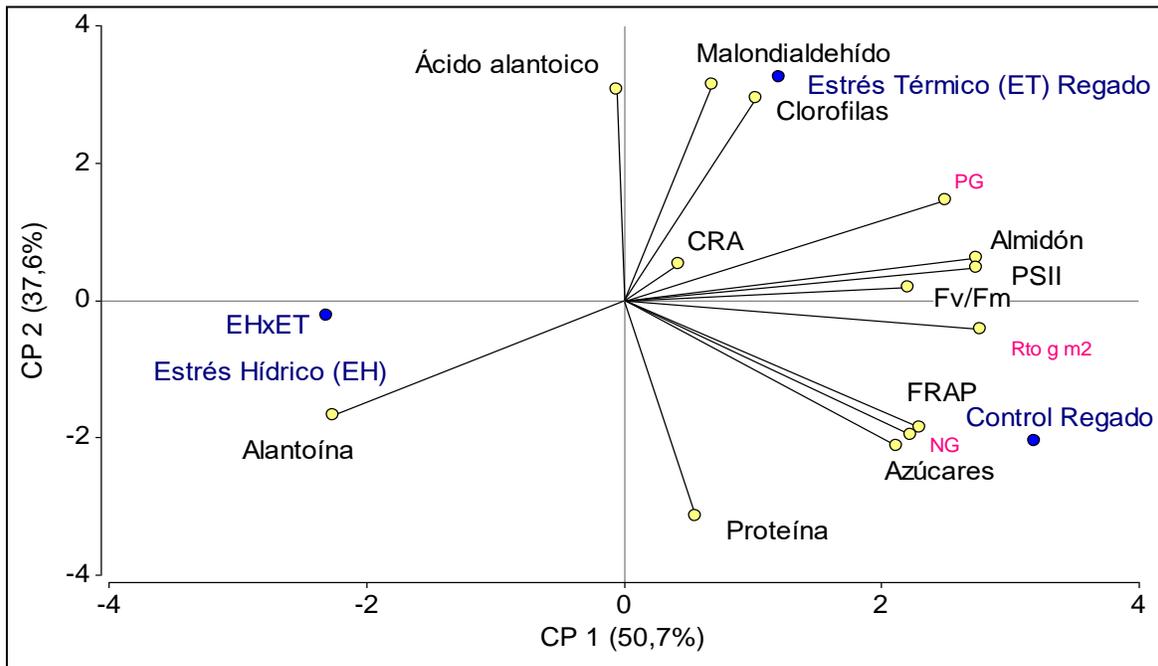


Figura 11: Biplot del Análisis de Componentes Principales para el set de datos correspondientes al momento *después*. CRA: contenido relativo de agua; Fv/Fm eficiencia cuántica máxima; PSII: rendimiento cuántico del del fotosistema dos; Rto: rendimiento; NG: número de granos; PG: peso de granos; FRAP: capacidad reductora férrico de plasma.

El MDA producto de la peroxidación de lípidos de membranas es utilizado como marcador de daños oxidativos. Los valores de MDA fueron similares para el control, EH y ET×EH ($0,40 \text{ umoles cm}^{-2} \pm 0,10 \text{ umoles cm}^{-2}$), mientras que se observó un aumento del 35% en esta variable bajo ET comparando al control (Tabla 3) (Fig. 12). Esto se vio reflejado en el biplot de la Fig. 11, en cual el vector correspondiente al MDA se orientó hacia el tratamiento de ET, lo que estaría sugiriendo que los daños en las membranas causados tal vez por EAO, podrían ser más sensibles al ET que al EH.

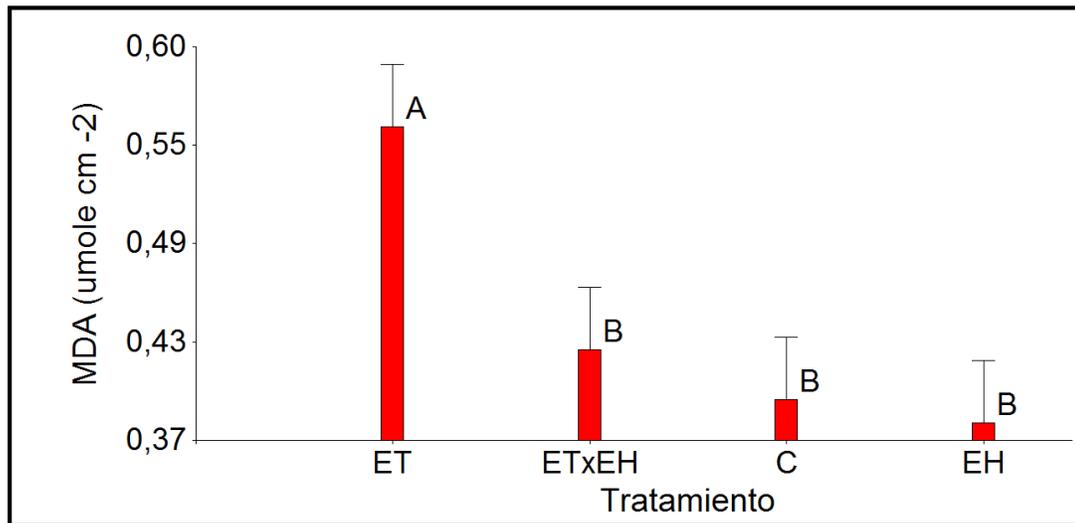


Figura 12. Valores de malondialdehído (MDA) para los diferentes tratamientos (C: control; ET: estrés térmico; EH: estrés hídrico; ET × EH: estrés térmico por hídrico) para el set de datos correspondientes al momento después. Expresados como medias (+) error estándar. Letras distintas expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados recién mencionados coinciden parcialmente con los encontrados por Xu y Zhou (2006), quienes también observaron que las altas temperaturas (32°C) dan lugar a la acumulación de MDA, pero a diferencia de este trabajo, ellos reportaron que el aumento en los niveles de MDA es acentuada en tratamientos de ET × EH (25-40% CRA). Aunque, la comparación entre el presente estudio y el de trabajo de Xu y Zhou (2006) es limitada, ya que estos investigadores realizaron el experimento en otra especie (*Leymus chinensis*) en invernadero aplicando los estreses en estado vegetativo. Sus resultados coinciden con lo hallado por Grumberg *et al.* (2013) quienes en soja encontraron que el MDA estuvo positivamente asociado a situaciones de EH. Como se mencionó anteriormente, en nuestro trabajo el MDA aumentó ante ET (Tabla 3), lo cual tiene sentido si consideramos que el MDA es un producto de la peroxidación de lípidos de membranas proceso que tiene lugar con altas temperaturas debido a que las mismas aumentan la fluidez de las membranas (Prasad, 2008). Interesantemente a partir de la Fig. 11 se observó una correlación negativa entre MDA y PrH, dado el ángulo obtuso formado entre ambas variables, por lo que se procedió a analizar dicha relación a través de regresión lineal. El análisis reveló asociación negativa significativa entre PrH y MDA ($p=0,0162$) aunque los datos mostraron dispersión (Fig. 13).

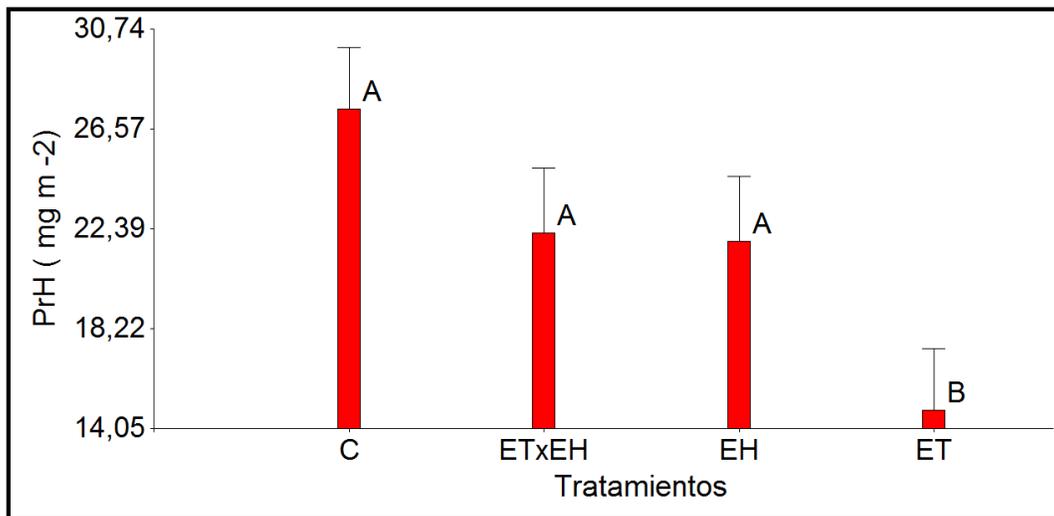


Figura 14. Valores de proteínas en hojas (PrH) para los diferentes tratamientos (C: control; ET: estrés térmico; EH: estrés hídrico; ET × EH: estrés térmico por hídrico) para el set de datos correspondientes al momento después. Expresados como medias (+) error estándar. Letras distintas expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los ureídos son la principal forma de transporte de N a larga distancia en leguminosas tropicales (Lodwig, 2003) siendo sus principales formas la alantoína (Al) y ácido alantoico (AcA) (Vance, 2005). En este trabajo, se observó que la concentración de ureídos (suma de Al y AcA) aumentó tanto en condiciones de ET ($2,95 \text{ umol gPS}^{-1} \pm 1,58 \text{ umol gPS}^{-1}$) como de EH ($2,99 \text{ umol gPS}^{-1} \pm 1,95 \text{ umol gPS}^{-1}$) y ET × EH ($3,97 \text{ umol gPS}^{-1} \pm 1,59 \text{ umol gPS}^{-1}$) (Tabla 3). Cuando se consideraron las formas de ureídos Al y AcA se observó que la primera aumentó bajo EH ($3 \text{ umol gPS}^{-1} \pm 2 \text{ umol gPS}^{-1}$) y ET × EH ($3 \text{ umol gPS}^{-1} \pm 1 \text{ umol gPS}^{-1}$) mientras que el segundo aumento sólo en el tratamiento ET ($2 \text{ umol gPS}^{-1} \pm 1 \text{ umol gPS}^{-1}$) comparado con el control (Tabla 3). El biplot también mostró que niveles elevados de Al estuvieron asociados a situaciones de EH y ET × EH, mientras que mayores niveles de AcA estuvieron asociados con ET (Fig. 11). En un trabajo en macetas en plantas de soja realizado por Serraj *et al.* (1999b), se detectaron altos niveles de ureídos en hojas, pecíolos y nódulos sometidos a estrés hídrico durante la etapa vegetativa. El aumento de ureídos en hojas bajo condiciones déficit hídrico en el suelo podría responder a un mecanismo de retroalimentación negativa, donde el aumento de ureídos en hojas inhibe la fijación de N en los nódulos de las raíces, como lo sugirieron Serraj y Sinclair (2003). Además, está ampliamente demostrado que la fijación simbiótica del nitrógeno disminuye ante déficits de agua en el suelo (Serraj y Sinclair, 2003; Sinclair *et al.*, 2000). Esta

reducción de la fijación de N ante EH, es reportada usualmente en la bibliografía como causa de mermas del Rto debido a que genera inadecuados niveles de N para la producción de proteína, principal componente del grano de soja (40% del grano es proteína) (Sinclair *et al.*, 2007). Esto podría ser parte de la explicación de la caída del Rto observada en los tratamientos ET, EH y ET × EH en el presente estudio. Es importante destacar que si bien sería necesario aumentar el número de años del experimento y considerar otros aspectos tales como la realización de técnicas para cuantificar la fijación biológica del N con ensayos de flujo a través de la reducción de acetileno, este trabajo aporta nuevos conocimientos al estudio del comportamiento de los ureídos no sólo en condiciones de EH sino también en situaciones de ET y ET × EH. Y aborda el estudio de los ureídos analizando las concentraciones de Al y AcA individualmente, componentes considerados siempre en conjunto por la literatura.

A partir del biplot correspondiente al análisis exploratorio del set de datos del momento *después* de muestreo se observaron fuertes asociaciones positivas entre Rto, NG, PG, Alm, Fv/Fm, Φ PSII, FRAP, Az y PrH (Fig. 11). Por ello, en una segunda instancia se procedió a profundizar en el análisis de las mismas, a través de regresiones lineales múltiples. Las mismas indicaron que el 63% de la variación del Rto a través de tratamientos fue explicada significativamente por Φ PSII y Alm (Tabla 4), mientras que para PG el mejor modelo de ajuste que explicó 62% de la variación del mismo incluyó como variables explicativas a Φ PSII, Alm y PrH (Tabla 4).

Tabla 4. Modelos de regresión lineal para rendimiento, peso y número de granos, en relación a variables bioquímicas-fisiológicas para el set de datos correspondientes al momento *después*.

Variable dependiente	Variable explicativa	Coefficiente de regresión	Error estándar	<i>p</i> valor	Coefficiente de determinación
Rendimiento (g m ⁻²)	Constante	153,46	31,53	<0,0001	0,63
	Almidón	0,40	0,07	<0,0001	
	ϕPSII	330,11	101,67	0,0026	
Peso de grano	Constante	135,93	10,98	<0,0001	0,62
	Almidón	0,11	0,02	0,0001	
	ϕPSII	72,90	33,53	0,0378	
	Proteínas	-0,24	0,06	0,0020	
Número de granos	Constante	1684,93	207,64	<0,0001	0,20
	Azúcares	1288,44	447,67	0,0106	
	Constante	1807,81	153,20	<0,0001	0,20
	FRAP	38,65	12,39	0,0033	
	Constante	2037,24	117,55	<0,0001	0,13
	Proteínas	11,67	4,97	0,0245	
	Constante	1957,78	111,98	<0,0001	0,13
	Almidón	5,46	2,20	0,0174	
	Constante	1927,95	162,79	<0,0001	0,11
	ϕPSII	1168,62	543,60	0,0380	

Las variaciones del NG fueron explicadas significativamente ($p < 0,05$) por FRAP, Az, PrH, Alm y ϕPSII pero a través de modelos lineales simples, logrando mejor coeficiente de determinación (R^2 0,20) las variables Az (Fig. 15) y FRAP (Fig. 16) respecto a las restantes (Tabla 4).

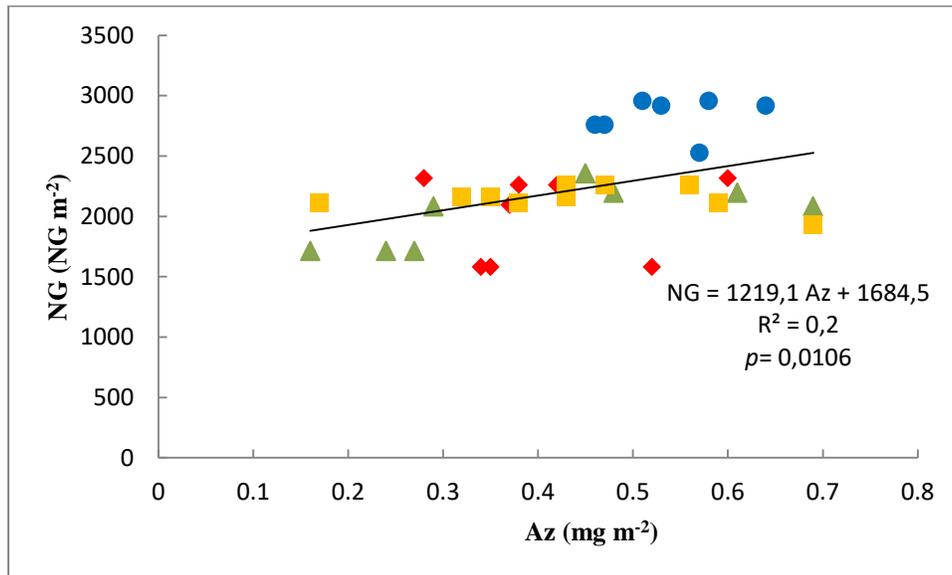


Figura 15. Regresión para la relación entre número de granos (NG) y azúcares (Az) para el set de datos correspondientes al momento *después*. Las formas y colores círculo azul, triángulo verde, cuadrado amarillo y rombo rojo representan los tratamientos *control*, *estrés térmico*, *estrés hídrico* y *estrés térmico con estrés hídrico*, respectivamente.

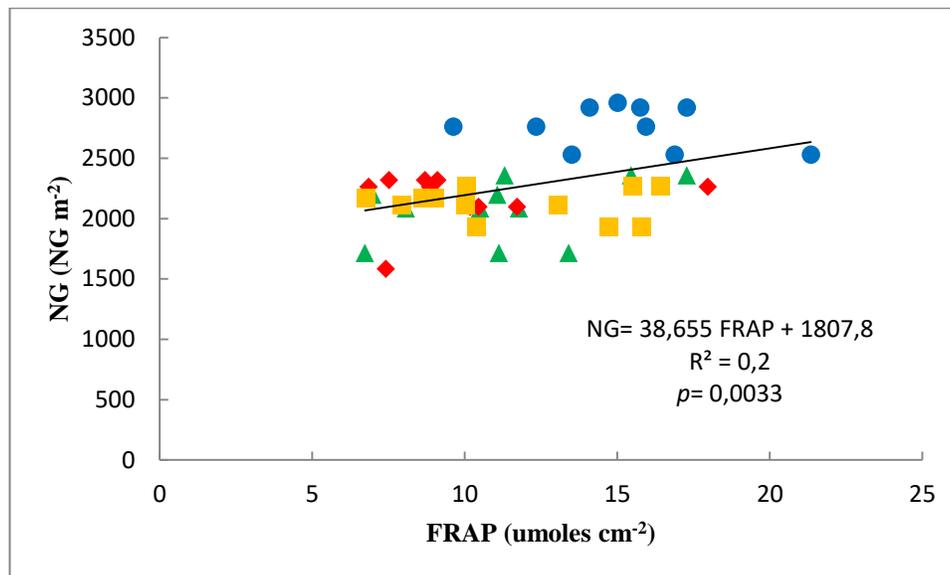


Figura 16. Regresión para la relación entre número de granos y FRAP para el set de datos correspondientes al momento *después*. Las formas y colores círculo azul, triángulo verde, cuadrado amarillo y rombo rojo representan los tratamientos *control*, *estrés térmico*, *estrés hídrico* y *estrés térmico con estrés hídrico*, respectivamente.

La relación positiva encontrada entre Φ PSII, Alm y Rto y entre Φ PSII, Alm y PG, reflejan el impacto del funcionamiento fisiológico del canopeo en la determinación Rto hacia el

final del ciclo, cuando el cultivo se encuentra fuertemente limitado por la fuente fotosintética (generadora de fotoasimilados). Aumentos de la fotosíntesis durante el llenado de granos aumentan el PG generando incrementos del Rto. Siendo los valores de Φ PSII directamente proporcionales a la tasa de fijación de CO₂ y el Alm uno de los principales productos de la fotosíntesis, aumentos de Φ PSII y Alm resultaron en incrementos del Rto y el PG. La relación negativa encontrada entre PrH y PG describiría el proceso de redistribución de N desde las hojas hacia el grano, considerando que el grano de soja posee en su composición final un elevado nivel de proteína (40%) y un alto porcentaje del N final de dicho grano (50-100%) proviene de la removilización de N a partir de las hojas.

La relación positiva encontrada entre Az y NG y FRAP y NG a través de los tratamientos podría ser explicada considerando que el NG es una función directa de la disponibilidad de asimilados producto de la fotosíntesis (Egli, 1994) y el Az uno de los principales productos de este proceso fisiológico. Por otro lado, el FRAP forma parte del sistema antioxidante no enzimático de las plantas cuyo rol es mantener controladas las EAO causantes de daños oxidativos, un elevado valor de FRAP indicaría bajas concentraciones de EAO (como los observados en el control, Tabla 3 y Fig. 11 y 17) sugiriendo ausencia o bajos niveles de daño oxidativo de la fuente fotosintética productora de fotoasimilados.

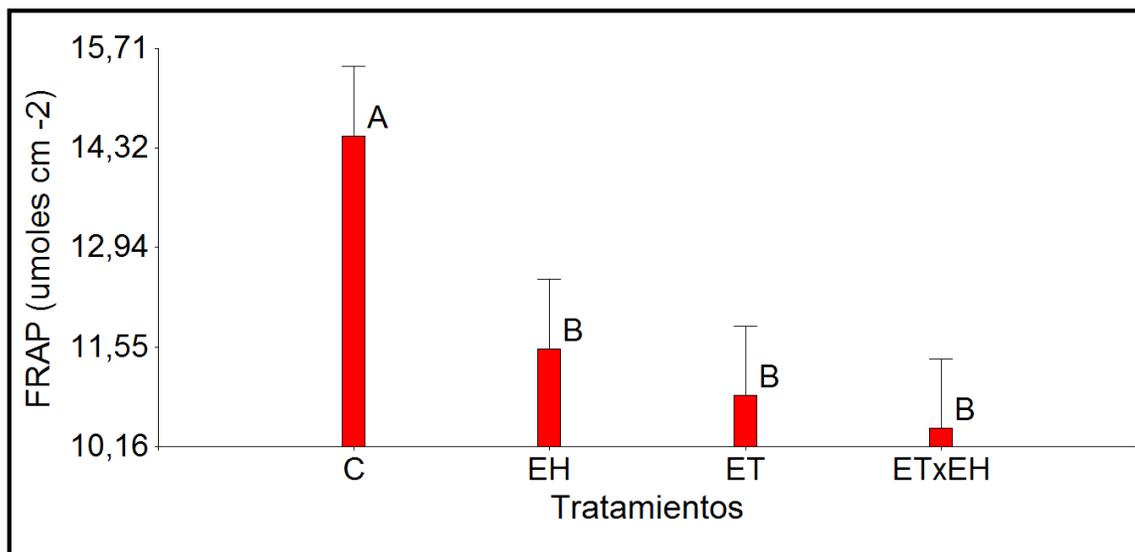


Figura 17. Valores de la capacidad férrico reductora de plasma (FRAP) para los diferentes tratamientos (C: control; ET: estrés térmico; EH: estrés hídrico; ET × EH: estrés térmico por hídrico) para el set de datos correspondientes al momento después. Expresados como medias (+) error estándar. Letras distintas expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

El presente trabajo es un primer paso hacia la comprensión de las bases eco-fisiológicas que regulan las respuestas del Rto y sus componentes del cultivo de soja durante el llenado de grano bajo situaciones de ET y/o EH. También constituye un avance en la combinación de escalas y sub-disciplinas dentro de la biología vegetal ya que involucró experimentos a campo estudiando variables ecofisiológicas, simultáneamente con variables bioquímicas-fisiológicas (VBF), intentando a partir de las mismas mejorar la aproximación al entendimiento de mecanismos complejos como lo son las respuestas de los cultivos a condiciones de estrés. Por otro lado, este tipo de estudios contribuyen a la identificación de VBF asociadas al Rto y sus componentes las cuales podrían ser de suma utilidad para el mejoramiento genético en estudios de *screening* de genotipos.

CONCLUSIONES

Los tratamientos de ET, EH y ET×EH causaron disminución del Rto (20%, 43%, 41%, respectivamente comparado con el control). Las reducciones en el Rto a través de los diferentes tratamientos respecto a la situación control, fueron explicadas por las disminuciones tanto del NG como del PG. Excepto en situaciones de ET bajo riego, donde el PG final fue similar al alcanzado en la situación control, sugiriendo un claro efecto compensatorio, dado que bajo ET se produjo disminución del NG. Este efecto compensatorio habría permitido que el Rto alcanzado bajo ET fuera mayor que el exhibido por las parcelas bajo EH y ET×EH. Se concluyó que la interacción de ambos estreses produjo efectos no aditivos sobre el rendimiento y sus componentes (número y peso de granos).

Las disminuciones del PG observadas bajo EH y ET × E H y del NG también en las parcelas bajo ET pero regadas y la consecuente caída en del Rto a través de los tratamientos, fueron satisfactoriamente explicadas a partir de los efectos detrimentales de los estreses abordados sobre el funcionamiento de la fuente generadora de asimilados estrechamente ligada al proceso fisiológico de la fotosíntesis, y caracterizada en este estudio a partir de las VBF. Aunque bajo ET se produjeron modificaciones en los valores de las VBF, las disminuciones más drásticas de estas (*i.e.* Fv/Fm, Φ PSII, Alm, Az, FRAP, Clo) fueron observadas en las parcelas bajo déficit hídrico, indicando alteraciones en el estado fotosintético de las plantas sometidas a EH y ET × EH. Lo cual fue confirmado por el amarillamiento precoz de las plantas en estos tratamientos, comparadas con las parcelas regadas (con o sin ET). Estos resultados permitieron aceptar la hipótesis que sostiene que: ***la combinación del estrés térmico con el hídrico durante el llenado de granos en soja, producen alteraciones en la fuente fotosintética observándose una aceleración del proceso de senescencia foliar y modificaciones en los contenidos de las distintas variables bioquímico-fisiológica que caracterizan el funcionamiento de la fuente. Estos efectos sobre la fuente se traducen alteraciones sobre el rendimiento y sus componentes (número y peso de granos).***

Dentro del conjunto de VBF abordadas y a través de regresiones lineales múltiples se encontró que Alm y ϕ PSII fueron buenas predictoras de Rto, mientras que Alm, ϕ PSII y PrH fueron predictores robustos del PG. Las variaciones del NG fueron explicadas significativamente por FRAP, Az, PrH, Alm y ϕ PSII pero a través de modelos lineales simples. Además, teniendo en cuenta las VBF y los gráficos de barras se pueden considerar al MDA y PrH como indicadores robustos de ET, al Fv/Fm de $ET \times EH$ y al FRAP como indicador de los tres tratamientos de estrés: ET, EH y $ET \times EH$.

El biplot del ACP correspondiente al set de datos del momento después de muestreo mostró fuertes asociaciones positivas entre Rto, NG, PG, Alm, Fv/Fm, ϕ PSII, FRAP, Az y PrH, también mostró que elevados niveles de las dichas variables estuvieron asociados a los controles regados. Altos valores de MDA y AcA se correlacionaron con los tratamientos de ET regados, mientras que niveles elevados de Al se asociaron a situaciones de EH y $ET \times EH$.

BIBLIOGRAFÍA

Andrews, J., M. Fryer, N. Baker (1995) "Characterization of chilling effects on photosynthetic performance of maize crops during early season growth using chlorophyll fluorescence" *J Exp Bot.* 46:1195–1203.

Anjum, F., M. Yaseen, E. Rasul, A. Wahid, S. Anjum (2003b) "Water stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). Effect on chemical composition and chlorophyll contents" *Pakistan J Agric Sci.* 40:45-49.

Atkins, C., A. Ritchie, P. Rowe, E. Mccairns, D. Saur (1982) "De novo purine synthesis in nitrogen fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and soybean (*Glycine max*)" *Plant physiol.* 70:55-60.

Atkins, C. (1991) "Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule" En: *Biology and biochemistry of nitrogen fixation.* Ed: Dilworth, M., A. Glenn. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. Pp. 293–319.

Baldocchi, D., S. Verma, N. Rosenberg (1983) "Characteristics of Air Flow Above and Within Soybean Canopies" *Boundary-Layer Meteorol.* 25:43–54.

Benzie I., J. Strain (1996) "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power. The FRAP Assay" *Anal Biochem.* 239:70-76.

Bilger W., O. Björkman (1990) "Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*" *Photosyn Resrch.* 25:173-86.

Board, J., J. Settimi (1986) "Photoperiod effect before and after flowering on branch development in determinate soybean" *Agron J.* 78:995-1002.

Board, J., Q. Tan (1995) "Assimilatory capacity effects on soybean yield components and pod number" *Crop Sci.* 35:846-851.

Bohnert, H., R. Jensen (1996) "Strategies for engineering water stress tolerance in plants" *Trends Biotechnol.* 14:89–97.

Borrás, L., G. Slafer, M. Otegui (2004) "Seed dry weight response to source–sink manipulations in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal" *Field Crops Res.* 86:131–146.

Boyer, J. (1970) "Differing sensitivity of photosynthesis to low leaf water potentials in corn and soybeans" *Plant Physiol.* 46:236-239.

Brevedan, R., D. Egli (2003) "Short periods of water stress during seed filling, leaf senescence, and yield of soybean" *Crop Sci.* 43:2083-2088.

Buyatti, L., M. Sosa, A. María, R. Parra (2006) "Evaluación de materia seca de biomasa aérea total de soja, según fecha de siembra y grupo de madurez, en los estadios fenológicos R5 y R6". En: *Comunicaciones científicas y tecnológicas 2006.* Universidad Nacional del Nordeste. Resumen: A-049.

- Carlson, J. (1973) "Morphology" En: Soybeans: improvement, production and uses. Agronomy Monograph, Madison. 16:17-95.
- Carrera, C., M. Martínez, J. Dardanelli, M. Balzarini (2009) "Water deficit effect on the relationship between temperature during the seed filling period and soybean seed oil and protein concentrations" Crop Sci. 49:990-998.
- Chaitanya, K., D. Sundar, A. Reddy (2001) "Mulberry leaf metabolism under high temperature stress" Biol Plant. 44:379-384.
- Chaves, M., J. Maroco, J. Pereira. (2003) "Understanding plant responses to drought- from genes to the whole plant" Funct Plant Biol. 30:239-264.
- Davies, S., N. Turner, J. Palta, K. Siddique, J. Plummer (2000) "Remobilisation of carbon and nitrogen supports seed filling in chickpea subjected to water deficit" Aust J Agric Res. 51:855-866.
- de Souza, P., D. Egli, W. Bruening (1997) "Water stress during seed filling and leaf senescence in soybean" Agron J. 89:807-812.
- Dhindsa, R. (1982) "Inhibition of protein synthesis by products of lipid peroxidation" Phytochem. 21:309-313.
- Di Rienzo, J., F. Casanoves, M. Balzarini, L. González, M. Tablada, C. Robledo (2010) InfoStat. Grupo InfoStat; FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dornbos, D., R. Mullen (1991) "Influence of stress during soybean seed fill on seed weight, germination, and seedling growth rate" J Plant Sci. 71:373-383.
- Egli, D., I. Wardlaw (1980) "Temperature Response of Seed Growth Characteristics of Soybeans" Agron J. 72:560-564.
- Egli, D., J. Fraser, J. Leggett, C. Poneleit. (1981) "Control of seed growth in soya beans (*Glycine max* (L.) Merrill)" Annals Bot. 48:171-176.
- Egli, D. (1994) "Cultivar maturity and reproductive growth duration in soybean" J Agron Crop Sci. 173:249-254.
- Egli, D. (1997) "Cultivar maturity and response of soybean to shade stress during seed filling" Field Crops Res. 52:1-8.
- Egli, D. (1998) "Seed growth rate and seed fill duration: variation and regulation" and "yield components-regulation by the seed" En: Seed biology and the yield of grain crop. CAB International, UK. Pp. 38-112.
- Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita, S. Basra (2009) "Plant drought stress: effects, mechanisms and management" Agron Sustain Dev. 29:185-212.
- Farquhar, G., K. Hubick, A. Codon, R. Richards (1989) "Carbon isotope fractionation and plant water use efficiency". En: Stable isotopes in ecological research. Springer-Verlag, New York. Pp. 220-240.
- Fehr, W., C. Caviness (1977) "Stages of soybean development" Special Report 80. Iowa State University, Ames, Iowa. Pp. 11.

- Flexas, J., J. Escalona, H. Medrano (1998) "Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevine leaves" *Aust J Plant Physiol.* 25:893-900.
- Flexas, J., J. Bota, F. Loreta, G. Cornic, T. Sharkey (2004) "Diffusive and metabolic limitation to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants" *Plant Biol.* 6:269-279.
- Foyer, C., M. Lelandais, K. Kunert (1994) "Photooxidativestress in plants" *Physiol Planta.* 92:696-717.
- Fujimoto, H., W. Neff, E. Frankel (1984) "The reaction of DNA with lipid oxidation products, metals, and reducing agents" *Biochem Biophys.* 795:100-107.
- Gabriel, K (1971) "The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis" *Oxford J.* 58:453-467.
- Gaspar, T., T. Franck, B. Bisbis, C. Kevers, L. Jouve, J. Hausman, J. Dommes (2002) "Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures" *Plant Growth Regul.* 37:263-285.
- Gibson, L., R. Mullines (1996) "Influence of day and night temperatures on soybean seed yield." *Crop Sci.* 36:98-104
- Greer, D. (1998) "Photoinhibition of photosynthesis in dwarf bean (*Phaseolus vulgaris L.*) leaves: effect of sink-limitations induced by changes in daily photon receipt" *Planta.* 205:189-196.
- Grumberg, B., C. Guzzo, S. Salloum, E. Tommasino, M. Sagadin, C. Luna (2013) "El estrés oxidativo como herramienta para la selección temprana de genotipos de soja tolerantes al estrés por sequía". II Workshop Internacional de Ecofisiología de Cultivos. Resumen Sección II. Mar del Plata, Argentina.
- Guan, H., H. Janes (1991) "Light Regulation of Sink Metabolism in Tomato Fruit" *Plant Physiol.* 96:916-921.
- Hatfield, J., R. Carlson (1978) "Photosynthetically Active Radiation, CO₂ Uptake, and Stomatal Diffusive Resistance Profiles Within Soybean Canopies" *Agron J.* 70:592-596.
- Hayati, R., D. Egli, S. Crafts-Brandner (1996) "Independence of nitrogen supply and seed growth in soybean: studies using an in vitro culture system" *J Journal Exp Bot.* 47:33-34.
- Heath, R. Packer (1968) "Photoperoxidation in isolated chloroplast: I- Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation" *Arch Biophys.* 125:189-198.
- Herridge, D., J. Pate, R. Rainbird (1978) "Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea" *Plant Physiol.* 62:495-498.
- Howarth, C. (2005) "Genetic improvements of tolerance to high temperature". En: *Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches.* Howarth Press Inc., New York.
- Hsiao, T. (1973) "Plant responses to water stress" *Plant Physiol.* 24:519-570.
- Huber, S., H. Rogers, F. Mowry (1984) "Effects of water stress on photosynthesis and carbon partitioning in soybean (*Glycine max L. Merr.*) plants grown in the field at different CO₂ levels" *Plant Physiol.* 76:244-249.

- Idso, S., R. Jackson, P. Pinter, R. Reginato, J. Hatfield (1981) "Normalizing the stress-degree-day parameter for environmental variability" *Agric Meteorol.* 24:45-55.
- Inamullah, A., A. Isoda (2005) "Adaptive responses of soybean and cotton to water stress. Changes in CO₂ assimilation rate, chlorophyll fluorescence and photochemical reflectance index in relation to leaf temperature" *Plant Proct Sci.* 8:131-138.
- IPCC (2012) "Managing the risks of events and disasters to advance climate change adaptation. A special report of working groups I and II of the intergovernmental panel on climate change. Ed: Field, C., T. Barros, T. Stocker, D. Quin, D. Dokken, K. Ebi, M. Mastrandrea, K. Mach, G. Plattner, S. Allen, M. Tignor, P. Midgley). Cambridge University Press, Cmabridge, UK, and New York, NY, USA. Pp. 582.
- Jaleel, C., P. Manivannan, B. Sankar, A. Kishorekumar, R. Gopi, R. Somasundaram, R. Panneerselvam (2007b) "Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*; effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation" *Colloids Surf. B: Bioint.* 60:110-116.
- Jaleel, C., P. Manivannan, B. Sankar, A. Kishorekumar, S. Sankari, R. Panneerselvam (2007e) "Paclobutrazol enhances photosynthesis and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*" *Process Biochem.* 42: 1566-1570.
- Johnson, R.,D. Wichern (2002) "Principal Components, in Applied Multivariate Analysis, 5th edition, ed. by Prentice Hall, New Jersey, Pp. 430–480.
- Kantolic, A., P. Giménez, C. Gutiérrez Hachard, J. Saráchaga (1995) "Tolerancia a la sequía durante el período reproductivo: comparación del comportamiento de dos isolíneas de soja con diferente tipo de crecimiento" *Actas II Reunión Nacional de Oleaginosas - Congreso Nacional de soja.* Pergamino. Pp.143-150.
- Kantolic, A., E. Giménez y E. de la Fuente (2006) "Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad de soja" En: *Producción de Granos. Bases funcionales para su manejo.* Buenos Aires. Pp.165-201.
- King, C., L. Purcell (2005) "Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids" *Plant Physiol.* 137:1389-1396.
- Kramer, P (1974) "Relaciones hídricas de suelos y plantas" Edutex S.A. México. Pp. 538
- Ladrera, R., D. Marino, E. Larrainzar, E. Gonzalez, C. ArreseIgor (2007) "Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean" *Plant Physiol.* 154:539-54.
- Lawlor D. (1995) "The effects of water deficit on photosynthesis" En: *Environment and Plant Metabolism.* Ed: Smirnoff, N. Bios Scientific Publishers, Oxford.Pp.129–160.
- Lodwig, E. P. Poole (2003) "Metabolism of Rhizobium bacteroids" *Crit Rev Plant Sci.* 22:37–78.
- Lowry, O., N. Rosenbrough, A. Farr, R. Randall (1951) "Protein measurement with the Folin Phenol Reagent" *Biol Chem.* 193:265-275.

Maestri, E., N. Klueva, C. Perrotta, M. Gulli, H. Nguyen, N. Marmioli (2002) “Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals” *Plant Mol Biol.* 48:667–681

Medina, M (2007) “Variaciones en el contenido relativo de agua y la concentración de prolina en *Capsicum annuum* L. inducido por NaCl” *Arnaldoa.* 14:251-258.

Micucci, F., C. Álvarez (2004) “El agua en los cultivos extensivos III: Impacto de las prácticas de manejo sobre la eficiencia de uso del agua” *Inf Agron.* 8:1-4.

Mittler, R. (2002) “Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance” *Trends Plant Sci.* 7:405-410.

Mittler, R. (2006) “Abiotic stress, the field environment and stress combination” *Trend Plant Sci.* 11:15–19.

Mohammed G., W. Binder, S. Gillies (1995) “Chlorophyll fluorescence: A review of its practical forestry applications and instrumentation” *Scand J For Resour.* 10:383–410.

Pate, J., C. Atkins (1983) “Nitrogen uptake, transport, and utilization” En: *Nitrogen Fixation*, Oxford, Univ. Press.

Perrotta, C., A. Treglia, G. Mita, E. Giangrande, P. Rampino, G. Ronga, G. Spano, N. Marmioli (1998) “Analysis of mRNAs from ripening wheat seeds: the effect of high temperature” *J Cereal Sci.* 27:127–132.

Prasad, P., K. Boote, J. Vu, L. Allen (2004) “The carbohydrate metabolism enzymes sucrose-P synthase and ADG-pyrophosphorylase in phaseolus bean leaves are up-regulated at elevated growth carbon dioxide and temperature” *Plant Sci.* 166:1565–1573.

Prasad, P., S. Staggenborg, Z. Ristic (2008) “Impacts of Drought and/or Heat Stress on Physiological, Developmental, Growth, and Yield Processes of Crop Plants” *Manhattan, Agricultural Systems Modeling Series.* Pp 301-135.

Priestley, D. (1986) “Seed ageing Implications for seed storage and persistence in the soil” *Cornell University Press, Ithaca, USA.* Pp. 5-303.

Rizhysky, L., H. Liang, J. Shuman, V. Shulaev, S. Davletova, R. Mittler (2004) “When defense pathways collide: The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress” *Plant Physiol.* 134:1683–1696

Rondanini, D., R. Savinb, A. Halla (2003) “Dynamics of fruit growth and oil quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) exposed to brief intervals of high temperature during grain filling” *Field Crops Res.* 83:79-90.

Rose, I. (1988) “Effects of moisture stress on the oil and protein components of soybean seeds” *Aust J Agric R.* 39:163-170.

Rotundo, J., M. Westgate (2010) “Rate and Duration of Seed Component Accumulation in Water-Stressed Soybean” *Crop Sci.* 50:676-684.

SAGPyA. En: [http://dev.siiia.gov.ar//_informes/Estimaciones_Agricolas/Mensual/130919_Informe %20Mensual%20Estimaciones%20-%20Sep-2013.pdf](http://dev.siiia.gov.ar//_informes/Estimaciones_Agricolas/Mensual/130919_Informe%20Mensual%20Estimaciones%20-%20Sep-2013.pdf). (Revisado 9/10/2013).

Schubert, K. (1986) "Products of Biological Nitrogen Fixation in Higher Plants: Synthesis, Transport, and Metabolism" *Plant Physiol.* 37:539-574.

Serraj, R., T. Sinclair, L. Purcell (1999a) "Symbiotic N₂ fixation response to drought" *J Exp Bot.* 50:143-155.

Serraj, R., V. Vadez, R. Denison, T. Sinclair (1999b) "Involvement of ureides in nitrogen fixation inhibition in soybean" *Plant Physiol.* 119:289-296.

Serraj, R., T. Sinclair (2003) "Evidence that carbon dioxide enrichment alleviates ureide-induced decline of nodule nitrogenase activity" *Annals Bot.* 91:85-89.

Shaw, H., R. Laing (1966) "Moisture Stress and Plant Response" En: *Plant Environment and Efficient Water Use*. Ed: Pierre, W., D. Kirkham, J. Pesek, R. Shaw. American Society of Agronomy and the Soil Science Society of America, Madison. Pp.73-94.

Sinclair T., L. Purcell, V. Vadez, R. Serraj, C. King, R. Nelson (2000) "Identification of Soybean Genotypes with N₂ Fixation Tolerance to Water Deficits" *Crop Sci.* 40:1803-1809.

Sinclair, T., L. Purcell, C. King, C. Sneller, P. Chen, V. Vadez (2007) "Drought tolerance and yield increase of soybean resulting from improved symbiotic N₂ fixation" *Field Crop Res.* 101:68-71.

Spears, J., D. Tekrony, D. Egli (1997) "Temperature during seed filling and soybean seed germination and vigour" *Seed Sci Tech.* 25:233-244.

Stone, P., M. Nicolas (1994) "Wheat Cultivars Vary Widely in Their Responses of Grain Yield and Quality to Short Periods of Post-Anthesis Heat Stress" *Aust J Plant Physiol.* 21:887-900.

Stone, J., T. Kolb, W. Covington (1999) "Effects of restoration thinning on presettlement *Pinus ponderosain* Northern Arizona" *Restoration Ecol.* 7:172-182.

Taiz L., E. Zeiger (2008) "Stress physiology" En: *Plant physiology*. California, Sinauer Associates Inc. Pp.1129-1189.

Tambussi, E., C. Bartoli, J. Guiamet, J. Beltrano, J. Araus (2004) "Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves" *Plant Sci.* 167:19:26.

Tennant, D., D. Hall (2001) "Improving water use of annual crops and pastures: limitations and opportunities in western Australia" *Aust. J. Agric. Res.* 52:171-182.

Tetley, R., K. Thimann (1974) "The metabolism of oat leaves during senescence. Respiration, carbohydrate metabolism and the action of cytokinins" *Plant Physiol.* 54:294:303.

Tollenaar, M., T. Bruulsema (1988) "Efficiency of Maize Dry Matter Production During Periods of Complete Leaf Area Expansion" *Agron J.* 80:580-585.

USDA: United States Department of Agriculture (2013) "World Agricultural Supply and Demand Estimación" Disponible en <http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf> (revisado 11/11/2013).

Vadez, V., T. Sinclair, R.Serraj (2000) "Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N₂ fixation in soybean" *Physiol Plant.* 110:215-223.

Vance, C., S. Miller, J. Liu, J. Gantt, D. Samac (2005) "Carbon and nitrogen metabolism in legume nodule". En: Model Legume Congress. California, S32.

Vogels, G., C. Van der Drift (1970) "Differential analyses of glyoxylate derivatives" Anal Biochem. 1:143-157.

Wahid, A., S. Gelani, M. Ashraf, M Foolad (2007) "Heat tolerance in plants: An overview" Env Exp Bot. 61:199-223.

Wardlaw, I., C. Wrigley (1994) "Heat Tolerance in Temperate Cereals: an Overview" Aust J Plant Physiol. 21:695-703.

Wardlaw, I., C. Blumenthal, O. Larroque, C. Wrigley (2002) "Contrasting effects of chronic heat stress and heat shock on kernel weight and flour quality in wheat" Funct Plant Biol. 29:25-34.

Willits, D., M. Peet (2001) "Measurement of Chlorophyll Fluorescence as a Heat Stress Indicator in Tomato: Laboratory and Greenhouse Comparisons" Amer Soc Hort Sci. 126:188-194.

Wittenbach, V., R. Ackerson, R. Giaquinta, R. Hebert (1980) "Changes in Photosynthesis, Ribulose Bisphosphate Carboxylase, Proteolytic Activity, and Ultrastructure of Soybean Leaves during Senescence" Crop Sci. 20:225-231.

Xu, Z., G. Zhou (2006) "Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*" Planta. 224:1080-1090.

