

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EPISODIOS DE ALTA TEMPERATURA Y DÉFICIT
HÍDRICO EN SOJA: CINÉTICA DE ACUMULACIÓN DE
COMPONENTES QUÍMICOS DEL GRANO Y
BIOSÍNTESIS DE TOCOFEROLES**

Ing. Agr. Rodolfo Ezequiel Andrés Veas

Directora: Dra. Constanza Soledad Carrera

Director Asociado: Dr. Hernán Ramiro Lascano

**Unidad de Estudios Agropecuarios (UDEA), Instituto de Fisiología y Recursos
Genéticos Vegetales (IFRGV), Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP),
INTA**



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina

2023

COMISIÓN ASESORA

...Nombre y Apellido.....,Lugar de Trabajo.....

...Nombre y Apellido.....,Lugar de Trabajo.....

...Nombre y Apellido.....,Lugar de Trabajo.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su cariño y su apoyo desde siempre. Por incentivar me cada día a desarrollarme y crecer tanto personal como profesionalmente. Gracias por enseñarme los valores que me han llevado a alcanzar esta gran meta.

A mi hermana, por ser mi compañera en todo momento. Desde los inicios, compartiendo innumerables momentos, charlas, aliento, intercambios de ideas y por sobre todo estar a la par.

A Andy, por su acompañamiento incondicional, sus consejos. Gracias por caminar a mi lado.

A la Dra. Constanza S. Carrera, mi directora. Gracias por brindarme la posibilidad de llevar adelante este proyecto de tesis doctoral, por confiar en mí, por tus enseñanzas. Gracias por transmitir tu pasión por la ciencia y siempre motivarme a seguir superándome.

Al Dr. Ramiro Lascano, mi director asociado. Por el acompañamiento durante esta etapa, por permitirme trabajar en libertad.

Al Dr. Diego Soldini, de la EEA INTA Marcos Juárez por proveer los genotipos que utilizamos para el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Verónica Ergo, mi compañera desde los inicios de este proyecto. Gracias por todo lo compartido, nuestras horas de campo, laboratorio, viajes. Por tus consejos y escuchar siempre.

A la Dra. Claudia Vega por su apoyo y experiencia. Gracias por abrirme las puertas para formar parte del grupo de Ecofisiología del INTA Manfredi. Gracias también a los compañeros de la sección: Camilo, Fede, Catriel, Vani, Francisco, por su ayuda en distintas tareas y todo lo vivido.

A los Dres. Deborah Rondanini, Damián Maestri, Ramón Asís por su asesoramiento, ayuda en las tareas de laboratorio y consejos durante la realización de esta tesis.

A la comisión evaluadora, por aceptar la revisión de esta tesis y promover mejoras en el manuscrito.

A mis amigos de la vida, por acompañarme y estar presentes desde siempre.

A mis compañeros y amigos del IFRGV y el IPAVE, CIAP, INTA: Anto, Lou, Pablo, Juan, Maga, Joaco, Tadeo, Sofi, Flor, Sora, Emi, Lucio, Mike, Migue, Andrés. Gracias por cada momento compartido, por los consejos, charlas. Por ayudarme a transitar este camino.

Al Dr. Germán Robert, por ayudarme en las determinaciones de laboratorio. Por su paciencia y recomendaciones.

A todos aquellos que colaboraron en tareas de campo y laboratorio, facilitando la utilización de equipos e instalaciones.

Al Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV), Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), INTA, por el otorgamiento de la beca doctoral con la cual pude llevar adelante esta tesis.

PUBLICACIONES

Publicaciones en revistas científicas

Título: Soybean seed growth dynamics exposed to heat and water stress during the filling period under field conditions

Autores: Veas, Rodolfo E.A.; Ergo, Verónica V.; Vega, Claudia R.C.; Lascano, Hernán R.; Rondanini, Deborah P.; Carrera, Constanza S.

Revista/Año: Journal of Agronomy and Crop Science/ 2021

Publicaciones en congresos

1. “Dynamics of tocopherol concentrations accumulation in soybean exposed to brief episodes of heat and drought stress during grain filling”. **Veas Rodolfo**, Ergo Verónica, Asís Ramón, Lascano Ramiro, Carrera Constanza. XXXIV Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal. 24 al 27 de septiembre de 2023. Rosario, Argentina. Participación: asistente y presentación de trabajo en forma de poster.
2. “Composición de tocoferoles en soja bajo estrés térmico e hídrico durante el llenado de grano: variación según la posición en el canopeo”. **Veas Rodolfo**, Ergo Verónica, Asís Ramón, Lascano Ramiro, Rondanini Deborah, Carrera Constanza. VII Congreso de la Soja en Mercosur: Mercosoja 2019 y a Todo Soja. Fecha: 4 y 5 de septiembre de 2019. Participación: asistente y presentación de trabajo en forma oral.
3. “Composition of soybean oil responds to heat and water stress and the position of pod”. **Veas Rodolfo**, Ergo Verónica, Maestri Damián, Rondanini Deborah, Lascano Ramiro, Vega Claudia, Carrera Constanza. XXXII Reunión Argentina y el XVI Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. Noviembre 2018, Córdoba, Argentina.
4. “Peso de granos en soja no transgénica contrastante en contenido de proteína: efectos del estrés térmico e hídrico”. **Veas Rodolfo**, Ergo Verónica, Vega Claudia, Lascano Ramiro, Rondanini Deborah, Carrera Constanza. III Workshop Internacional de Ecofisiología Vegetal, Mar del Plata, septiembre 2017.
5. “Calidad química del grano de soja en genotipos no transgénicos expuestos a estrés térmico e hídrico durante el llenado”. **Veas Rodolfo**, Ergo Verónica, Ruffino Romina, Olmos Leandro, Vega Claudia, Carrera Constanza. XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Corrientes, noviembre de 2016.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	5
CAPÍTULO 1	6
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	6
1. Perspectivas climáticas e implicancias en la producción de soja	6
2. Efecto de estreses abióticos sobre el peso y la calidad de grano.....	7
2.1 Efectos de estrés térmico por altas temperaturas.....	7
2.2 Efectos del estrés por déficit hídrico	10
2.3 Efectos combinados de estrés térmico e hídrico.....	11
2.4 Mecanismos fisiológicos implicados en la respuesta al estrés térmico e hídrico	13
3. Efecto de la posición de la vaina en el canopeo sobre el peso y la calidad de grano	14
4. Objetivos	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
5. Hipótesis.....	16
6. Estructura de tesis.....	16
CAPÍTULO 2.....	18
DINÁMICA DE CRECIMIENTO DEL GRANO DE SOJA EXPUESTO A ESTRÉS TÉRMICO E HÍDRICO DURANTE EL PERIODO DE LLENADO	18
1. Introducción	18
2. Objetivo.....	19
3. Materiales y métodos	20
3.1 Mediciones en las plantas.....	23
3.2 Análisis estadístico.....	25
4. Resultados	25
4.1 Caracterización ambiental y de los estreses	25
4.2 Rendimiento y componentes: número de granos y peso de grano	28
4.3 Relación fuente destino	30
4.4 Peso individual y dinámica de crecimiento de granos en vainas con la misma edad fenológica	32
4.5 Contenido hídrico de los granos	35
4.6 Tamaño de la vaina	38
5. Discusión.....	41
6. Conclusiones	44
CAPÍTULO 3.....	46
CALIDAD DEL GRANO DE SOJA EXPUESTO A ESTRÉS TÉRMICO E HÍDRICO DURANTE EL PERIODO DE LLENADO	46
1. Introducción	46

2.	Objetivos	49
3.	Materiales y métodos	49
3.1	Determinaciones de calidad química final del grano	49
3.2	Calidad química de granos por estratos.....	50
3.3	Análisis estadístico	51
4.	Resultados	52
4.1	Composición final de granos: concentración y contenido de proteína, aceite y fracción residual	52
4.2	Composición por estrato: concentración y contenido de proteína, aceite y fracción residual	55
4.3	Relaciones entre proteína, aceite y fracción residual con la relación fuente destino, contenido máximo de agua y peso de vaina	66
4.4	Concentración de ácidos grasos insaturados y relación ácido oleico linolénico	67
4.5	Concentración de tocoferoles	70
4.6	Relaciones entre tocoferoles, peso de grano y aceite en el grano.....	73
5.	Discusión.....	75
6.	Conclusiones	80
CAPÍTULO 4.....		82
ASOCIACIONES ENTRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GRANO Y VARIABLES ECOFISIOLÓGICAS RELACIONADAS A LA FUENTE DE CARBONO Y NITRÓGENO EN SOJA BAJO ESTRÉS TÉRMICO, ESTRÉS HÍDRICO Y SU INTERACCIÓN.....		82
1.	Introducción	82
2.	Objetivo.....	83
3.	Materiales y métodos	84
3.1	Determinación de variables ecofisiológicas	84
3.2	Análisis estadístico.....	86
4.	Resultados	87
4.1	Variables ecofisiológicas relacionadas a la fuente de carbono y nitrógeno en soja.....	87
4.2	Asociaciones entre variables ecofisiológicas y de calidad química del grano de soja	90
5.	Discusión.....	97
6.	Conclusiones	102
CAPÍTULO 5.....		104
EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA BIOSÍNTESIS DE TOCOFEROLES EN GRANOS DE SOJA EXPUESTA A ESTRÉS TÉRMICO Y DÉFICIT HÍDRICO DURANTE EL LLENADO		104
1.	Introducción	104
2.	Objetivo.....	108
3.	Materiales y métodos	108
3.1	Tratamientos y diseño experimental.....	109
3.2	Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR.....	111
3.3	Mediciones fisiológicas	112

4. Resultados	113
4.1 Caracterización del régimen térmico durante la imposición de los tratamientos de estrés.....	113
4.2 Evaluación de variables fisiológicas	114
4.3 Concentración de tocoferoles en distintos estadios fenológicos del llenado de granos	117
4.4 Análisis de genes relacionados a la biosíntesis de tocoferoles.....	120
5. Discusión.....	124
6. Conclusiones	127
CAPÍTULO 6.....	129
CONCLUSIONES, APORTES Y PERSPECTIVAS	129
1. Asociaciones entre variables relacionadas al peso de grano, calidad química del grano y funcionamiento de la fuente fotosintética: integración, conclusiones y aportes.....	129
2. Contraste de hipótesis.....	135
3. Perspectivas.....	137
BIBLIOGRAFÍA.....	139
ANEXO.....	163

ABREVIATURAS

Ac: aceite	IC: índice de cosecha
ACP: análisis de componentes principales	IET: índice de estrés térmico
ADN: ácido desoxirribonucleico	Li: ácido linoleico
AGI: ácidos grasos insaturados	Ln: ácido linolénico
ARN: ácido ribonucleico	Max: máxima
C/N: relación carbono nitrógeno	MCA: máximo contenido de agua
C: carbono	Mín: mínima
CAU: contenido de agua disponible en el suelo	MPBQ2: gen que codifica para la enzima 2-metil-6-fitol-1,4-benzoquinona
CHS: contenido hídrico del sustrato	MPBQ4: gen que codifica para la enzima 2-metil-6-fitol-1,4-benzoquinona
CP: componente principal	MPBQ-MT: enzima 2-metil-6-fitol-1,4-benzoquinona metiltransferasa
CRA: contenido relativo de agua	N: nitrógeno
DA: duración de acumulación	NG: número de granos
DLLG: duración del llenado de grano	NH: nivel hídrico
DMS: test de diferencia mínima significativa	NS: no significativo
DPV: déficit medio de presión de vapor ambiental	NT: nivel térmico
EAO: especies activas del oxígeno	Ol: ácido oleico
EH: estrés hídrico	Ol/Ln: relación oleico linolénico
EI: estrato inferior	PF: peso fresco
ES: estrato superior	PG: peso de grano
ET: estrés térmico por alta temperaturas	PG_E: peso de grano estratificado
ET×EH: interacción estrés térmico por estrés hídrico	PG_P: peso de grano de la parcela
Exp: experimento	PH: peso húmedo
F/D: relación fuente destino	PMP: punto de marchitez permanente
G: genotipo	Pr: proteína
HPPD: hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	PS: peso seco
HPT: homogentisato fitil transferasa	PT: peso turgente
HR: humedad relativa	R/RL: relación rojo rojo-lejano
IAF: índice de área foliar	Res: fracción residual
	RFAI: radiación fotosintéticamente activa interceptada por el cultivo

RFAI_{R5-R7}: radiación
fotosintéticamente activa interceptada
acumulada durante el llenado de grano
RT-qPCR: reacción en cadena de la
polimerasa con transcripción reversa
T: temperatura
TA: tasa de acumulación
TC: temperatura del canopeo
TCG: tasa de crecimiento individual
del grano
TMT1: gen que codifica para la enzima
gamma tocoferol metiltransferasa

TMT2: gen que codifica para la enzima
gamma tocoferol metiltransferasa
TMT3: gen que codifica para la enzima
gamma tocoferol metiltransferasa
Toc: tocoferol
α: alfa
β: beta
γ: gamma
γ-TMT: enzima gamma tocoferol
metiltransferasa
δ: delta

RESUMEN

La soja [*Glycine max* (L.) Merr.], abastece más del 59% de la demanda global de proteína (Pr) y aceite (Ac) vegetal. El cultivo se realiza mayoritariamente bajo secano y suele atravesar eventos de alta temperatura y/o déficit hídrico, impactando negativamente en el rendimiento y calidad del grano. El objetivo general de esta tesis fue analizar el impacto de episodios de altas temperaturas y estrés hídrico sobre la dinámica de acumulación de los componentes industriales y la calidad final del grano de soja, la biosíntesis de tocoferoles, removilización aparente de reservas y el funcionamiento de la fuente fotosintética. Se realizaron dos experimentos a campo con dos genotipos de soja no transgénicos contrastantes en Pr en grano: Alim5.09 (42%) y Jocketta (37%). Se utilizó un diseño experimental en parcelas sub-subdivididas con dos repeticiones, generando cuatro tratamientos: control (riego bajo temperatura ambiente), estrés térmico (ET) (episodios con temperaturas >32°C; 6h alrededor del mediodía, 15 días desde el inicio del llenado de grano (LLG)), estrés hídrico (EH) (contenido de agua útil en el suelo ~25% todo el LLG) y ET×EH. Se condujo un tercer experimento en invernadero utilizando Alim5.09 expuesto a los mencionados tratamientos. Respecto al control, el ET individual no produjo modificaciones en el peso de grano (PG) ni en la composición química del mismo. Esta respuesta se relacionó con mecanismos que permitieron mantener la fuente fotosintética y la producción de asimilados luego de finalizado el ET. El EH solo o combinado con ET redujo el PG en ambos genotipos (~18%) tanto a nivel de planta como de estratos. Estas reducciones se relacionaron con la tasa de crecimiento del grano, y no así con la duración del llenado de grano. El EH y/o ET×EH redujeron el contenido (Cont) de Pr, Ac y fracción residual (Res) debido a una menor tasa de acumulación de estos compuestos, más que a una reducción en la duración de su acumulación. La concentración (Conc) de Pr y Res disminuyó (4% y 1%, respectivamente). Estas caídas se asociaron a una menor radiación fotosintéticamente activa interceptada y acumulada durante el LLG y a una menor relación fuente destino. Aunque la Conc Ac se mantuvo o incrementó levemente, su composición cambió significativamente, incrementándose el ácido oleico (Ol) y disminuyendo los ácidos linoleico (Li) y linolénico (Ln), aumentando la relación Ol/Ln. También aumentó la concentración de alfa tocoferol (AT) y disminuyó delta tocoferol (DT), sin cambios en los tocoferoles totales. Los aumentos en estas variables estuvieron asociados a incrementos de la temperatura del canopeo (TC). A través de los tratamientos, los granos provenientes del estrato superior del canopeo mostraron mayor PG, Conc Pr, menor Conc Res, Li y Ln en comparación con los del estrato inferior. Alim5.09, presentó mayor PG y por ende un mayor Cont Pr, Ac y Res, así como una mayor Conc Pr, AT y beta tocoferol (BT) en comparación con Jocketta, características que, en general, se mantuvieron a través de los experimentos y tratamientos. La biosíntesis de tocoferoles presentó una dinámica temporal a lo largo del LLG, con mayor acumulación de DT entre R5.5 y R6, mientras que AT, BT y gamma tocoferol (GT) se acumularon mayormente entre R7 y R8. El aumento de AT ante ET, EH y ET×EH se relacionó con el aumento en los niveles de expresión de los genes TMT que codifican para la enzima que interviene en la conversión de GT en AT. El aumento de AT se relacionó con incremento de la TC asociado a reducciones del contenido relativo de agua de las hojas y de la fotosíntesis. Este trabajo proporciona información relevante y novedosa sobre el impacto del ET, EH y ET×EH en la calidad final del grano de soja como así también en la dinámica de acumulación de los distintos componentes que la determinan, aspecto escasamente explorado en la bibliografía. A través de una aproximación bioquímica-ecofisiológica, se integran escalas de estudio a nivel de órgano, planta y cultivo. Los resultados sobre tocoferoles, permitieron asociar sus concentraciones con cambios en los niveles de expresión génica a lo largo del LLG. La información obtenida puede ser potencialmente utilizada en mejoramiento genético, a fin de seleccionar plantas cuyos granos presenten características diferenciales de calidad química, como

así también para el desarrollo de estrategias de manejo ante condiciones de estrés abiótico, lo cual resulta clave para la agricultura y la industria de alimentos.

ABSTRACT

Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] supplies over 59% of the global demand for vegetable protein (Pr) and oil. The crop is predominantly grown under rainfed conditions and often experiences high-temperature and/or water deficit events, negatively impacting grain yield and quality. The main objective of this thesis was to analyze the impact of high-temperature episodes and water stress on the dynamics of industrial components accumulation and final soybean grain quality, tocopherol biosynthesis, apparent reserve remobilization, and photosynthetic source performance. Two field experiments were conducted using two non-genetically modified soybean genotypes contrasting in grain Pr: Alim5.09 (42%) and Jocketta (37%). An experimental design involving split-split plots with two replications was employed, generating four treatments: control (irrigation under ambient temperature), heat stress (HS) (episodes with temperatures $>32^{\circ}\text{C}$; 6h around noon, 15 days from the beginning of grain filling (GF)), water stress (WS) (soil available water content $\sim 25\%$ throughout GF), and HS \times WS. A third greenhouse experiment was conducted using Alim5.09 exposed to mentioned treatments. Individual HS produced no modifications in grain weight (GW) or its chemical composition. This response was linked to mechanisms that allowed the maintenance of photosynthetic source and assimilate production after HS culmination. The WS alone or combined with HS, decreased GW on both genotypes ($\sim 18\%$) at both plant and canopy levels. These reductions were associated with grain growth rate rather than grain filling duration. The WS and/or HS \times WS reduced protein, oil, and residual fraction (Res) content due to a slower accumulation rate of these compounds rather than a reduction in their accumulation duration. Protein and Res concentrations decreased (4% and 1%, respectively). These declines were attributed to less intercepted and accumulated photosynthetically active radiation during GF and a lower source-sink ratio. Although oil concentration remained stable or slightly increased, its composition changed significantly, with an increase in oleic acid (Ol) and a decrease in linoleic (Li) and linolenic (Ln) acids, resulting in an increased Ol/Ln ratio. Alpha-tocopherol (AT) concentration increased, while delta-tocopherol (DT) decreased, without changes in total tocopherols. The increases in these variables were associated with canopy temperature (CT) increments. Across treatments, grains from the upper canopy position exhibited higher GW and Pr concentration, lower Res, Li, and Ln concentrations compared to those from the lower canopy. Alim5.09 presented higher GW, and consequently higher Pr, Ac, and Res contents, as well as higher Pr, AT, and beta-tocopherol (BT) concentrations compared to Jocketta, characteristics that were maintained throughout the experiments. Tocopherol biosynthesis exhibited temporal dynamics throughout GF, with greater DT accumulation between R5.5 and R6, while AT, BT, and gamma-tocopherol (GT) accumulated mostly between R7 and R8. The increase in AT under HS, WS, and HS \times WS was associated to elevated expression levels of TMT genes encoding the enzyme involved in GT to AT conversion. The increase in AT was concomitant with CT elevation, linked to reductions in leaf relative water content and photosynthesis. This work provides relevant and novel information regarding the impact of HS, WS, and HS \times WS on final soybean grain quality as well as the accumulation dynamics of several determined components, an aspect scarcely explored in the literature. Through a biochemical-ecophysiological approach, we integrated different scales of study at the organ, plant, and crop levels. Tocopherol results allowed the association of their concentrations with changes in gene expression levels throughout GF. The information generated could potentially be useful in genetic improvement to select plants with different chemical quality traits in their grains, as well as for the development of management strategies under abiotic stress conditions, which is crucial for the agriculture and food industry.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Perspectivas climáticas e implicancias en la producción de soja

La soja [*Glycine max* (L.) Merr.] representa aproximadamente 35% de la producción total de granos y 42% de la superficie agrícola sembrada en Argentina, convirtiéndose en el principal cultivo a nivel nacional (MAGYP, 2023). Argentina contribuye con el 7% de la producción mundial de soja, siendo el tercer exportador mundial de granos y el principal de productos derivados como harina y aceite (Ac) (USDA, 2023), resaltando la importancia de la calidad de dicho grano para el país. Sin embargo, una problemática actual de la industria argentina son los altos costos del procesamiento de la harina debido a los bajos valores de proteína (Pr) del grano (Cuniberti et al., 2018). Dado que el 99% del área sembrada con soja en el país es cultivada con germoplasma transgénico y muestra escasa variación entre los cultivares (Carrera et al., 2009), desde el programa de mejoramiento de soja del INTA Marcos Juárez se ha desarrollado germoplasma no transgénico mejorado para distintos atributos de calidad, entre ellos, alto tenor proteico (Soldini, 2010). En este sentido, Carrera et al. (2014a y b) identificaron genotipos no transgénicos que mantuvieron sus características diferenciales de calidad relativamente estables a través de un amplio rango de ambientes en Argentina. Asimismo, a partir de un informe del INASE se desprende que las variedades de soja no transgénicas sembradas en Argentina alcanzaron las 300000 hectáreas aproximadamente durante la campaña 2020-21, con un rendimiento de 40-45 qq/ha en la zona núcleo de producción del país y presentaron un 15% más de proteína respecto a las variedades transgénicas (SISA, 2021). La implementación de estos cultivares en la producción de soja plantea una oportunidad de agregado de valor en origen, acceso a un nicho de mercado con producción diferenciada de calidad y, podrían constituir una alternativa interesante para alcanzar los valores proteicos exigidos en el mercado internacional.

La soja es considerada una de las fuentes de proteína y aceite de mayor calidad de origen vegetal. La proteína del grano de soja contiene todos los aminoácidos esenciales y por ello se han utilizado en la industria alimenticia, tanto humana como animal (Singh et al., 2008; Thrane et al., 2017). El aceite de soja contiene ácidos grasos insaturados como el oleico (Ol), linoleico (Li) y linolénico (Ln). De ellos tres, se destacan el linoleico y linolénico, por ser ácidos grasos poliinsaturados esenciales, es decir, que no pueden ser sintetizados *de novo* por humanos, y que además, poseen efectos benéficos sobre la salud (Valenzuela et al., 1999). El aceite de soja también es utilizado como materia prima para la producción de biodiesel, donde la composición de ácidos grasos puede afectar el comportamiento del aceite como parte de un biocombustible (Graef et al., 2009). Otros compuestos presentes en el aceite en menor proporción son los tocoferoles, conocidos como vitamina E, los cuales poseen una fuerte actividad antioxidante (Frankel, 1989; Fryer, 1992). Dichos componentes inhiben la oxidación de lípidos removiendo

los radicales libres en granos durante el almacenamiento y la germinación (Carrera et al., 2014). Los tocoferoles son considerados compuestos nutraceuticos, dado que además del valor nutricional que le aportan al grano de soja, pueden brindar beneficios adicionales a la salud, entre ellos mejorar el sistema inmunológico y reducir el colesterol (Shintani y Della Pena, 1998; Messina, 1999). Un tercer compuesto del grano de soja son los carbohidratos (fracción residual de aquí en adelante), de los cuales aproximadamente la mitad son estructurales y la otra mitad no estructurales (Karr-Lilienthal et al., 2004). Estos últimos adquieren relevancia dado que gran parte de ellos se consideran factores antinutricionales, asociándose su consumo con problemas digestivos en humanos y animales no rumiantes (Liener, 1994).

La región sojera argentina cubre una vasta área que se extiende desde la latitud 23° a la 39° Sur, lo que representa un amplio rango ambiental. El cultivo se realiza mayoritariamente bajo secano y crece con precipitaciones, radiación solar y temperaturas contrastantes (Dardanelli et al., 2006). La disponibilidad hídrica es el principal factor limitante para el rendimiento de los cultivos (Boyer, 1982). Por otro lado, la temperatura es el factor ambiental más importante que modula el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Thuzar et al., 2010) y puede modificar la calidad de granos (Carrera et al., 2011; Rondanini et al., 2003). El panel intergubernamental sobre el cambio climático (IPCC, 2023) proyectó un aumento de 1,5 y 2°C de la temperatura media (sólo alcanzando la emisión cero) hacia el final de este siglo, a esto se le suma el actual aumento en la frecuencia y severidad de olas de calor y déficit hídrico (Lobell et al., 2011; Pittock et al., 2003). Estudios recientes que incluyen modelos de predicción, indicaron que tanto en Estados Unidos (Elli et al., 2022) como en Brasil y Argentina (Goulart et al., 2023) el aumento del riesgo de pérdidas en el rendimiento de soja se debe principalmente a los efectos a largo plazo del cambio climático y aunque son esperables aumentos de eventos climáticos extremos en América, no ocurrirían de manera conjunta en los tres países. Estas condiciones climáticas adversas pueden comprometer la seguridad alimentaria mundial (Ainsworth y Ort, 2010). Nuestro país también se encuentra inmerso en este contexto de eventos climáticos extremos, particularmente durante los años denominados Niña, en los que la disponibilidad de agua durante la primavera y comienzos del verano es menor (Barros et al., 2015). En este sentido, modelos de simulación de rendimiento en escenarios climáticos futuros de la región del Chaco Argentina, indicaron que el estrés hídrico continuará siendo la principal limitante para la productividad de soja (Casali et al., 2021)

2. Efecto de estreses abióticos sobre el peso y la calidad de grano

2.1 Efectos de estrés térmico por altas temperaturas

El estrés térmico (ET) por altas temperaturas se define como el aumento de la temperatura más allá de un umbral por un período de tiempo suficiente como para causar daños irreversibles en el crecimiento y desarrollo de plantas (Wahid et al., 2007). Las temperaturas altas (32-40 °C) que inducen el estrés térmico afectan a los procesos reproductivos (Prasad et al., 2017), y cuando se

producen durante todo el periodo del llenado, reducen el peso de grano principalmente debido a los cambios en la duración del llenado de grano (Egli y Wardlaw, 1980; Gibson y Mullen, 1996; Thomas et al., 2010). En condiciones de campo, donde las temperaturas varían diurnamente, los episodios de estrés térmico son más probables que los regímenes de temperatura fijos que se utilizan en las cámaras de crecimiento y fitotrones, a menudo impuestos durante todo el período llenado de grano (Egli et al., 2005). Las temperaturas altas tienen mayor impacto negativo sobre la composición química del grano durante el período de llenado, cuando se produce la acumulación de los distintos componentes (Wilson, 2004). El efecto de la temperatura durante el llenado de grano sobre las concentraciones de proteína, aceite, ácidos grasos insaturados y tocoferoles ha sido ampliamente documentado (Almonor et al., 1998; Britz y Kremer, 2002; Carrera et al., 2011; Dornbos y Mullen, 1992; Gibson y Mullen, 1996). Más aún, la temperatura durante dicho período ha sido utilizada como predictora de la calidad química del grano en numerosos estudios (Carrera et al., 2011; Piper y Boote, 1999; Thomas et al., 2003). Estos estudios encontraron que la relación entre la concentración de aceite y temperatura era curvilínea con tendencia cuadrática hasta los 25 °C (Carrera et al., 2009; Piper y Boote, 1999), 27 °C (Thomas et al., 2003) y 29 °C (Dornbos y Mullen, 1992). También para la concentración de proteína se observó que la respuesta a la temperatura presentó una función cuadrática la cual indicó disminuciones del porcentaje de proteína ante incrementos de temperatura entre 14,1 °C y 19,3 °C; incrementándose con temperaturas superiores (Carrera et al., 2009; Piper y Boote, 1999). Sin embargo, dentro un rango de temperatura similar otros estudios reportan un patrón de respuesta diferente. Gibson y Mullen (1996) y Rotundo y Westgate (2009) encontraron que la proteína se incrementaba con temperaturas superiores a 25 °C, Dornbos y Mullen (1992) mostraron una disminución de la misma variable por encima de los 21 °C, mientras que Kumar et al. (2006) encontraron una relación lineal y positiva entre la concentración de proteína y temperatura. Estos resultados aparentemente contradictorios ponen de manifiesto una considerable complejidad en cuanto a variables ambientales que determinan la proteína. La temperatura podría ejercer efecto sobre enzimas que intervienen en la síntesis de los distintos componentes del grano. Así, la síntesis de proteína y aceite requieren de carbono derivado de la sacarosa importada al grano durante el llenado de grano. Dentro del grano, la sacarosa forma glucosa y es metabolizada formando precursores de proteína y aceite, como el fosfoenol piruvato. Adams et al. (1982) y Smith et al. (1989) mostraron que dos enzimas, la fosfoenol piruvato carboxilasa y piruvato quinasa, compiten por la disponibilidad del fosfoenol piruvato, direccionando la síntesis hacia aceite o proteína, dependiendo de la vía metabólica. A menudo se ha observado una relación negativa entre las concentraciones de proteína y aceite que podría deberse a la regulación del flujo de carbono entre estas vías sintéticas competidoras (Hernández-Sebastià et al., 2005).

El aceite de soja está compuesto en promedio por 85% de ácidos grasos insaturados, siendo los principales los ácidos oleico, linoleico y linolénico (Gunstone et al., 2007). Estos también son afectados por las condiciones ambientales durante el llenado de grano. Carrera et al. (2011) observaron que la relación oleico linolénico (Ol/Ln) aumentaba en ambientes cálidos durante el llenado de grano (lo que implica aumentos de oleico y disminuciones de linolénico con temperaturas elevadas), mientras que linoleico y linolénico aumentaron en los ambientes templados y fríos, respectivamente. Dornbos y Mullen (1992) y Oliva et al. (2006) hallaron que bajo condiciones de altas temperaturas durante el llenado de grano, linoleico y linolénico se redujeron proporcionalmente y aumentó el oleico. Esto podría deberse al efecto de la temperatura sobre las enzimas claves (oleato y linoleato desaturasas) que desaturan consecutivamente el oleico a linoleico y linolénico en granos de soja en desarrollo y que, como es sabido, disminuyen su actividad al incrementarse la temperatura (Cheesbrough, 1989; Tang et al., 2005). El aceite de soja contiene, además, tocoferoles en sus cuatro formas: delta, gamma, beta, y alfa tocoferol (Sherwin, 1976). Este último, exhibe la mayor actividad como vitamina E en el cuerpo humano (Warner, 2003). La acumulación de tocoferoles ocurre paralelamente a la del aceite durante el llenado de grano (Almonor et al., 1998); por ello, los factores ambientales durante este periodo afectan el contenido final como la composición de tocoferoles presentes en el grano. Britz y Kremer (2002) y Chennupati et al. (2011) encontraron que las plantas expuestas a 28-29 °C durante todo el llenado de grano tuvieron granos con mayor concentración de alfa tocoferol y menor concentración de delta tocoferol en comparación con los granos provenientes de plantas expuestas a 19-23 °C. Coincidentemente, en un estudio multiambiental se encontró que ambientes cálidos (22,5-25,0 °C) promovían el incremento de la concentración de alfa tocoferol, mientras que ambientes más fríos (17,5-22,4 °C) disminuían la concentración de delta tocoferol y tocoferoles totales en los granos (Carrera et al., 2011). El aumento de alfa tocoferol simultáneamente con la disminución de delta tocoferol en ambientes cálidos podría deberse al efecto de la temperatura sobre la enzima clave gamma metil transferasa (que metila tanto gamma tocoferol en alfa tocoferol y delta tocoferol en beta tocoferol) y/o sobre la expresión del gen que la codifica (Sattler et al., 2004). Además, Park et al. (2019) ha mencionado la relevancia de la enzima 2-metil-6-fitol-1,4-benzoquinona metil transferasa que cataliza la conversión de 2-metil-6-fitol-1,4-benzoquinona en 2,3-dimetil-6-fitol-1,4-benzoquinona, ambos productos sirven de sustrato para la síntesis de las distintas isoformas de tocoferol. Actualmente, según nuestro conocimiento, no existe información sobre el efecto del estrés térmico en las enzimas claves y/o en la expresión de genes que codifican para dichas enzimas implicadas en la síntesis de tocoferoles en soja.

Es importante destacar que en los estudios antes mencionados el rango promedio de temperaturas explorado por el cultivo no superó los 29 °C, cuya temperatura es menor a la que

induce el estrés térmico. Por otro lado, la literatura acerca del impacto de breves períodos de muy altas temperaturas sobre el contenido de proteína, aceite, y la variación en la proporción de ácidos grasos insaturados y tocoferoles es escasa y poco concluyente. Por ello, resulta fundamental distinguir el tipo de estrés térmico que se aborda respecto a la duración (episodio vs continuo) lo cual es relevante dado que, en muchos casos a campo, se produce alternancia de temperaturas, con episodios de estrés térmico variables en frecuencia e intensidad.

2.2 Efectos del estrés por déficit hídrico

La disponibilidad hídrica durante el llenado es también un factor ambiental importante que explica las variaciones en el peso de grano y su composición química. El déficit hídrico, denominado de aquí en adelante como estrés hídrico (EH), durante el llenado de grano modifica el peso de grano (PG), reduciendo generalmente la duración del llenado de grano (DLLG) más que la tasa de crecimiento del grano (TCG) (Egli y Bruening, 2004; Meckel et al., 1984; Rotundo y Westgate, 2010). El acortamiento de la duración del llenado de grano se ha asociado principalmente con una senescencia foliar acelerada (Breedan y Egli, 2003; De Souza et al., 1997; Egli y Bruening, 2004). Además, las reducciones de la tasa de crecimiento del grano se han asociado con un estrés temprano durante el desarrollo del grano o con un estrés severo más tarde durante el periodo de llenado, lo que podría estar relacionado con menos asimilados disponibles para el desarrollo del grano (Blum, 1998), o con un deterioro de los granos para la acumulación y síntesis de reservas (Artlip et al., 1995) o ambos. En cuanto a la calidad del grano, Carrera et al. (2009) observaron que bajo condiciones de déficit hídrico, la concentración de aceite y proteína aumentaron linealmente ante incrementos de la temperatura media durante el llenado de grano, pero mientras la concentración de aceite aumentó ante mayor déficit hídrico la concentración de proteína disminuyó. Esto concuerda con Boydak et al. (2002), Foroud et al. (1993), Specht et al. (2001), quienes concluyeron que plantas sometidas a estrés hídrico producen granos con mayor concentración de aceite y menor concentración de proteína. Sin embargo, Dornbos y Mullen (1992) y posteriormente, Rotundo y Westgate, (2010) informaron que la concentración de proteína aumentó y la concentración de aceite disminuyó bajo estrés hídrico. Una posible explicación de las diferencias entre los trabajos es que, dado que la acumulación de proteína comienza antes que la deposición de aceite, por lo que un inicio temprano del estrés tendría un mayor impacto en la proteína que uno tardío. Rose (1988), concluyó que un estrés hídrico temprano en el período de llenado de grano redujo la concentración de proteína e incrementó la concentración de aceite. Por lo tanto, las aparentes discrepancias entre los estudios previamente mencionados podrían deberse a diferencias en el momento del inicio del estrés hídrico y en su intensidad. Respecto a los ácidos grasos insaturados, Carrera et al. (2008) hallaron que el estrés hídrico durante el llenado de grano acentuó el efecto conocido de la temperatura sobre los ácidos oleico, linoleico y linolénico, disminuyendo linoleico y linolénico y aumentando oleico. Dornbos

y Mullen (1992) y Boydak et al. (2002) también encontraron que el oleico aumentaba y linoleico disminuía bajo condiciones de estrés hídrico durante el llenado de grano. En cuanto a los tocoferoles, en un estudio de invernadero, Britz y Kremer (2002) informaron que el estrés hídrico aumentó un 42% la concentración de alfa tocoferol, mientras que delta tocoferol y gamma tocoferol disminuyeron un 20 y 5%, respectivamente, y la concentración de total tocoferol se mantuvo relativamente constante en comparación con las plantas regadas. Estos mismos autores, corroboraron sus resultados en ensayos a campo, donde observaron que la relación alfa tocoferol/total tocoferol fue mayor para varios genotipos, en años con precipitaciones entre 37-44% menores que el promedio histórico de 30 años, siendo el aumento hasta 3,5 veces superior a los valores observados en ambientes con precipitaciones cercanas al promedio (Britz et al., 2008). En Brasil, en localidades con la misma media de temperatura pero precipitaciones contrastantes (aproximadamente 4 puntos de variación), alfa tocoferol aumentó considerablemente (245%), mientras que delta tocoferol, gamma tocoferol y total tocoferol se redujeron cuando las precipitaciones disminuyeron (Carrão-Panizzi y Erhan, 2007), coincidentemente con lo observado por Britz y Kremer (2002) y Britz et al. (2008).

En situaciones de campo se conoce que, bajo estrés hídrico, la temperatura del canopeo (TC) se eleva frecuentemente al reducirse la transpiración, superando a menudo la temperatura ambiental (Rose, 1988). En cultivos con estrés hídrico se puede esperar entonces que temperaturas altas generen mayor estrés si son acompañadas por sequía inductora del cierre estomático (Molino, 2011; Stone y Savin, 1999). En este sentido, el estrés hídrico podría ejercer un efecto indirecto mediante un aumento de la temperatura que afectaría enzimas implicadas en el metabolismo de síntesis de aceite, proteína, ácidos grasos insaturados y tocoferoles, y/o expresión de genes que codifican estas enzimas (Carrera y Dardanelli, 2017; Carrera y Seguin, 2016; Nakagawa et al., 2018). El estudio del efecto del estrés hídrico sobre las enzimas claves y/o la expresión de genes que codifican para dichas enzimas implicadas en la síntesis de los tocoferoles aportaría información relevante permitiendo avanzar sobre los mecanismos implicados en la calidad del aceite de soja en condiciones de campo.

2.3 Efectos combinados de estrés térmico e hídrico

La interacción del estrés térmico e hídrico (ET×EH) resulta importante para explicar las variaciones en el peso de grano y su calidad química en Argentina, donde el cultivo se realiza mayoritariamente bajo seco y las diferencias medias entre la precipitación y la evapotranspiración potencial del cultivo, presentan un rango amplio (-250 a -125 mm), sugiriendo frecuentes situaciones de limitaciones hídricas (Mercau et al., 2007) que además, en muchos casos están combinados con episodios de estrés térmico variables en frecuencia e intensidad. En algunos casos, se observó que la interacción de estreses produjo efectos aditivos sobre el peso de grano en trigo (*Triticum spp.*) (Prasad et al., 2011) y lenteja (*Lens culinaris* Medik.) (Sehgal et al., 2017).

Sin embargo, Ergo et al. (2018) no observaron efectos aditivos de la interacción del estrés térmico e hídrico sobre el peso de grano en soja, indicando un posible efecto dominante del estrés hídrico relacionado a su mayor duración de aplicación (todo el período de llenado) vs el estrés térmico (15 días del período de llenado). Respecto a la calidad del grano, Dornbos y Mullen (1992) encontraron que plantas expuestas a condiciones de estrés hídrico severo combinado con temperaturas de 35 °C durante todo el llenado de grano la concentración de proteína aumentó 4%, mientras que la concentración de aceite disminuyó 3%. Un estudio posterior realizado a campo, Carrera et al. (2015) encontró que bajo la interacción de estrés térmico e hídrico los contenidos de aceite y proteína disminuyeron; sin embargo, la magnitud de respuesta fue mayor en el contenido de aceite, provocando un aumento significativo en la concentración de proteína. Esto podría deberse a que bajo la interacción del estrés térmico e hídrico se modifican las relaciones hídricas en la planta y se limita el intercambio gaseoso modificando procesos fotosintéticos (Ergo et al., 2018, 2021); impactando más sobre la síntesis de aceite respecto a la de proteína, dada la mayor dependencia del aceite de la producción actual de fotoasimilados (Carrera et al., 2015). Recientemente, se encontró que en ambientes bajo estrés hídrico y altas temperaturas causaron incrementos lineales en concentración de ácido oleico y disminuciones lineales de ácidos linoleico y linolénico, exhibiendo ambos factores climáticos efectos aditivos sobre los ácidos grasos insaturados (Carrera y Dardanelli, 2017). En coincidencia, Carrera et al. (2015) observaron que el aceite de granos de parcelas bajo la interacción de estrés térmico e hídrico presentó más concentración de ácido oleico y menos concentración de ácidos linoleico y linolénico comparado con el aceite de los granos bajo condiciones irrigadas. Estos autores reportaron una significativa asociación negativa entre el ácido oleico y el rendimiento cuántico del fotosistema II, mientras que el ácido linolénico estuvo positivamente asociado al rendimiento cuántico del fotosistema II y a las clorofilas totales en hojas. Por ello, concluyeron que el efecto de la fotosíntesis (estimada a través de rendimiento cuántico del fotosistema II y clorofilas totales) sobre la composición de ácidos grasos podría estar modulada por cambios en el suministro de asimilados a los granos. En parcelas irrigadas mayores tasas fotosintéticas podrían ser alcanzadas respecto a las parcelas bajo la interacción de estrés térmico e hídrico, aumentando el suministro de carbono hacia los granos necesario para la biosíntesis de aceite (Willms et al., 1999); esta fuente extra de carbono podría desviarse preferentemente hacia el ácido linoleico y linolénico, los que en conjunto representan el 64% del aceite de soja (Wilson, 2004). En cuanto a los tocoferoles, según nuestro conocimiento aún no hay estudios que aborden cómo la interacción del estrés térmico e hídrico actúa sobre su composición, tampoco sobre las enzimas claves y/o la expresión de genes que codifican para dichas enzimas implicadas en la síntesis de los mismos.

2.4 Mecanismos fisiológicos implicados en la respuesta al estrés térmico e hídrico

Condiciones de estrés durante el llenado de grano pueden modificar la partición de asimilados desde la fuente (hojas) hacia los destinos (granos), ya sea de manera directa, alterando la habilidad del grano de acumular materia seca (efecto sobre el destino) o quizás la más predominante, indirectamente por cambios en la habilidad de la planta para suministrar asimilados (efecto sobre la fuente) (Jenner et al., 1991). Las dos fuentes de asimilados son la fotosíntesis actual y la removilización de asimilados almacenados. En este sentido, el estrés térmico combinado con estrés hídrico impactaría en el peso de grano y su calidad, principalmente debido a su efecto en la oferta de asimilados (fotosíntesis actual), la partición y la removilización de nutrientes (Martre, 2003; Prasad et al., 2008; Triboi y Triboi-Blondel, 2002). Teniendo en cuenta que el grano posee en promedio un 40% de proteína (Wilson, 2004), la disponibilidad de nitrógeno (N) para su síntesis resulta clave. Estudios fisiológicos utilizando genotipos de soja de diferentes contenidos proteicos han mostrado que la relación negativa entre la concentración de proteína y rendimiento, ampliamente documentada (Wilcox y Shibbes, 2001), está relacionada con una mayor velocidad de distribución de nitrógeno y removilización en genotipos de alta proteína, así como una menor duración del llenado de grano (Leffel et al., 1992; Salado-Navarro et al., 1985), acelerando el proceso de senescencia foliar (Sinclair y Wit, 1975; Triboi y Triboi-Blondel, 2002). Posteriormente, Egli y Bruening (2007) mostraron que el mejoramiento para alta proteína no afectó la removilización del nitrógeno y/o duración del llenado de grano, concluyendo que estos genotipos podrían lograr elevados rendimientos a través de la asimilación “extra” de N durante el llenado de grano (Cafaro et al., 2019; Ortez et al., 2019; Saenz et al., 2022). Tanto el déficit hídrico (De Souza et al., 1997) como el estrés térmico (Siddique et al., 1999) durante el llenado de grano acelerarían la removilización de reservas a los granos a causa de la caída de la actividad fotosintética de hojas y la aceleración de la senescencia foliar. Las reservas que se removilizan desde hojas, tallos y pecíolos durante el llenado de grano aportan carbono y nitrógeno al grano en crecimiento, pero en distintas proporciones dado que, mientras el 50-100% del nitrógeno final del grano proviene de la redistribución a partir de las hojas (Zeiger et al., 1982), sólo el 23% del carbono final del grano es redistribuido desde las reservas, siendo el 77% restante transferido directamente de la fotosíntesis de las hojas (Yamagata et al., 1987). El estrés hídrico reduce la fotosíntesis del canopeo indirectamente por reducción del área foliar y directamente por reducción de la conductancia estomática (Egli, 1998). Carrera et al. (2021) asociaron reducciones en fotosíntesis bajo condiciones de estrés térmico e hídrico a modificaciones estructurales y ultraestructurales a nivel de cloroplastos de las hojas. El cierre estomático es la primera y principal respuesta de casi todas las plantas para evitar pérdida de agua por transpiración lo que provoca un aumento de la temperatura foliar. Esta situación conduce a un daño oxidativo (Ergo et al., 2018) con disminución de la asimilación de carbono (Yokota et al., 2002), clave para la síntesis de los distintos componentes del grano. Esto reviste importancia, dado que como se mencionó

anteriormente una reducción de la oferta de asimilados tendría un impacto mayor sobre la síntesis de aceite y de carbohidratos que sobre la síntesis de proteína debido a la mayor dependencia de los primeros de la fotosíntesis actual (Westgate y Grant, 1989). En concordancia con esto, Rotundo y Westgate (2009) concluyeron que la síntesis de proteína es la menos afectada frente a un estrés térmico o hídrico debido a la removilización del nitrógeno que conduce a un incremento neto de la concentración de proteína en los granos. Sin embargo, no se conoce aún cómo la exposición del llenado de grano a la combinación de estrés térmico e hídrico afecta este aparente rol *buffer* de las reservas en relación con la dinámica de acumulación de proteína y aceite, y composición final de ácidos grasos insaturados y tocoferoles en el grano de soja. Se puede observar de lo anteriormente expuesto que, a pesar de ser abundante la bibliografía referida a la relación calidad química y estrés térmico por altas temperaturas o estrés hídrico durante el llenado de grano, algunos resultados son contradictorios y/o poco concluyentes, probablemente debido a diferencias en el momento del inicio del estrés y/o en la intensidad lograda a través de los diferentes trabajos. Asimismo, la mayoría de estos estudios han abordado o concluido acerca de la composición final del grano, o sus componentes en términos de concentración, mientras que la dinámica de acumulación y la composición del grano en términos de contenido bajo condiciones de estrés hídrico y/o térmico ha sido menos explorada.

3. Efecto de la posición de la vaina en el canopeo sobre el peso y la calidad de grano

La posición que ocupan las vainas en el canopeo (tallo principal y ramas) ejerce un efecto significativo sobre el peso de grano (Egli, 2017; Moro Rosso et al., 2021; Smiciklas et al., 1992). Las vainas de las posiciones más bajas, que se desarrollan primero, tendrían más tiempo para crecer y, por lo tanto, alcanzarían un mayor peso de grano que las de las posiciones superiores (Egli et al., 1978; Egli y Wardlaw, 1980). Otros estudios propusieron que este mayor peso de grano en las vainas de posiciones inferiores se alcanza a través de una mayor tasa de crecimiento del grano (Munier-Jolain et al., 2010). Por otro lado, algunos estudios han indicado diferencias en la composición química del grano de soja en función de su ubicación dentro del tallo principal. Collins y Cartter (1956) y Escalante y Wilcox (1993a,b) mostraron que los granos pertenecientes al cuarto superior de la planta lograron mayor concentración de proteína y menor concentración de aceite que el cuarto inferior de la misma. Dicha respuesta podría explicarse a través de una mayor duración de acumulación de la proteína comparado con el aceite en el estrato superior (ES) vs el inferior (EI), dado que es conocido que la proteína comienza a acumularse antes que el aceite en los granos (Poeta et al., 2014; Sale y Campbell, 1980). Bellaloui y Gillen (2010) encontraron que granos de nudos superiores exhibieron mayor concentración de proteína y ácido oleico comparado con los de nudos inferiores. En este trabajo atribuyeron las diferencias a una mayor actividad de la enzima nitrato reductasa y concentración de clorofila sumado a mejores condiciones lumínicas en el estrato superior comparado con el estrato inferior.

Resulta importante destacar que los estudios antes mencionados dividen a la planta en los distintos estratos a cosecha para luego analizar la composición química de los granos. La identificación de vainas de la misma edad fenológica a través de la técnica del pintado (Egli, 1998; Molino, 2011) resulta clave para poder comparar granos que crecen en distintas porciones del tallo principal, despejando así el efecto que introduce el factor etario como por ejemplo los distintos ambientes explorados durante el crecimiento de esos granos. Si bien el peso de grano y la composición química final de los mismos ha sido ampliamente documentada, los mecanismos que subyacen a nivel de estrato, dentro del canopeo, requieren de una mayor atención dado la complejidad de factores que intervienen (edad fenológica, condiciones microambientales, relaciones fuente destino, entre otros). La comprensión de estos mecanismos podría ser útil a los fines del mejoramiento genético, por lo que se podría seleccionar aquellos granos con características diferenciales de calidad. En este sentido, la identificación de vainas coetáneas constituye una herramienta clave para el seguimiento de granos con el mismo grado de desarrollo y que exploran condiciones meteorológicas similares durante su crecimiento. Esto a su vez permitiría estudiar la dinámica de acumulación de biomasa y componentes químicos del grano en función de la posición que ocupan las vainas dentro del canopeo.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Analizar el impacto de episodios de altas temperaturas y estrés hídrico sobre la dinámica de acumulación de los componentes industriales y la calidad final del grano de soja, la biosíntesis de tocoferoles, removilización aparente de reservas y el funcionamiento de la fuente fotosintética.

4.2 Objetivos específicos

En genotipos de soja con concentración diferencial de proteína en grano sometidos a breves intervalos de altas temperaturas, déficit hídrico y su interacción durante el llenado se propone:

1. Evaluar el impacto de los mencionados estreses sobre el peso de grano, la tasa de crecimiento y la duración del llenado de grano en vainas de la misma edad fenológica en diferentes posiciones del canopeo.

2. Cuantificar los cambios en concentración y contenido de proteína, aceite y fracción residual en función de la tasa y duración del período de acumulación de los componentes mencionados.

3. Determinar la composición del aceite correspondiente a vainas de la misma edad fenológica en diferentes posiciones del canopeo, evaluando el perfil de ácidos grasos y tocoferoles del grano.

4. Establecer asociaciones entre la composición química del grano y variables ecofisiológicas relacionadas a la fuente de carbono y nitrógeno.

5. Determinar si los cambios en las proporciones de los diferentes tocoferoles están correlacionados con la expresión de cinco genes claves implicados en la biosíntesis de los mismos.

5. Hipótesis

En genotipos de soja con concentración diferencial de proteína en grano, expuestos a breves períodos de altas temperaturas y déficit hídrico durante el llenado:

1.1. El peso de grano correspondiente a vainas de la misma edad fenológica de diferentes posiciones del canopeo se ve afectado negativamente por cada estrés individual, provocando la interacción de estreses efectos aditivos.

1.2. El impacto negativo en el peso de grano se debe principalmente a un acortamiento de la duración del llenado más que una reducción de la tasa de crecimiento del grano.

2.1. La interacción de ambos estreses provoca una reducción mayor del contenido de proteína, aceite, fracción residual, tocoferoles y una menor insaturación del aceite del grano respecto a los estreses individuales.

2.2. Tanto la tasa como la duración de la acumulación de proteína, aceite y fracción residual se modifican, variando de forma independiente la respuesta de cada uno de los mencionados componentes químicos, favoreciendo la deposición de proteína en detrimento de los demás compuestos.

3. La composición química del grano de soja se modifica de forma diferencial según la posición que ocupan las vainas coetáneas dentro del canopeo, mejorando los parámetros de calidad en el estrato superior.

4. El estrés térmico e hídrico afectan la fuente fotosintética y la removilización de reservas, disminuyendo el suministro de asimilados hacia los granos, lo que provoca mayores reducciones en los componentes químicos que dependen de la fotosíntesis actual. Esta respuesta es exacerbada en el genotipo de soja de alta concentración de proteína en grano.

5. Los genes que codifican para las enzimas 2-metil-6-fitol-1,4-benzoquinona y gamma tocoferol metil transferasas se sobreexpresan en condiciones de estrés, promoviendo el incremento de la concentración alfa tocoferol y la disminución de gamma y delta tocoferol, impactando negativamente en la concentración de los tocoferoles totales.

6. Estructura de tesis

Para comprobar las hipótesis de esta tesis se llevaron a cabo dos experimentos a campo durante dos años consecutivos, generando cuatro tratamientos: control, estrés térmico, estrés hídrico y la combinación de estrés térmico con estrés hídrico durante el llenado de grano. Se utilizaron dos genotipos de soja no transgénica con concentración diferencial de proteína en grano. En el capítulo 2 se presenta el diseño experimental, la metodología empleada para establecer las condiciones de estrés y la descripción detallada de dichas condiciones. Aquí, se analiza de manera profunda la respuesta del peso de grano, uno de los componentes numéricos del rendimiento, a los tratamientos de estrés. El peso de grano se aborda a nivel de parcela general pero también en vainas de la misma edad fenológica en diferentes posiciones del canopeo. Para entender las

respuestas del peso de grano, se evaluaron los dos componentes que lo definen, tasa de crecimiento y duración del llenado de grano (objetivo específico 1). Además, como variables explicativas se incluyeron el contenido máximo de agua del grano, el peso de la vaina y se presentan evidencias de la regulación del peso de grano a través de la relación fuente destino. El capítulo 3 está enfocado al análisis de la respuesta de los componentes químicos, que hacen a la calidad final del grano de soja, a los tratamientos de estrés (objetivos específicos 2 y 3). Los componentes químicos involucran proteína, aceite y fracción residual, así como los que hacen a la calidad final del aceite i.e. ácidos grasos insaturados y tocoferoles. Para explicar y entender procesos fisiológicos involucrados en la determinación de la composición final del grano, el contenido de proteína, aceite y fracción residual ha sido descripto en función de los dos componentes que lo definen, i.e., tasa y duración de la acumulación de cada uno de estos componentes, considerando la posición que ocupan las vainas dentro del canopeo. Adicionalmente, se establecen relaciones entre los componentes industriales de la soja y se presentan evidencias de la regulación de la acumulación de proteína, aceite y fracción residual a través de la relación fuente destino. En el capítulo 4 se muestran las asociaciones entre la calidad química del grano y variables ecofisiológicas relacionadas a la fuente de carbono y nitrógeno. Se analizan las relaciones entre el peso de grano, la composición química e incorporando los factores ambientales, además del funcionamiento del cultivo como fuente de asimilados (objetivo específico 4). En base a los resultados del tercer objetivo específico y para abordar la hipótesis 5, se determinó el genotipo que presentó la mayor concentración de alfa tocoferol en el grano a través de los tratamientos y experimentos. Este genotipo (i.e., Alim5.09) se empleó en un ensayo bajo condiciones controladas, sometién dose a los mencionados tratamientos de estrés, es decir, ET, EH y ET×EH, manteniendo en todo momento un grupo de control. La metodología empleada junto con los resultados relacionados a la biosíntesis de tocoferoles durante el llenado de grano y su regulación a nivel de expresión génica de enzimas claves para su síntesis (objetivo específico 5) se muestran en el capítulo 5. Por último, en el capítulo 6 se presenta una evaluación completa de todas las variables consideradas a través de los capítulos 2, 3, 4 y 5, permitiendo realizar el contraste de las hipótesis formuladas. También se muestra un esquema general del estudio, las conclusiones obtenidas y posibles direcciones para investigaciones futuras.

CAPÍTULO 2

DINÁMICA DE CRECIMIENTO DEL GRANO DE SOJA EXPUESTO A ESTRÉS TÉRMICO E HÍDRICO DURANTE EL PERIODO DE LLENADO

1. Introducción

La soja se considera uno de los principales cultivos de grano oleaginoso a nivel mundial. Abastece más del 59% de la demanda global de proteína y aceite vegetal (USDA, 2023). Argentina aporta alrededor del 7% de la producción mundial de soja, siendo el cuarto exportador del grano y el primero en sus productos derivados, aceite y harina. El estrés térmico e hídrico son los principales factores abióticos que limitan el crecimiento y, además la productividad de los cultivos (Dias et al., 2018; Sehgal et al., 2018; Sita et al., 2018). El Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, 2018) proyectó un aumento de 1,5 °C hacia el final de este siglo trayendo eventos climáticos extremos. Por lo tanto, se esperan aumentos tanto en la frecuencia como en la severidad de los episodios de estrés térmico por altas temperaturas y eventos de estrés hídrico, debido a las mayores variaciones interanuales de las precipitaciones en Argentina (Penalba y Rivera, 2016; Rusticucci et al., 2016). Aunque en situaciones de campo ambos estreses ocurren juntos con mucha frecuencia, sus efectos interactivos están menos estudiados (Rizhsky et al., 2004).

El peso de grano de soja depende de la tasa de crecimiento del grano y de la duración del llenado de grano (Egli y Bruening, 2004). Ambos parámetros se ven afectados por la interacción entre el genotipo y el ambiente (Egli, 1998). El crecimiento del grano aumenta de forma constante alrededor de 10 días después de la polinización de la flor, cuando la vaina ha alcanzado su máxima longitud (Carlson y Lersten, 1987). Se ha indicado que los acontecimientos anteriores a este crecimiento activo del grano pueden modificar el peso de grano final (Ochatt, 2015). Durante la primera fase del desarrollo del grano, llamada fase *lag*, se produce la división celular y se establece el peso de grano potencial. En la segunda fase, la fase lineal, se produce la expansión celular. Durante esta última, el tamaño de la vaina podría ejercer restricciones físicas sobre el crecimiento de los granos, como muestran los trabajos de Egli et al. (1987) y Miceli et al. (1995). Paralelamente a la acumulación de materia seca en el grano, el contenido de agua también se incrementa desde las primeras fases, hasta más allá de la mitad del periodo del llenado de grano, habiendo una fuerte asociación positiva entre contenido máximo de agua y el peso de grano potencial (Egli, 1998).

El estrés térmico y/o hídrico durante el llenado de grano puede reducir el peso del mismo, comprometiendo así su rendimiento (Dias y Lidon, 2009; Ergo et al., 2018; Rotundo y Westgate, 2010), dependiendo de la duración y la severidad de cada uno de ellos. Las reducciones del peso de grano suelen estar relacionadas con variaciones en la tasa de crecimiento del grano y/o en la

duración del llenado de grano. El estrés hídrico durante el llenado modifica el peso de grano final, reduciendo generalmente la duración del llenado de grano más que la tasa de crecimiento del mismo (Egli y Bruening, 2004; Meckel et al., 1984; Rotundo y Westgate, 2010). Por otro lado, las altas temperaturas (32-40 °C) que inducen el estrés térmico afectan procesos reproductivos (Prasad et al., 2017), y cuando se producen durante todo el llenado de grano, reducen el peso del mismo principalmente debido a los cambios en la duración del llenado de grano (Egli y Wardlaw, 1980; Gibson y Mullen, 1996; Thomas et al., 2010). Este acortamiento de la duración del llenado de grano ha sido asociado principalmente con una senescencia foliar acelerada (Brevedan y Egli, 2003; Chakrabarti et al., 2013; De Souza et al., 1997; Egli y Bruening, 2004; Guiamét et al., 2002). Además, la reducción de la tasa de crecimiento del grano ha sido relacionada con un estrés temprano en la fase *lag* del desarrollo del grano o con un estrés severo más tarde durante el periodo de llenado, lo que podría estar relacionado a una menor disponibilidad de asimilados para el desarrollo del grano (Blum, 1998), a un deterioro de la capacidad de síntesis y acumulación de reservas del grano (Artlip et al., 1995) o ambos. En condiciones de campo, donde las temperaturas varían diurnamente, los episodios de estrés térmico son más probables que regímenes de temperatura fija como los que ocurren en experimentos realizados en cámaras de crecimiento y fitotrones, a menudo impuestos durante el período completo de interés (Egli et al., 2005). Si bien existen antecedentes sobre la variación del peso de grano ante estrés térmico y/o hídrico de manera individual, el efecto interactivo de ambos estreses sobre la tasa de crecimiento y la duración del llenado de grano que definen el peso de grano no ha sido explorado directamente en condiciones de campo.

La posición de las vainas en el canopeo ejerce un profundo efecto sobre el peso de grano (Egli, 2017; Nico, 2016; Smiciklas et al., 1992). Las vainas de las posiciones más bajas, que se desarrollan primero, tendrían más tiempo para crecer y, por tanto, alcanzarían un mayor peso de grano que las de las posiciones superiores (Egli et al., 1978; Egli y Wardlaw, 1980). Algunos estudios propusieron que este mayor peso de grano de las vainas de posiciones inferiores se alcanza a través de una mayor tasa de crecimiento del grano (Munier-Jolain et al., 2010). Aunque estos trabajos, junto con otros (Gbikpi y Crookston, 1981; Keigley y Mullen, 1986), observaron un mayor peso de grano en las vainas de las posiciones más bajas del canopeo, también se ha documentado lo contrario (Adam et al., 1989; Hampton et al., 1996). Parece evidente que los efectos posicionales en las variaciones del peso de grano siguen sin estar claros. La identificación de vainas de la misma edad fenológica surge como un enfoque clave, para establecer con precisión comparaciones entre granos que crecen en diferentes porciones del tallo principal.

2. Objetivo

En genotipos de soja con concentración diferencial de proteína en grano sometidos a breves intervalos de altas temperaturas, déficit hídrico y su interacción durante el llenado se propone:

evaluar el impacto de los mencionados estreses sobre el peso de grano, la tasa de crecimiento y la duración del llenado de grano en vainas de la misma edad fenológica en diferentes posiciones del canopeo.

3. Materiales y métodos

Se realizaron dos experimentos (Exp) a campo en la estación experimental Manfredi (31°49'S, 63°46'O Córdoba, Argentina) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en durante las campañas agrícolas 2015-2016 (Exp I) y 2016-2017 (Exp II). El Exp I se sembró el 20 de octubre, mientras que la Exp II se sembró el 12 de octubre. El suelo es limoso del tipo Haplustol Étnico (Taxonomía de Suelos del USDA). Se seleccionaron dos genotipos de soja no transgénica con concentración diferencial de proteína y peso de grano, Alim5.09 de alto peso de grano y 42% de proteína y Jocketta de bajo peso de grano y 37% de proteína. Ambos de similar tiempo de maduración y similar potencial de rendimiento (Soldini, 2010, 2017, comunicación personal). Estos genotipos corresponden al grupo de madurez V y presentan un hábito de crecimiento indeterminado. Fueron provistos por el banco de germoplasma del INTA Marcos Juárez. Las parcelas experimentales consistieron en cuatro surcos, separados a 0,52 m y de 4 m de largo. La densidad de siembra fue de 25 plantas m². Las malezas, enfermedades e insectos se controlaron siguiendo las prácticas de manejo recomendadas por la Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Soja (RECSO) del INTA. Los análisis de suelo indicaron que el sitio experimental no presentaba limitaciones físicas ni químicas para el desarrollo del cultivo. Los datos meteorológicos durante el tiempo que comprendieron los dos experimentos, es decir, las temperaturas máximas y mínimas diarias del aire y las precipitaciones, fueron proporcionados por la Estación Meteorológica del INTA Manfredi. La temperatura media del aire se calculó como el promedio entre la temperatura máxima y la mínima del aire. A partir de estos datos, se estimaron nuevas variables para el período de llenado de grano que se detallan en la Tabla 2.1.

El diseño experimental consistió en parcelas sub-subdivididas con dos repeticiones, donde la parcela principal correspondió al nivel hídrico, la subparcela a los genotipos y la sub-subparcela al nivel térmico. Los tratamientos se establecieron en el estadio fenológico R5.5 (Fehr y Caviness, 1977), es decir, cuando los granos alcanzaron 6 mm de longitud en una vaina en uno de los cuatro nudos superiores. Los niveles hídricos fueron: (1) parcelas sin estrés hídrico (control), conseguido mediante un sistema de riego por goteo, y (2) parcelas bajo EH con alrededor del 25% del contenido de agua disponible en el suelo (CAU) desde R5.5 hasta el inicio de la madurez fisiológica (R7, la primera vaina del tallo principal ha madurado hasta alcanzar un color de vaina marrón). El objetivo del riego complementario era mantener el cultivo cerca de la capacidad de campo durante las etapas de generación de área foliar, que son las más críticas para la captación de la radiación solar. En las parcelas bajo estrés hídrico se instalaron *rainout shelters* móviles (uno por repetición) para evitar ingresos extras de agua por precipitaciones. Las dimensiones de cada uno de ellos fueron 8 m de

largo, 5 m de ancho, 6 m de altura y se cubrieron con polietileno transparente de 100 μm (Figura 2.1). El CAU fue monitoreado en cada parcela a través de tres mediciones gravimétricas hasta los 2 m de profundidad en los siguientes estadios fenológicos: i) R5.5, ii) grano completo (R6), cuando las vainas contienen un grano verde que completó la cavidad de la vaina en uno de los cuatro nudos superiores del tallo principal, y iii) madurez fisiológica completa (R8), cuando el 95% de las vainas han alcanzado su color de madurez (Figura 2.2). Se tomaron muestras de suelo cada 0,2 m de profundidad y se llevaron al laboratorio donde se secaron en una estufa a 105 °C durante 48 h hasta alcanzar un peso constante. El CAU del suelo en cada parcela se calculó según Ritchie (1981) como el cociente entre el agua disponible para el cultivo en un momento determinado y la cantidad máxima de agua disponible que puede almacenar el suelo en perfiles de 0,2 m de profundidad desde 0 hasta los 2 m y luego se promediaron (Ecuación 2.1).

$$CAU = \frac{(\Theta_a - \Theta_{li})}{(\Theta_{ls} - \Theta_{li})} \times 100 \quad (2.1)$$

Donde Θ_a es el contenido volumétrico de agua actual (en un momento determinado), Θ_{li} es el límite inferior obtenido de las determinaciones de laboratorio a -1,5 MPa de potencial hídrico (punto de marchitez permanente) y Θ_{ls} es el límite superior de drenado en el campo (capacidad de campo).

Los niveles térmicos consistieron en: (1) parcelas a temperatura ambiente (control), y (2) parcelas bajo episodios de ET, donde la temperatura del aire superaba los 32 °C durante 6 h alrededor del mediodía (de 10:00 a 16:00 h) durante 15 días consecutivos a partir de R5.5. La duración del ET siguió el enfoque propuesto por (Kaur et al., 2021; Neiff et al., 2016; Rattalino Edeira y Otegui, 2012). Los aumentos de temperatura se lograron mediante carpas metálicas de 4 m de largo, 2 m de ancho y 2 m de altura cubiertas con polietileno de 100 μm , que se cerraban durante el calentamiento de forma no hermética, dejando una apertura de 0,6 m en la parte inferior para permitir el intercambio de gases (Ergo et al., 2018; Kim et al., 2021; Molino, 2011) (Figura 2.1). Para registrar la temperatura del aire y la humedad relativa (HR), se utilizaron sensores digitales (DS1923L-F5, resolución: 0,5 °C, registradores de datos I-buttons, Digi-Key Co. Ltd., EE.UU.) que se colocaron en el interior de cada carpa en el surco central de la parcela y en la parte superior de del canopeo (a 1,2 m del nivel del suelo). Las mediciones se registraron cada media hora durante la imposición de los tratamientos. Se calculó un índice de estrés térmico (IET, °C h⁻¹) como la suma de las temperaturas medias que superaban los 32 °C durante las horas efectivas de estrés basándose en Ergo et al. (2018) y Neiff et al. (2016). Este índice cuantifica la intensidad del estrés. Se tomó una temperatura umbral de 32 °C porque ha sido documentado que por encima de esta temperatura disminuye la tasa de crecimiento y la duración del llenado de grano (Egli y Wardlaw, 1980; Gibson y Mullen, 1996).

El déficit de presión de vapor ambiental (DPV, kPa) durante las horas de calentamiento se calculó a partir de la diferencia entre la presión de vapor de saturación y la real según la metodología propuesta por Allen et al. (1998). Se midió la intensidad lumínica ($n=3$) por encima del canopeo dentro y fuera de los *shelters* con un ceptómetro de 1 m de longitud (Cavadevices, Buenos Aires, Argentina) entre las 11:00 y las 14:00 h en días despejados. Durante el período de los tratamientos de ET se midió el CO_2 ($n=3$) con una caja *buffer* colocada a 0,4, 0,8 y 1,2 m de altura sobre el suelo mediante un sensor portátil de intercambio de gases de flujo abierto LI-6400 (LI-COR).

De la combinación de los dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y los dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico) resultaron los tratamientos: control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH (Figura 2.1).



Figura 2.1. Imágenes de las condiciones experimentales para los genotipos de soja Alim5.09 y Jocketta bajo diferentes tratamientos que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico). Estos tratamientos fueron: control (riego a temperatura ambiente) (A), estrés térmico (riego bajo ET) (B), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) (C) y ET×EH (D).

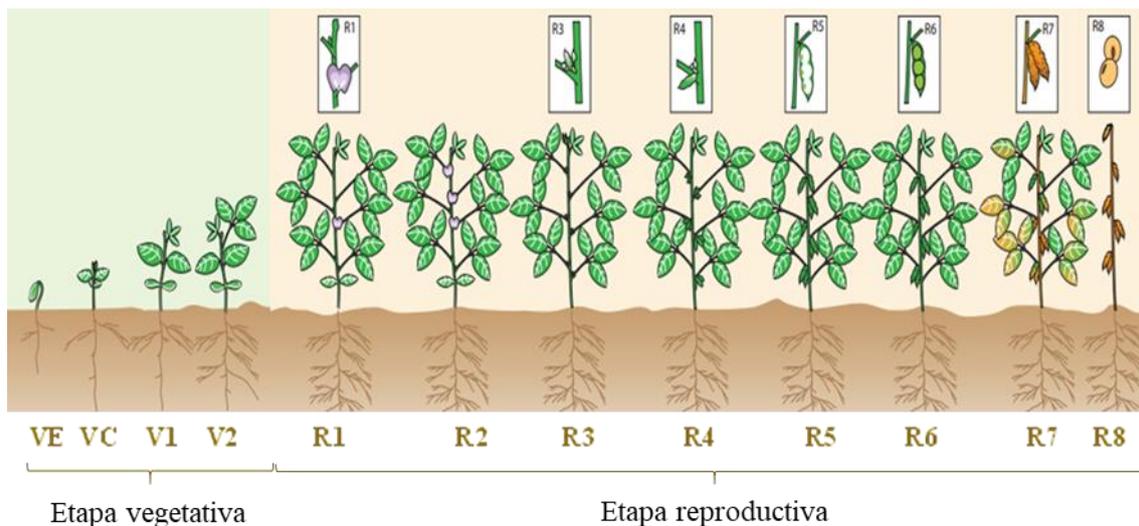


Figura 2.2. Ciclo ontogénico del cultivo de soja según la escala de Fehr y Caviness (1977). VE: emergencia; VC: cotiledón; V1: primera hoja trifoliada; V2: segunda hoja trifoliada; R1: inicio de floración; R2: fin de floración; R3: inicio de formación de vainas; R4: vaina completa, R5: inicio de formación de granos; R6: grano completo; R7: inicio de maduración fisiológica; R8: maduración completa. Ilustración modificada a partir de Ciampitti (2017).

3.1 Mediciones en las plantas

Índice de área foliar y relación fuente destino

En el estadio fenológico R5, se realizaron muestreos de plantas en un área de 0,73 m² en los surcos centrales para determinar el índice de área foliar (IAF) y la relación fuente destino. El área foliar verde se midió con un medidor de área foliar LI-COR 3100 (LI-COR, Lincoln, NE). Además, el IAF se estimó como la relación entre el área de hoja verde y el área del suelo (m² de hoja m⁻² de suelo). La relación fuente destino (cm² hoja grano⁻¹) se estimó como el cociente entre el IAF (m² de hoja m⁻² de suelo) al inicio del llenado del grano (R5) y el número de granos (granos m⁻²) a madurez (Rotundo y Westgate, 2010).

Pintado de vainas y dinámica de crecimiento del grano

La planta de soja posee vainas de diferentes edades a través del tallo principal, lo que no necesariamente coincide con el estadio fenológico de la planta, principalmente porque éste se determina en los cuatro nudos superiores del mencionado tallo según la escala propuesta por Fehr y Caviness (1977). Así, cuando las plantas de los surcos centrales de cada genotipo se encontraban aproximadamente en el estadio fenológico R5, seleccionamos y marcamos (utilizando marcadores de tinta permanente) en una pequeña área las vainas de la misma edad fenológica (R5) en el tallo principal. Se determinaron dos posiciones dentro del canopeo: (i) el estrato superior (ES), y (ii) el estrato inferior (EI). El estrato superior correspondió a los nudos apicales 5-6, mientras que el estrato inferior correspondió a los nudos 5-6 por debajo del estrato superior. Se dejaron dos nudos de separación entre ambas posiciones del canopeo, en los cuales no se pintaron vainas. Para evaluar

la dinámica del crecimiento de los granos, se tomaron muestras semanales de seis vainas pintadas en cada posición de tres plantas por parcela hasta la madurez fisiológica. Durante el muestreo las vainas se colocaban en tubos etiquetados y se conservaban en una conservadora para evitar la deshidratación. Cada planta muestreada fue dejada en el campo con el fin de conservar el canopeo de la parcela, pero se las etiquetó para evitar un doble muestreo sobre la misma planta. En el laboratorio, en una atmósfera húmeda, se contaron los granos de cada vaina, se pesaron y se secaron tanto vainas como granos en un horno a 65 °C durante 72 horas. La relación entre el peso seco de la vaina y el peso de grano se determinó en seis vainas de cada posición cuando los granos alcanzaron el contenido máximo de agua. El contenido máximo de agua (CMA, mg grano⁻¹) se determinó como la máxima diferencia entre el peso fresco y el seco. El peso fresco máximo del grano se consideró cuando los granos acumulaban el 80% de su peso seco final (Borrás et al., 2004).

Se ajustaron modelos para la dinámica del peso seco de los granos para cada estrato del canopeo (PG_E) y tratamiento. Los modelos ajustados de regresión bilineal con *plateau* para la relación entre el peso de grano de cada estrato y su correspondiente tasa de crecimiento y duración del llenado de grano se señalan en las ecuaciones 2.2 y 2.3, respectivamente.

Peso seco de grano (mg grano⁻¹) = a + bx para x < c (función lineal) (2.2)

Peso seco de grano (mg grano⁻¹) = a + bc para x > c (función *plateau*) (2.3)

Donde “x” es el día después de la fase fenológica de R5.5 (d), “a” la intersección con Y (mg grano⁻¹), “b” la tasa de crecimiento del grano durante el período de llenado efectivo del grano (mg grano⁻¹d⁻¹), y “c” es el punto de intersección entre la fase lineal de crecimiento del grano y el peso seco máximo del grano definido por la función *plateau*. La duración del llenado de grano se calculó entonces como la diferencia en días entre “c” y la intersección “x” de la función lineal para el crecimiento del grano (Rotundo y Westgate, 2010). El modelo bilineal se ajustó a la base de datos del peso de grano utilizando el programa Table Curve 3D (Scientific, 1991).

Rendimiento y sus componentes

A madurez fisiológica completa (R8), se cosecharon manualmente las plantas comprendidas en un área entre 1,6 a 4,0 m², cortándolas a ras del suelo en los dos surcos centrales de cada parcela. Se trillaron las vainas y se contaron y pesaron los granos. El rendimiento (g m⁻²), el número de granos por unidad de superficie (NG, granos m⁻²) y el peso de grano individual a nivel de parcela (PG_P, mg grano⁻¹) fueron expresados en base seca. Para cada parcela se tomaron tres muestras de granos de volumen constante, las cuales fueron contadas, pesadas y se les midió la humedad utilizando un humedímetro para granos modelo Tesma A-79 (Tesma SAIC, Argentina). Con estos valores se calculó el peso de grano individual. Luego, el número de granos se determinó dividiendo el rendimiento por el peso de grano individual.

3.2 Análisis estadístico

En cada experimento, los datos se analizaron estadísticamente utilizando el modelo de ANAVA según el diseño experimental. Cada efecto principal o interacción se analizó en base a la correspondiente fuente de error del diseño en parcelas sub subdivididas. Las medias se compararon con una prueba de diferencia mínima significativa (DMS) utilizando un nivel de probabilidad del 0,05 (Di Rienzo et al., 2014). Las relaciones entre el peso de grano por estrato y sus componentes tasa del crecimiento del grano y duración del llenado de grano, así como entre el peso de grano por estrato y el contenido máximo de agua se analizaron mediante un análisis de regresión lineal. El estadístico Cp de Mallows, los residuos parciales y coeficiente de determinación (R^2) fueron analizados para identificar los modelos de ajuste más apropiados.

4. Resultados

4.1 Caracterización ambiental y de los estreses

La campaña 2015/16 (Exp I) fue más húmeda y ligeramente más cálida que la campaña 2016/17 (Exp II), e incluso que la media histórica considerando los últimos 30 años (Figura 2.3). Durante los meses de imposición de los tratamientos (enero y febrero en ambos experimentos) correspondientes al periodo de llenado de granos, el promedio de la temperatura media del aire superó a la histórica en 2,3 °C en el Exp I, y en 1,2 °C en el Exp II. En ese periodo, las precipitaciones fueron de 367 mm en el Exp I y de 242 mm en el Exp II, superando en 149 mm y 24 mm, respectivamente, los promedios históricos (Figura 2.3). Además, las precipitaciones en Exp I fueron 3 veces mayores en febrero que las históricas para dicho mes (99 mm).

La temperatura media del aire durante los tratamientos de ET superó en 11 °C y 9 °C a la del control, durante los Exp I y II respectivamente, mientras que la temperatura media máxima del aire superó a la del control en 14 °C durante el Exp I, y en 11 °C en el Exp II (Tabla 2.1). El IET estimado en las parcelas bajo ET mostró una diferencia de ~ 16 °C h⁻¹ en comparación con el control en el Exp I, mientras que en el Exp II fue de 10 °C h⁻¹, lo que indica que la intensidad del ET fue relativamente mayor en el Exp I respecto al Exp II. En ambos experimentos, la humedad relativa dentro de las carpas fue ligeramente mayor (12% en promedio) en las parcelas regadas bajo ET comparado con las parcelas sin riego, posiblemente debido al calentamiento artificial que producen las carpas. El DPV se incrementó 1 kPa en las parcelas de ET, mientras que en las parcelas de ET×EH el incremento fue casi el doble en comparación con el control para ambos experimentos. Estos incrementos en las parcelas de ET, independientemente del nivel hídrico, podrían estar asociados a un aumento de la temperatura media, ya que las diferencias fueron de 10 °C respecto a las parcelas control (Tabla 2.1).

La radiación solar se vio ligeramente reducida por las carpas de polietileno semicerradas en los tratamientos de ET, siendo la magnitud de reducción con una magnitud igual al 14,7% en el

Exp I y al 13,0% en el Exp II respecto a los valores ambientales ($1230,3 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $1349,6 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para los Exp I y II, respectivamente). La concentración de CO_2 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) en la parte superior del canopeo de las plantas (1,2 m por encima del suelo) fue de $379,6 \pm 4,5$ para el control, $373,7 \pm 6,6$ para el ET, y $375,7 \pm 14,3$ para el ET×EH. En la parte media del canopeo (0,8 m por encima del suelo) la concentración de CO_2 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) fue de $378,9 \pm 2,6$ para el control, $369,6 \pm 10,7$ para el ET, y $373,8 \pm 6,5$ para el ET×EH. En la parte inferior del canopeo (0,4 m por encima del suelo) la concentración de CO_2 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) fue de $382,5 \pm 3,5$ para el control, $373,6 \pm 11,4$ para el ET, y $382,9 \pm 5,6$ para el ET×EH. Como se desprende de los valores registrados, las diferencias en las concentraciones de CO_2 entre las parcelas control y las parcelas bajo ET (es decir, dentro de las carpas) durante el periodo de calentamiento fueron inferiores al 4%.

El contenido de agua útil en el suelo (expresado como porcentaje de la capacidad de campo) al inicio del llenado efectivo del grano (R5.5) en el Exp I fue en promedio del 73,1% en las parcelas regadas (control y ET) y del 24,6% en las parcelas con estrés hídrico (EH y ET×EH) (Tabla 2.2). En el estadio fenológico R6, el CAU en las parcelas regadas fue en promedio del 44,9%, mientras que en las parcelas con estrés hídrico fue de alrededor del 4,4%, indicando un estrés terminal severo. Hacia el final del ciclo del cultivo (en el estadio fenológico R8) todas las parcelas mostraron incrementos en el CAU del suelo en comparación con R6 (Tabla 2.2), principalmente relacionados con las abundantes precipitaciones durante febrero, que superaron el 173% de la media histórica para ese mes en ese año (Figura 2.3).

En el Exp II, en el estadio fenológico R5.5, el CAU del suelo en promedio fue del 61,3% en las parcelas regadas y del 40,6% en las parcelas con estrés hídrico (Tabla 2.2). En el estadio fenológico R6, el CAU del suelo en las parcelas regadas fue en promedio del 49,3%, mientras que en las parcelas con estrés hídrico siguió disminuyendo hasta el 9,7%. Finalmente, en plena madurez (estadio fenológico R8), las parcelas regadas presentaron un CAU medio en el suelo del 33,5%, mientras que las de estrés hídrico lo hicieron con una media del 25% (Tabla 2.2).

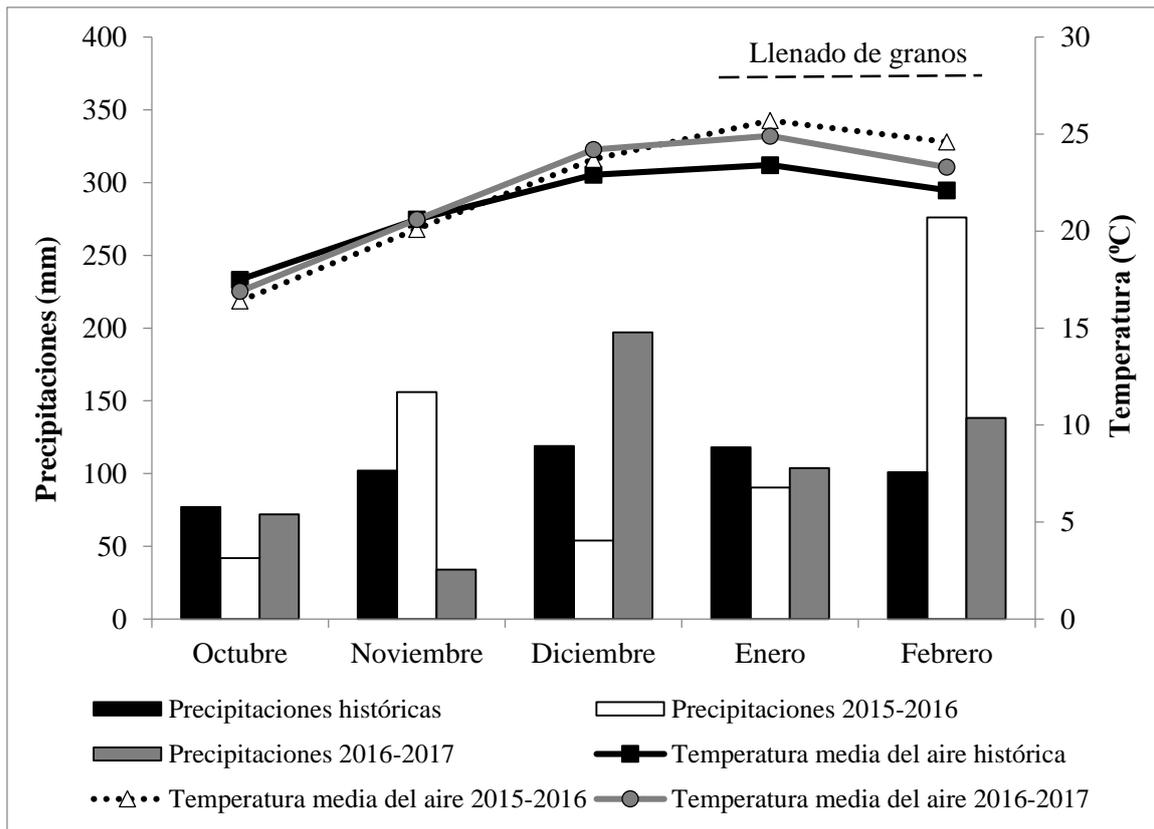


Figura 2.3. Precipitaciones mensuales acumuladas y temperatura media del aire en Manfredi durante la campaña 2015-2016 (Experimento I) y 2016-2017 (Experimento II) y la media histórica (últimos 30 años) de las precipitaciones mensuales acumuladas y la temperatura media del aire.

Tabla 2.1. Promedio de la temperatura (T) máxima (max), media y mínima (min) del aire, humedad relativa del aire, índice de estrés térmico (IET), déficit de presión de vapor (DPV) durante los tratamientos de estrés térmico (ET) de 6 horas de duración. Las mediciones en los experimentos I y II se registraron cada media hora en el centro de cada carpa en la parte superior del canopeo (1,2 m desde el nivel del suelo) durante los tratamientos.

Nivel hídrico	Nivel térmico	Max	Media	Min	Humedad Relativa	$\Sigma T \geq 32^{\circ}\text{C}$	Σ horas $\geq 32^{\circ}\text{C}$	IET*	DPV§
		T (°C)			(%)	(°C)	(h)	(°C h ⁻¹)	(kPa)
Experimento I									
Riego	TAmb	30,8	28,4	24,7	43,8	48	47,1	2,8	2,2
	ET	45,2	40,4	34,5	61,4	1319,6	62,3	21,1	3,4
EH ^φ	ET	44,1	39,7	34,6	44,4	1397,8	77,3	18,1	4,4
Experimento II									
Riego	TAmb	30,5	28,3	25,5	53,4	38,5	15,3	2,5	1,7
	ET	41,5	37,4	32,4	62,4	1034,3	78,3	13,2	2,7
EH ^φ	ET	42,1	37,7	32,7	56,8	1057,4	81,4	13	3,1

* IET: relación entre la suma de temperaturas ($\Sigma T \geq 32 \text{ }^\circ\text{C}$) y la fracción de tiempo ($\Sigma \text{ horas} \geq 32 \text{ }^\circ\text{C}$) por encima de $32 \text{ }^\circ\text{C}$. Se consideró $32 \text{ }^\circ\text{C}$ como la temperatura por encima de la cual disminuye la tasa de crecimiento y la duración del llenado de grano (Egli y Wardlaw, 1980; Gibson y Mullen, 1996).

§ DPV: calculado durante los episodios de estrés térmico según la metodología de Allen et al. (1998).

φ EH: estrés hídrico

Tabla 2.2. Media y desvío estándar del contenido de agua disponible en el suelo (expresado como porcentaje de la capacidad de campo) medido gravimétricamente hasta 2 m de profundidad en diferentes estadios reproductivos: inicio lineal del llenado de granos (R5.5), grano lleno (R6), madurez fisiológica completa (R8) considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [TAmb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento (Exp) I y II.

	Nivel hídrico	Nivel térmico	Contenido de agua disponible en el suelo (%)					
			R5.5		R6		R8	
Experimento I	Riego	TAmb	73,1	± 4,9	38,5	± 3,6	70,6	± 4,4
		ET	73,1	± 4,9	51,2	± 3,3	69,5	± 10,9
	EH	TAmb	24,4	± 19,2	2,9	± 8,5	46,7	± 22,2
		ET	24,9	± 14	5,5	± 11,6	52	± 14,2
Experimento II	Riego	TAmb	61,3	± 9,9	49,3	± 15,4	34,7	± 12,3
		ET	61,3	± 9,9	49,3	± 15,5	32,3	± 13,7
	EH	TAmb	43,6	± 11	10,9	± 3,9	25,8	± 24,1
		ET	37,6	± 13,9	8,4	± 5,1	24,4	± 26,7

4.2 Rendimiento y componentes: número de granos y peso de grano

En el Exp I, el rendimiento se vio significativamente afectado ($p < 0,05$) por la triple interacción entre el nivel hídrico (NH), genotipo (G) y nivel térmico (NT) (Tabla 2.3). En Alim5.09 el rendimiento disminuyó 11%, 36% y 56% en los tratamientos de ET, EH y ET×EH, respectivamente, mientras que en Jocketta las disminuciones correspondientes fueron 26%, 57% y 47% respecto a los controles. Llamativamente, la interacción de ambos estreses (ET×EH) produjo efectos aditivos en Alim5.09 pero no en Jocketta. Por otro lado, bajo condiciones de control, Jocketta mostró un mayor rendimiento que Alim5.09, principalmente debido a su mayor NG ($4770 \text{ granos m}^{-2}$ vs $3002 \text{ granos m}^{-2}$, respectivamente) (Tabla 2.3). Las reducciones observadas en el rendimiento bajo los diferentes tratamientos se debieron a disminuciones en ambos componentes numéricos, NG y PG. El NG disminuyó significativamente ($p < 0,05$) debido al efecto de las interacciones NH×G y NH×NT (Tabla 2.3). A través de los genotipos, el NG se redujo en promedio un 18% en las parcelas regadas bajo ET, mientras que disminuyó un 37% en las parcelas bajo déficit hídrico en comparación con el control. A través de los tratamientos, Jocketta siempre mostró un mayor NG en comparación con Alim5.09 (Tabla 2.3). El peso de

grano individual a nivel de parcela se vio diferencialmente afectado en ambos genotipos ($p < 0,01$) según el NH y el NT (Tabla 2.3). Alim5.09 mostró una disminución significativa por efecto de los tratamientos de EH y ET×EH (10% y 39%, respectivamente) en comparación con el control, mientras que el ET no modificó la variable. En Jocketta, el PG_P se redujo significativamente sólo en las parcelas sin riego en un 21% respecto a su control.

En el Exp II, el EH (independientemente del ET) fue el único tratamiento que causó diferencias significativas ($p < 0,0006$) en el rendimiento respecto al control (Tabla 2.3). En estas parcelas el rendimiento disminuyó un 31% respecto a las parcelas regadas, debido a la disminución tanto del NG como del PG_P . El NG mostró diferencias entre genotipos y se vio afectado por el nivel hídrico ($p < 0,001$, Tabla 2.3). El NG disminuyó un 21% en las parcelas bajo déficit hídrico respecto a las parcelas regadas, y Alim5.09 presentó un 21% menos de granos en comparación con Jocketta en todos los tratamientos. En cuanto al PG_P , este componente del rendimiento se vio significativamente afectado por el nivel hídrico ($p < 0,01$), presentando las parcelas bajo déficit hídrico una reducción del 13% respecto a las parcelas regadas (Tabla 2.3). Se observaron diferencias entre genotipos ($p < 0,001$), presentando Jocketta un PG_P 22% menor que Alim5.09 en todos los tratamientos. Cabe destacar, cómo los genotipos estudiados difieren en sus estrategias para definir el rendimiento; mientras Jocketta siempre exhibió mayor NG respecto a Alim5.09, este último presentó mayor PG_P en comparación con Jocketta (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Rendimiento, número de granos y peso de grano al momento de la cosecha considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [TAmb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento (Exp) I y II.

Nivel hídrico	Genotipo	Nivel térmico	Rendimiento		Número de granos		Peso de grano	
			(g m ⁻²)		(granos m ⁻²)		(mg grano ⁻¹)	
			Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II
Riego	Alim5.09	TAmb	640	753	3002	3372	213,2	223,0
		ET	568	745	2653	3320	214,0	224,2
	Jocketta	TAmb	764	651	4770	3732	160,5	173,5
		ET	567	682	3598	3926	157,9	173,3
EH	Alim5.09	TAmb	408	444	2127	2284	192,1	194,1
		ET	281	449	2129	2364	130,2	190,0
	Jocketta	TAmb	331	525	2624	3539	126,9	147,9
		ET	403	492	2638	3131	150,6	157,7
DMS (doble interacción)			80	130	510	423	14,9	19,4
DMS (triple interacción)			112	183	721	598	21,1	27,5
Nivel de significancia								
Nivel hídrico (NH)			***	***	***	***	***	**
Genotipo (G)			ns	ns	***	***	***	***
Nivel térmico (NT)			*	ns	*	ns	ns	ns
NH×G			ns	ns	*	ns	**	ns
NH×NT			ns	ns	*	ns	ns	ns
G×NT			ns	ns	ns	ns	**	ns
NH×G×NT			*	ns	ns	ns	**	ns

ns, no significativo

***, **, *Significativo al $p \leq 0,001$, $0,01$ y $0,05$, respectivamente.

4.3 Relación fuente destino

En ambos experimentos, la fuente estimada a través del IAF en el estadio fenológico R5 no fue mostró diferencias entre genotipos ($p > 0,05$, Tabla 2.4). En el Exp I, el efecto del nivel hídrico sobre el IAF fue significativo ($p < 0,001$), reduciéndose esta variable en un ~42% en las parcelas bajo déficit hídrico respecto al control regado. En el Exp II, la interacción NH×G fue significativa ($p < 0,05$), disminuyendo el IAF un 34% en Alim5.09 y un 3% en Jocketta en las parcelas bajo déficit hídrico respecto a las parcelas regadas (Tabla 2.4). Esta reducción también se observó en los destinos cuantificados como NG, en el que se observaron diferencias debidas al nivel hídrico ($p < 0,001$) y al genotipo ($p < 0,001$) como se muestra en la Tabla 2.3. A través de los experimentos, la relación fuente destino mostró diferencias ($p < 0,05$) entre genotipos (Tabla 2.4). Alim5.09 exhibió mayor relación fuente destino comparado con Jocketta (lo que implica mayor cantidad de asimilados por grano), en promedio 66% para el control, 29% para ET, 43% para EH y 20% para

ET×EH (Tabla 2.4). Adicionalmente, la relación fuente destino se asoció significativa y positivamente con el peso de grano ($R^2=0,56$; $p < 0,0001$), indicando que a mayor relación fuente destino mayor peso de grano podría ser alcanzado (Figura 2.4).

Tabla 2.4. Índice de área foliar y relación fuente destino considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [TAmb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento (Exp) I y II.

Nivel hídrico	Genotipo	Nivel térmico	Índice de área foliar		Fuente destino ^b	
			(m ² m ⁻²)		(cm ² hoja grano ⁻¹)	
			Exp I	Exp II	Exp I	Exp II
Riego	Alim5.09	TAmb	6,5	7,1	22,0	21,6
		ET	5,8	6,5	21,9	19,5
	Jocketta	TAmb	6,0	5,0	12,7	13,5
		ET	5,7	6,4	15,9	16,2
EH	Alim5.09	TAmb	3,8	4,5	18,2	19,5
		ET	3,2	4,5	17,4	19,0
	Jocketta	TAmb	3,0	5,2	11,5	15,0
		ET	3,1	5,8	11,1	18,5
DMS (doble interacción)			1,7	1,1	7,0	5,0
DMS (triple interacción)			2,4	1,5	10,0	7,0
Nivel de significancia						
Nivel hídrico (NH)			***	**	ns	ns
Genotipo (G)			ns	ns	*	*
Nivel térmico (NT)			ns	ns	ns	ns
NH×G			ns	*	ns	ns
NH×NT			ns	ns	ns	ns
G×NT			ns	ns	ns	ns
NH×G×NT			ns	ns	ns	ns

^bLa relación fuente destino se calculó como el cociente entre el índice de área foliar al inicio del llenado de granos (R5) y el número de granos (granos m⁻²) a madurez, según Rotundo y Westgate (2010).

ns, no significativo

***, **, *Significativo al $p \leq 0,001$, 0,01 y 0,05, respectivamente.

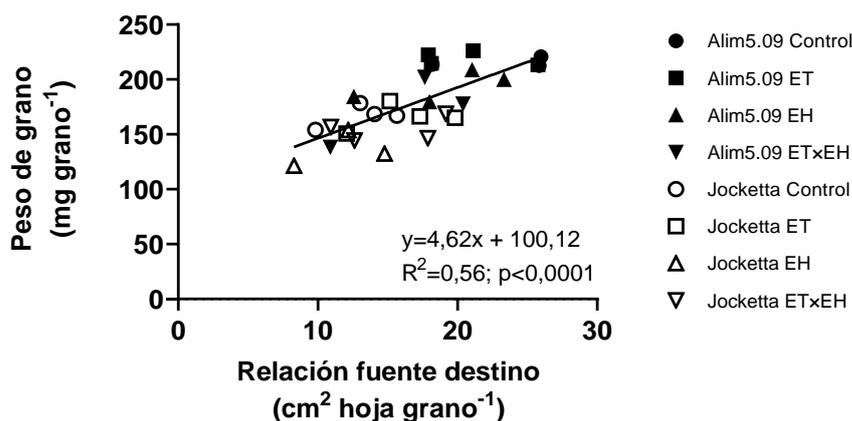


Figura 2.4. Relación entre el peso de grano y la relación fuente destino a través de genotipos (Alim5.09 y Jocketta) y de tratamientos, que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH en el experimento I y II.

4.4 Peso individual y dinámica de crecimiento de granos en vainas con la misma edad fenológica

En el Exp I, las variaciones en el peso de grano por estrato se explicaron principalmente por la TCG ($R^2=0,62$; $p < 0,0001$) en comparación con la DLLG ($R^2=0,25$; $p = 0,0056$) (Figura 2.5A y B). Del mismo modo, en el Exp II las variaciones en PG_E se explicaron principalmente por variaciones en la TCG ($R^2=0,75$; $p < 0,0001$), y no por la DLLG (Figura 2.5C y D). Se observó una tendencia de mayor TCG en Alim5.09 en comparación con Jocketta ($5,1 \text{ mg grano}^{-1} \text{ d}^{-1}$ vs $4,4 \text{ mg grano}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente; Figura 2.5A y C). A través de los experimentos, el PG_E se asoció significativa y positivamente con la relación fuente destino ($R^2=0,35$; $p = 0,0003$), aunque con un ajuste menor al observado en el peso de grano a nivel de parcela (Figura 2.4). La TCG fue explicada débilmente por la relación fuente destino ($R^2=0,15$; $p = 0,0187$) mientras que la DLLG no se asoció significativamente con la relación fuente destino ($R^2=0,10$; $p = 0,0559$).

Centrándonos en los tratamientos, el PG_E fue significativamente afectado por el NH y el NT, aunque la magnitud del efecto varió entre los genotipos ($p < 0,01$) en el Exp I (Tabla 2.5). En las parcelas regadas (independientemente de los tratamientos de ET), el PG_E de Jocketta fue un 21% menor que el PG_E de Alim5.09; e independientemente del genotipo, las parcelas con estrés hídrico mostraron un 23% menos de PG_E que las parcelas regadas. Bajo ET el PG_E de Alim5.09 disminuyó un 13% respecto al control, mientras que en Jocketta se detectaron disminuciones, las cuales no fueron significativas. La estratificación también fue un factor significativo que afectó al PG_E ($p < 0,05$, Tabla 2.5), siendo el PG_E del estrato inferior menor al del estrato superior en Alim5.09 y Jocketta (14 y 10%, respectivamente). Los cambios en el PG_E se debieron a las

variaciones de la TCG y la DLLG. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) en la TCG debido a los efectos del nivel hídrico y del estrato (Tabla 2.5). La TCG disminuyó en promedio un 18% en las parcelas con estrés hídrico en comparación con las parcelas regadas, y los granos en el estrato superior mostraron un 16% más de TCG en comparación con el estrato inferior. Además, la DLLG se vio significativamente afectada por el NH y el NT con efectos diferenciales según el genotipo ($p < 0,05$). En Alim5.09, la DLLG fue más larga en las parcelas regadas (~41 días), y la más corta en las parcelas bajo déficit hídrico (~35 días) (independientemente de los tratamientos de ET). Por otro lado, la DLLG de Jocketta no presentó diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 2.5).

En el Exp II, se observaron diferencias significativas en la DLLG ($p < 0,001$) entre genotipos y entre NH, pero a diferencia del Exp I no hubo efectos del estrato ($p > 0,05$) (Tabla 2.5). Las parcelas regadas (independientemente del ET) mostraron un mayor PG_E (14%) respecto a las parcelas bajo déficit hídrico. En todos los tratamientos, Alim5.09 mostró un mayor PG_E (21%) en comparación con Jocketta (Tabla 2.5). Los cambios en el PG_E respondieron a variaciones tanto de la TCG como de la DLLG. La TCG fue significativamente afectada por el nivel hídrico ($p < 0,01$) y el genotipo ($p < 0,001$), disminuyendo un 11% en las parcelas bajo déficit hídrico respecto a las parcelas regadas y, mostrando Alim5.09 una mayor TCG (21%) en comparación con Jocketta en todos los tratamientos (Tabla 2.5). En cuanto a la DLLG, ésta fue significativamente afectada por el NT con efectos distintos sobre los genotipos ($p < 0,01$). La DLLG más larga correspondió a Alim5.09, durando en promedio 44 días en el control, mientras que la DLLG más corta correspondió a Jocketta con una media de 37 días en las parcelas bajo déficit hídrico (Tabla 2.5).

Coincidentemente con lo observado para el PG_P , Alim5.09 siempre presentó un mayor PG_E en comparación con Jocketta en ambos experimentos. Los tratamientos de estrés hídrico, ya sea individualmente o combinados con ET, disminuyeron la TCG, afectando negativamente al PG_E (Tabla 2.5). En general, la DLLG fue más larga en Alim5.09 bajo condiciones de control durante ambos experimentos (Tabla 2.5). La DLLG sólo explicó cambios significativos en el PG_E en el Exp I, como se muestra en la Figura 2.5B, pero la proporción explicada por este atributo fue menor que la explicada por la TCG ($R^2 = 0,25$ vs $R^2 = 0,62$, respectivamente) (Figura 2.5A y B).

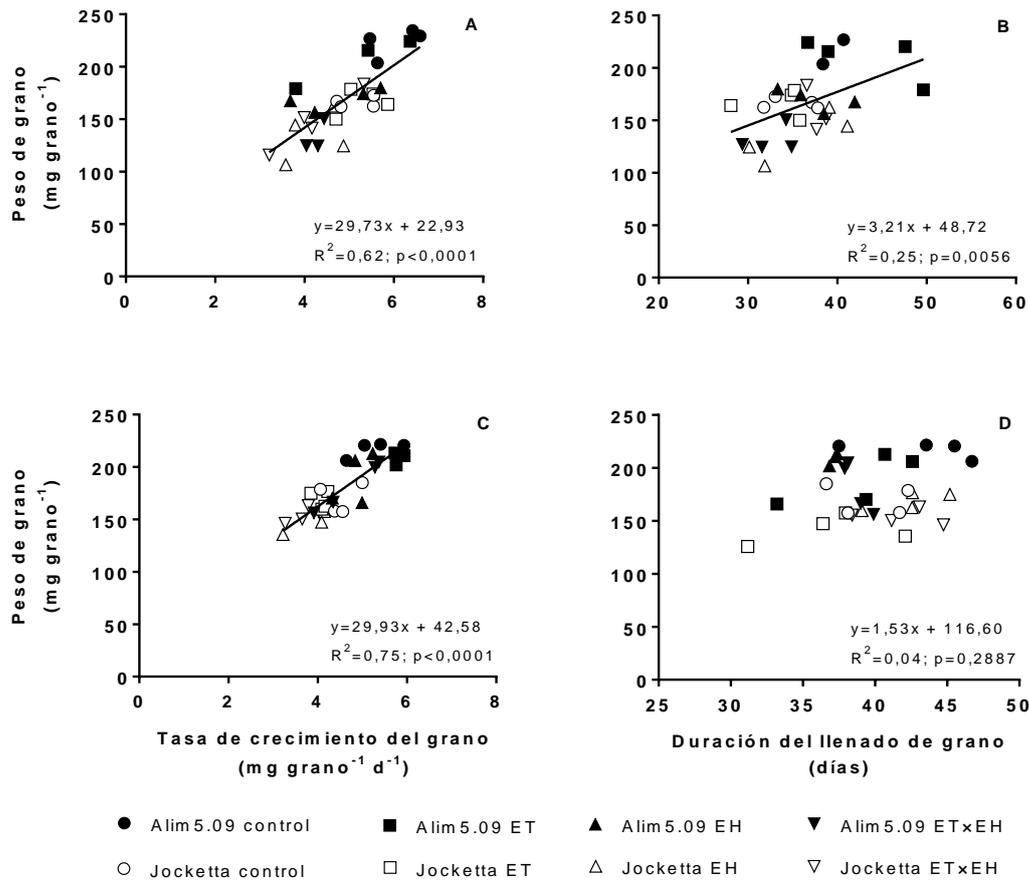


Figura 2.5. Relaciones entre el peso de grano y la tasa de crecimiento del grano (A y C) y, la duración del llenado de grano (B y D) de vainas de la misma edad fenológica correspondientes a dos estratos del canopeo (superior e inferior) a través de genotipos (Alim5.09 y Jocketta) y de tratamientos, que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH en el experimento I (A y B) y II (C y D).

Tabla 2.5. Peso individual de granos, tasa de crecimiento del grano (TCG) y duración del llenado de grano (DLLG) en vainas con la misma edad fenológica en dos estratos del canopeo (superior e inferior) considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [TAmb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento (Exp) I y II.

Nivel hídrico	Genotipo	Nivel térmico	Estrato	Peso de grano		TCG		DLLG	
				(mg grano ⁻¹)	(mg grano ⁻¹ d ⁻¹)	(d)	(d)		
				Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II
Riego	Alim5.09	TAmb	superior	231,9	221,2	6,5	5,2	38	45
			inferior	215,2	213,5	5,5	5,3	40	42
		ET	superior	222,2	207,7	5,7	5,8	42	37
			inferior	197,3	221,6	4,6	5,3	44	37
	Jocketta	TAmb	superior	167,2	171,3	5,2	4,8	35	37
			inferior	164,8	168,0	5,1	4,2	34	42
		ET	superior	171,3	169,6	5,5	4,2	32	43
			inferior	162,0	167,0	5,0	4,0	35	42
EH	Alim5.09	TAmb	superior	177,0	189,4	5,5	5,1	35	37
			inferior	161,9	188,2	4,0	4,6	40	41
		ET	superior	138,8	177,9	4,9	4,6	32	39
			inferior	124,6	185,6	4,2	4,9	33	39
	Jocketta	TAmb	superior	143,4	136,7	4,8	4,1	35	34
			inferior	125,5	147,0	3,7	3,7	36	40
		ET	superior	162,4	150,8	4,7	3,7	37	42
			inferior	133,6	157,0	3,6	3,7	40	42
DMS (doble interacción)				15,0	17,4	0,6	0,5	5	3
DMS (triple interacción)				21,2	24,6	0,8	0,7	7	5
Nivel de significancia									
Nivel hídrico (NH)				***	***	***	**	ns	ns
Genotipo (G)				***	***	ns	***	ns	ns
Nivel térmico (NT)				ns	ns	ns	ns	ns	ns
Estrato (E)				**	ns	***	ns	ns	ns
NH×G				***	ns	ns	ns	*	ns
G×NT				**	ns	ns	ns	ns	**
NH×G×NT				ns	ns	ns	ns	*	ns

ns, no significativo

***, **, *Significativos al $p \leq 0,001$, 0,01 y 0,05, respectivamente. Sólo se muestran las interacciones significativas.

4.5 Contenido hídrico de los granos

El contenido máximo de agua de los granos constituye un estimador del peso potencial de los mismos. En el Exp I, el CMA fue varió diferencialmente de acuerdo a la combinación de los factores: nivel hídrico, genotipo y nivel térmico ($p < 0,05$, Tabla 2.6). En Alim5.09, el CMA

disminuyó un 16% en las parcelas regadas bajo ET, mientras que en las parcelas con estrés hídrico (independientemente del ET) el CMA se redujo un 18% en comparación con las parcelas control. Además, el CMA en Jocketta fue un 21% menor en comparación con Alim5.09 en todos los tratamientos. En el Exp II, se detectaron efectos significativos ($p < 0,001$) del nivel hídrico y del genotipo para el CMA (Tabla 2.6), mostrando Alim5.09 un CMA 30% mayor que Jocketta en todos los tratamientos, y alcanzando las parcelas regadas un 17% más de CMA en comparación con las parcelas bajo déficit hídrico, en todos los genotipos. Notablemente, en ambos experimentos, Alim5.09 siempre alcanzó un CMA más alto que Jocketta, lo que indica un mayor potencial de PG_E para este genotipo (Tabla 2.6).

En el Exp I, el PG_E y la TCG se asociaron de manera positiva y significativa con el CMA ($R^2=0,49$; $p < 0,0001$ y $R^2=0,48$; $p < 0,0001$, respectivamente) (Figura 2.6A y B), indicando aumento de los valores de PG_E y TCG ante aumentos del CMA. El Exp II confirmó la importancia de estas relaciones, estando el PG_E y la TCG aún más fuertemente asociados al CMA que en el Exp I ($R^2=0,81$; $p < 0,001$ y $R^2=0,77$; $p < 0,001$, respectivamente; Figura 2.6C y D).

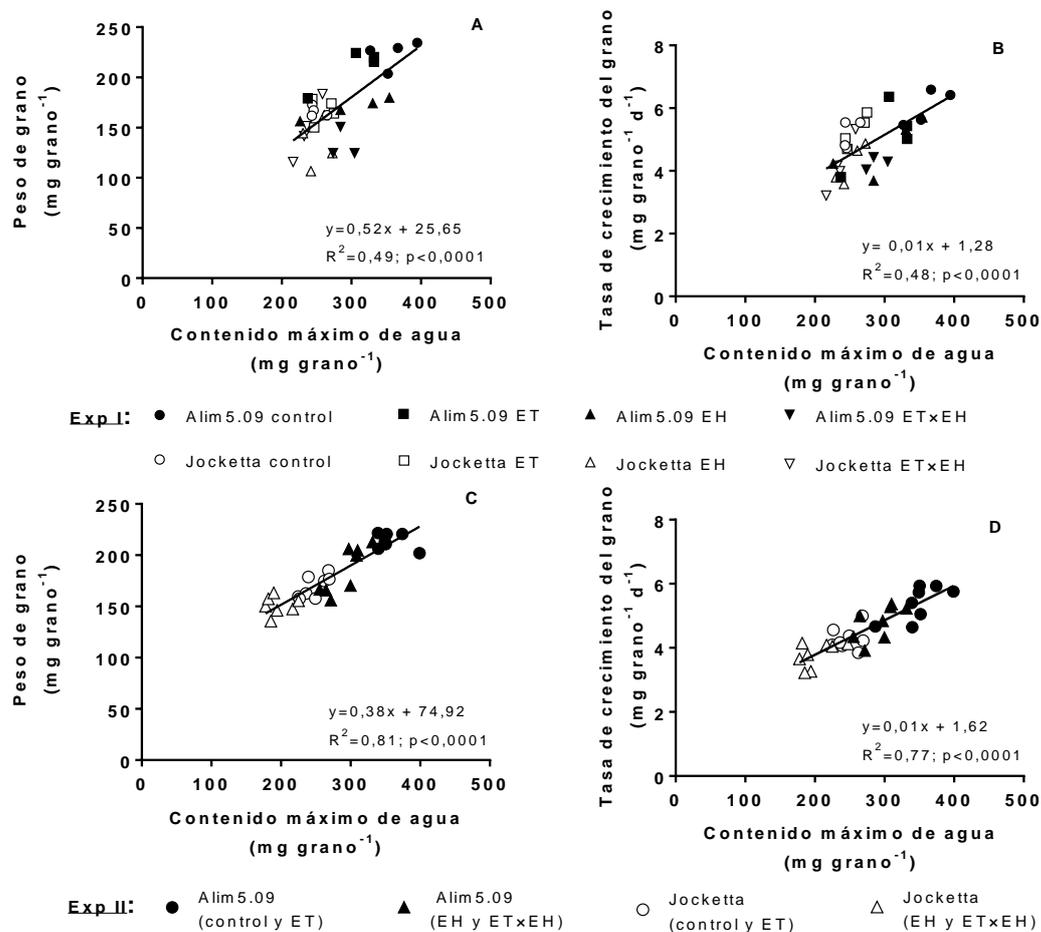


Figura 2.6. Relaciones entre el peso de grano (A y C) y la tasa de crecimiento del grano (B y D) con el contenido máximo de agua en vainas de la misma edad fenológica correspondientes a dos estratos del canopeo (superior e inferior) a través de genotipos (Alim5.09 y Jocketta) y de tratamientos, que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH en el experimento (Exp) I y II. Los datos del Exp II se agruparon por nivel hídrico: parcelas regadas (control y ET) y con estrés hídrico (EH y ET×EH), según los efectos significativos presentados en la Tabla 2.5.

Tabla 2.6. Contenido máximo de agua de granos en vainas de la misma edad fenológica de dos estratos del canopeo (superior e inferior) considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [TAmb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento (Exp) I y II.

Nivel hídrico	Genotipo	Nivel térmico	Estrato	Contenido máximo de agua (mg grano ⁻¹)	
				Exp I	Exp II
Riego	Alim5.09	TAmb	superior	380,7	345,6
			inferior	339,7	357,1
		ET	superior	319,5	374,1
			inferior	284,9	318,6
	Jocketta	TAmb	superior	243,4	247,4
			inferior	255,5	244,3
		ET	superior	259,3	252,7
			inferior	258,8	243,5
EH	Alim5.09	TAmb	superior	342,7	298,1
			inferior	255,3	298,6
		ET	superior	284,3	290,0
			inferior	289,2	282,8
	Jocketta	TAmb	superior	266,8	232,2
			inferior	236,2	183,6
		ET	superior	245,3	209,7
			inferior	226,1	183,7
DMS (triple interacción)				39,5	41,8
Nivel de significancia					
Nivel hídrico (NH)				*	***
Genotipo (G)				***	***
Nivel térmico (NT)				ns	ns
Estrato (E)				*	ns
NH×G×NT				*	ns

ns, no significativo

***, **, *Significativos al $p \leq 0,001$, 0,01 y 0,05, respectivamente. Sólo se muestran las interacciones significativas.

4.6 Tamaño de la vaina

En soja se ha documentado que el tamaño del fruto (vainas) establece restricciones físicas al crecimiento de los granos. Por lo tanto, exploramos la relación entre el PG_E y el tamaño del fruto estimado como peso de la vaina, ambos determinados cuando los granos alcanzaron el máximo contenido de agua. Se observó una asociación altamente significativa y positiva entre el PG_E y el peso de la vaina en el Exp I ($R^2=0,79$; $p < 0,001$) y en el Exp II ($R^2=0,69$; $p < 0,001$) (Figura 2.7A y B), lo que indica que los valores del PG_E aumentan con el peso de la vaina.

En el Exp I, el peso de la vaina fue significativamente afectado por el nivel hídrico y el estrato en el canopeo ($p < 0,05$), disminuyendo un 21% en las parcelas bajo déficit hídrico en comparación con las parcelas regadas (independientemente de los tratamientos bajo ET) a través de los genotipos, y siendo un 23% mayor en el estrato superior respecto al estrato inferior (Tabla 2.7). En el Exp II, se observaron efectos significativos del genotipo y del estrato sobre el peso de la vaina ($p < 0,001$), siendo esta variable un 22% mayor en Alim5.09 que en Jocketta. Además, el peso de la vaina en el estrato superior del canopeo fue un 25% mayor que el del estrato inferior (Tabla 2.7).

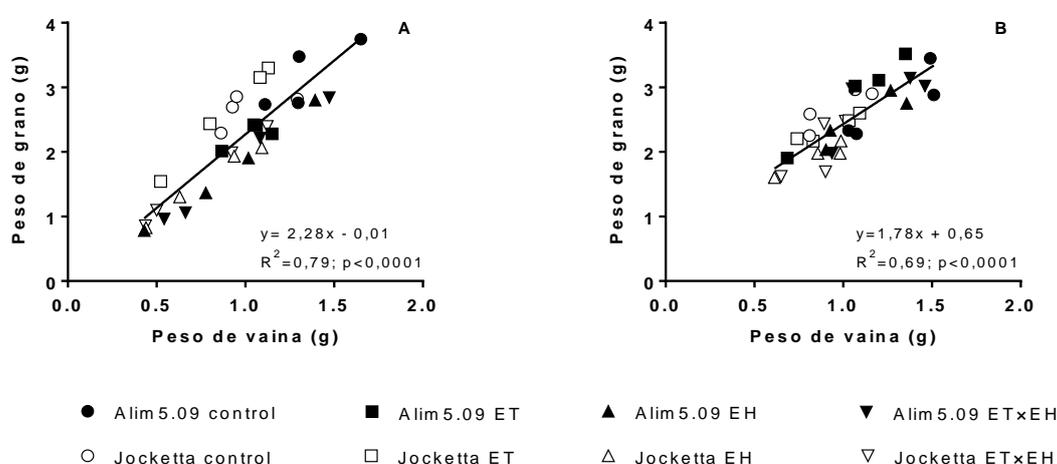


Figura 2.7. Relaciones entre el peso seco del grano y el peso seco de la vaina, ambos medidos cuando el contenido de agua del grano fue máximo. Las vainas eran de la misma edad fenológica promediando los dos estratos del canopeo a través de genotipos (Alim5.09 y Jocketta) y de tratamientos, que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH en el experimento (Exp) I y II. Los datos corresponden al peso medio de seis vainas por posición cuando los granos alcanzaron el contenido máximo de agua dentro de cada parcela.

Tabla 2.7. Peso seco de vainas de la misma edad fenológica, determinado cuando los granos alcanzaron el contenido máximo de agua correspondiente a dos estratos del canopeo (superior e inferior) considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [TAmb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento (Exp) I y II.

Nivel hídrico	Genotipo	Nivel térmico	Estrato	Peso seco de vaina (g)	
				Exp I	Exp II
Riego	Alim5.09	TAmb	superior	1,19	1,50
			inferior	0,90	1,05
		ET	superior	0,95	1,17
			inferior	0,80	0,97
	Jocketta	TAmb	superior	0,83	1,12
			inferior	0,63	0,81
		ET	superior	0,75	1,06
EH	Alim5.09	TAmb	superior	0,80	1,31
			inferior	0,61	0,92
		ET	superior	0,75	1,33
			inferior	0,62	0,99
	Jocketta	TAmb	superior	0,50	0,79
			inferior	0,73	0,99
		ET	superior	0,62	0,74
			inferior	0,80	0,96
			inferior	0,60	0,77
DMS (doble interacción)				0,30	0,14
Nivel de significancia					
Nivel hídrico (NH)				*	ns
Genotipo (G)				ns	***
Nivel térmico (NT)				ns	ns
Estrato (E)				*	***

ns, no significativo

***, **, *Significativos al $p \leq 0,001$, 0,01 y 0,05, respectivamente. Sólo se muestran las interacciones significativas.

5. Discusión

Los resultados obtenidos mostraron que las plantas de soja sometidas a estreses combinados exhibieron un efecto dominante del estrés hídrico sobre los episodios breves de ET. Estudios anteriores han mostrado efectos aditivos o sinérgicos de la interacción entre el estrés térmico y el hídrico sobre el crecimiento (biomasa) en lenteja (Sehgal et al., 2017) y el rendimiento y/o sus componentes numéricos (número y peso de grano) en soja (Dornbos y Mullen, 1991) o trigo (Prasad et al., 2011). Dado que el EH se impuso durante todo el llenado de grano, mientras que el ET se impuso durante 15 d (desde R5.5), el efecto dominante del EH estaría relacionado con las diferencias en la duración de cada estrés, en coincidencia con las observaciones de Ergo et al. (2018) utilizando una aproximación experimental similar. A su vez, este efecto dominante del EH sobre el ET explicó porque la aplicación simultánea de ambos estreses provocó respuestas similares en magnitud a las del estrés hídrico por sí solo en la relación fuente destino, el rendimiento y sus componentes numéricos, así como en el PG_E , TCG, DLLG y CMA, los que disminuyeron en ambos experimentos. Estos resultados resaltan el hecho de que el estrés térmico y el estrés hídrico combinados no siempre aumentan la magnitud del daño en las plantas comparado con un estrés individual, como mostraron Zhou et al. (2017) para tomate (*Solanum lycopersicum*) en experimentos en invernadero.

El estrés hídrico solo o combinado con ET durante el llenado de grano redujo el rendimiento en ambos experimentos debido a reducciones tanto del NG como del PG_P (Tabla 2.3). Dado que la definición del NG puede extenderse hasta R6 (Egli, 1997; Kantolic et al., 2010; Monzón et al., 2021), disminuciones en el NG son esperables. Trabajos anteriores también observaron disminuciones en el NG debido al estrés hídrico solo (Brededan y Egli, 2003; De Souza et al., 1997) o combinado con estrés térmico (Dornbos y Mullen, 1991; Ergo et al., 2018). De acuerdo con estudios previos de Andriani et al. (1991) y Jumrani y Singh (2018), las reducciones en el NG estarían asociadas principalmente a disminuciones en el número de vainas (datos no mostrados). Los fotoasimilados producidos en las hojas son esenciales para generar y mantener la biomasa vegetativa y el crecimiento de los granos. El IAF se ha relacionado positivamente con el rendimiento y sus componentes numéricos (Board y Tan, 1995; Kumudini, 2002; Lopez et al., 1997). Trabajos recientes indicaron que el IAF máximo óptimo en el estadio fenológico R5 para alcanzar el rendimiento potencial de soja ($> 5000 \text{ kg ha}^{-1}$) es de 6,0 para cultivares modernos indeterminados (Tagliapietra et al., 2018). En las parcelas regadas se alcanzaron valores similares de IAF antes mencionados (con rendimientos superiores a 6000 kg ha^{-1} en ambos genotipos); sin embargo, en las estresadas hídricamente las disminuciones del IAF fueron de alrededor del 48% (Exp I) y 37% (Exp II) en comparación con el control (Tabla 2.4). Estas reducciones podrían haber limitado el suministro de asimilados a los granos durante el período de llenado, contribuyendo así a explicar las reducciones del peso de los mismos, de acuerdo con los estudios

de Egli (2006, 2017). Más aun, las variaciones en el peso de grano fueron asociadas con la relación fuente destino (Figura 2.4), indicando que a menor relación F/D, disminuye el PG. Además, recientemente reducciones en el peso de granos en soja bajo EH y ET×EH han sido relacionados con una menor producción de asimilados debido a la disminución de los sitios de fijación de CO₂, no solo por reducciones en el grosor sino también del área de las hojas (Carrera et al., 2021), junto con daños en la maquinaria fotosintética (Ergo et al., 2018). En general, las parcelas regadas con ET mostraron un efecto no significativo sobre el rendimiento, el NG y el PG_P (Tabla 2.3). Esta ausencia general de respuestas sobre los atributos de rendimiento podría estar relacionada, al menos en parte, con procesos de recuperación que preservan la fuente fotosintética tras la exposición a breves periodos de ET (Ergo et al., 2018; Siebers et al., 2015). En un trabajo paralelo, presentamos evidencias de la capacidad de enfriamiento transpiracional (incrementos de la transpiración foliar y de la conductancia estomática, y descensos de la temperatura del canopeo) en las hojas de estas parcelas regadas con ET, lo que podría haber contribuido a evitar reducciones de la fotosíntesis (Ergo et al., 2021). Concomitantemente, el IAF mostró cambios no significativos en estas parcelas, contribuyendo a mantener la producción de fotoasimilados durante el tiempo dentro del ciclo en el que el cultivo está fuertemente limitado por la fuente (Borrás et al., 2004).

Se han aportado evidencias de variaciones en el peso de granos debido a la posición que ocupan dentro del canopeo, siendo los granos del estrato inferior más pesados que los del estrato superior (Egli et al., 1978; Keigley y Mullen, 1986). En los estudios mencionados anteriormente, la clasificación de la posición de los granos se realizó en el momento de la cosecha, y las variaciones en el peso de granos a través del tallo principal se atribuyeron a menudo a las diferencias en el momento del cuajado de las vainas, es decir, a la DLLG. Sin embargo, cuando se consideró el peso de granos de vainas de la misma edad fenológica procedentes de diferentes posiciones del tallo principal, el ES mostró un mayor PG_E que el EI (Exp I, tabla 2.5), presentando estos granos una mayor TCG en comparación con los granos del EI (Tabla 2.5). Illipronti et al. (2000) también observaron granos más pesados en los nudos superiores, aunque los autores no discutieron posibles causas asociadas a las relaciones con la TCG y/o la DLLG. Contrariamente a la hipótesis 1.2 (Capítulo 1), encontramos que los cambios en el PG_E fueron explicados principalmente por la TCG (Fig 2 A y C) en ambos experimentos, con una menor contribución de la DLLG. Estos resultados estuvieron en línea con lo observado previamente por Egli (1981) y Munier-Jolain y Ney (1998), aunque en condiciones bajo riego en macetas y a campo. La débil asociación entre PG_E y DLLG podría estar relacionada con el hecho de que las comparaciones se establecieron entre vainas de la misma edad fenológica, que maduraron al mismo tiempo.

Un breve periodo de ET en las parcelas regadas produjo cambios no significativos en la TCG y la DLLG, siendo el PG_E (Tabla 2.5) similar al del control (Tabla 2.5), reflejándose esto en un peso de grano sin cambios a nivel de toda la planta (Tabla 2.3). Egli y Wardlaw (1980) y Ferris

et al. (1999) también observaron cambios no significativos en la TCG y el peso de grano a nivel de toda la planta cuando la temperatura superaba los 30 °C en los estadios R4-R5. Nuestra hipótesis es que la disponibilidad de agua en el suelo en las parcelas regadas, junto con el aislamiento ambiental proporcionado por las vainas a los granos en crecimiento, podría ayudar a prevenir el sobrecalentamiento de los mismos. De este modo, se podría explicar la ausencia de respuestas observadas en la TCG y DLLG y, por tanto, en el PG_E en las parcelas regadas bajo ET. Existen evidencias de que bajo EH las disminuciones del peso de grano en el estrato superior fueron de mayor magnitud que en el estrato inferior, alcanzando este último mayor peso de grano en comparación con el estrato superior (Rotundo y Westgate, 2010). Sin embargo, en nuestro estudio, cuando se consideró el peso de grano de vainas de la misma edad fenológica surgieron resultados completamente opuestos, ya que el estrés hídrico por sí solo redujo el PG_E en un 20% en el ES y en un 27% en el EI, resultando en un mayor peso de grano en el ES (en Exp I donde el efecto del estrato fue significativo). De manera similar, Smiciklas et al. (1992) reportaron disminuciones en el peso de grano bajo EH y un mayor peso de grano en el ES comparado con el EI, aunque sin considerar vainas de igual edad como en nuestro estudio. Además, en las parcelas sometidas a estrés hídrico (independientemente de los tratamientos de ET), el PG_E disminuyó un 21% (Exp I) y un 13,5% (Exp II) (Tabla 2.5), reflejando las disminuciones significativas del PG a nivel de toda la planta (Tabla 2.4). En base a estos resultados, la hipótesis 1.1 (capítulo 1) fue parcialmente aceptada, dado que si bien el PG_E se redujo significativamente por el EH y el ET×EH, el efecto ET fue no significativo. Contrariamente a lo esperado, no se observaron efectos aditivos de la interacción ET×EH sobre el PG_E (Tabla 2.5).

En el presente estudio, el estrés hídrico solo o combinado con el ET redujo la TCG en los estratos analizados y en ambos experimentos (Tabla 2.5). También se han registrado reducciones de la TCG en maíz (*Zea mays*) bajo déficit hídrico (Artlip et al., 1995) y en lenteja bajo el efecto combinado de ambos estreses (Sehgal et al., 2017). La disponibilidad de asimilados podría modificar la TCG de manera directa, a través de la expansión celular y la acumulación de materia seca durante la fase lineal del crecimiento del grano (Egli, 2017; Egli et al., 1989; Munier-Jolain y Ney, 1998). La expansión celular está esencialmente motorizada por la entrada de agua en la célula y es el proceso más sensible al déficit hídrico inducido por la sequía (Blum, 1996). De hecho, se ha documentado una actividad limitada del crecimiento metabólico del grano seguida de una disminución de la TCG bajo tratamientos de EH (Egli y Bruening, 2004), limitando el volumen máximo que puede alcanzar el grano en expansión. El CMA ha mostrado ser un buen indicador de la capacidad de expansión del grano o del peso final del mismo, debido a su relación con el volumen celular (Sala et al., 2007). En el presente trabajo, observamos una disminución del CMA en las parcelas sometidas a estrés hídrico (Tabla 2.6), evidenciando limitaciones de los granos en crecimiento para expandirse e incorporar los asimilados que llegan, es decir,

limitaciones metabólicas de los granos. Esto, a su vez, puede haber reducido la TCG y, por lo tanto, el PG_E . La fuerte asociación positiva entre el PG_E y la TCG con el CMA (Figura 2.6) apoya esta hipótesis, evidenciando el efecto del estrés hídrico sobre la capacidad de crecimiento del destino. Por otro lado, existen evidencias que muestran que la expansión celular del grano durante el llenado puede verse limitada por la restricción física ejercida por las vainas, impactando negativamente en el peso final del grano (Egli et al., 1987; Miceli et al., 1995). Aquí observamos que el peso de las vainas disminuyó en las parcelas con estrés hídrico en ambos experimentos (Tabla 2.7), lo que también podría explicar las reducciones de PG_E en estas parcelas. De hecho, se observó una correlación positiva y significativa entre el peso final de grano y el peso de la vaina a través de los tratamientos y los experimentos (Figura 2.7). En lenteja, Sehgal et al. (2017) también encontraron una reducción del peso de las vainas bajo EH, y observaron una correlación positiva entre el peso de las vainas y el peso de los granos, pero solo bajo ET×EH. Llamativamente, el estrato superior mostró un mayor peso de la vaina que el estrato inferior en ambos experimentos (Tabla 2.7), lo que indicaría una menor restricción física para la expansión de los granos en comparación con el estrato inferior. Por lo tanto, el peso de la vaina constituye otro factor que explicaría las diferencias en el PG_E a través del tallo principal, que hasta donde sabemos no ha sido documentado previamente en soja a campo bajo la combinación de estrés térmico e hídrico. Sería interesante en futuros estudios determinar si el menor peso de vainas en condiciones de EH durante el LLG se debe a que las vainas son más pequeñas por menor volumen interno de los lóculos o por menor ancho y largo, y/o porque son más delgadas sus paredes. Además, es posible que la disminución de la fuente (IAF) al inicio del llenado de grano en las parcelas con estrés hídrico, junto con caídas en la fotosíntesis de las hojas (Ergo et al., 2021), pudieron ejercer limitaciones en la disponibilidad de asimilados hacia las células cotiledonares durante el proceso de división celular, reduciendo posteriormente la TCG. Por lo tanto, los efectos indirectos de los asimilados en el peso final del grano necesitan mayor atención y profundizar en investigaciones.

6. Conclusiones

Tanto a nivel de planta como de estratos se observaron disminuciones en el peso de grano bajo estrés hídrico durante el periodo de llenado de grano, ya sea solo o combinado con breves periodos de estrés térmico. Aquí se muestra que estas disminuciones estuvieron fuertemente correlacionadas con la tasa de crecimiento del grano y con una asociación mínima o nula con la duración del llenado de grano. Dado que la posición de la vaina en el canopeo no está necesariamente relacionada con la edad de la vaina, la técnica de marcado de la vaina utilizada en este estudio permitió una evaluación precisa del peso final del grano a través de la tasa de crecimiento del grano y la duración del llenado de grano. Mediante este enfoque, los resultados indicaron que el peso de grano de las posiciones inferiores del canopeo no siempre es mayor que

el de las posiciones superiores, a través de diferentes condiciones ambientales (con y sin estrés). Además, a través del contenido máximo de agua del grano y del peso de la vaina (positivamente asociado al peso de grano), nuestros hallazgos aportan evidencias de las limitaciones de los granos en crecimiento para expandirse e incorporar los asimilados entrantes al grano bajo estrés hídrico solo o combinado con estrés térmico. Así, nuestro trabajo representa un avance en la comprensión de la determinación de un componente esencial del rendimiento como lo es el peso final de grano en condiciones de estrés abiótico a campo.

CAPÍTULO 3

CALIDAD DEL GRANO DE SOJA EXPUESTO A ESTRÉS TÉRMICO E HÍDRICO DURANTE EL PERIODO DE LLENADO

1. Introducción

La soja a nivel mundial representa el 59% de la producción de cultivos oleaginosos (USDA, 2023), mientras que en Argentina ese valor alcanza el 89% (MAGYP, 2023). Además, nuestro país es el principal exportador mundial de productos derivados de soja como harina y aceite (USDA, 2023), resaltando de esta manera la relevancia que tiene la calidad química de dicho cultivo para el país. La composición promedio del grano de soja en términos de concentración, promedia un 36% (35-38%) de proteína, 19% (17-20%) de aceite y 35% (30-40%) de fracción residual (Carrera et al., 2021; Medic et al., 2014). La cuantificación de proteína y aceite como concentración y no como contenido, proporciona escasa información sobre los mecanismos fisiológicos que subyacen al metabolismo de la calidad del grano. Esto es debido a que la concentración de final de proteína depende del contenido de proteína, pero también del contenido de aceite y de la fracción residual (Rotundo y Westgate, 2009). De esta manera, tener en cuenta el peso de grano resulta clave para entender las variaciones de estos componentes. En este sentido, en un estudio reciente que compiló y analizó datos de numerosos experimentos a campo, Carrera et al. (2021) encontraron en términos de contenido un promedio de 87 mg grano⁻¹ para proteína con rangos de 76-97 mg grano⁻¹, mientras que para aceite se encontró un promedio de 40 mg grano⁻¹ con rangos de 35-47 mg grano⁻¹. Por otro lado, el aceite de soja tiene un valor nutritivo alto porque es una fuente rica en ácidos grasos insaturados. Dentro de ellos se encuentran el ácido oleico con una concentración promedio de 22% (15-41%), ácido linoleico con 52% (35-57%) y ácido linolénico con un 8% (5-14%) (Carrera y Dardanelli, 2017). Además, el aceite posee componentes menores denominados tocoferoles cuya concentración total es alrededor de 331 µg g⁻¹ grano (283-360 µg g⁻¹ grano) (Carrera et al., 2021). Estos compuestos protegen a las membranas biológicas contra el deterioro oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados (Sattler et al., 2004). Los tocoferoles consisten en cuatro isoformas, cuyas concentraciones se detallan: 20 µg g⁻¹ grano (2-10 µg g⁻¹ grano) de alfa tocoferol, 4 µg g⁻¹ grano (2-10 µg g⁻¹ grano) de beta tocoferol, 167 µg g⁻¹ grano (14-362 µg g⁻¹ grano) de gamma tocoferol y 77 µg g⁻¹ grano (9-149 µg g⁻¹ grano) de delta tocoferol (Carrera y Seguin, 2016). Entre ellos, se destaca al alfa tocoferol por tener la actividad antioxidante más potente *in vivo* (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996).

En Argentina, más de dos tercios de su territorio enfrentan períodos de precipitaciones erráticas (variaciones en tiempo y espacio) (Sayago et al., 2017), provocando eventos de estrés hídrico acompañados comúnmente de estrés térmico que afectan la producción de soja (Aramburu Merlos et al., 2015; Di Mauro et al., 2019; Ergo et al., 2018). Además de la variabilidad genética de la semilla, está ampliamente documentado que las condiciones ambientales durante el llenado

del grano influyen la calidad final del mismo (Bosaz et al., 2019; Carrera et al., 2009; Dardanelli et al., 2006; Gibson y Mullen, 1996; Helms y Orf, 1998). En este sentido, el período mencionado resulta fundamental debido a que se produce la acumulación de proteína, aceite, hidratos de carbono y demás compuestos que determinan la composición final del grano (Saini y Westgate, 1999; Yang y Zhang, 2006).

Los cambios en la composición final del grano de soja ante condiciones de ET y EH individual durante el llenado de grano han sido ampliamente estudiados, mientras que la interacción de ambos estreses ha recibido escasa atención y en ensayos a campo menos aún. La temperatura media del aire durante el llenado de grano ha sido utilizada como predictora de la calidad química del grano en distintos estudios (Carrera et al., 2009; Piper y Boote, 1999). En ensayos en condiciones controladas, se han observado aumentos en la concentración de proteína con temperaturas mayores a 25-26 °C durante el llenado de grano (Gibson y Mullen, 1996; Rotundo y Westgate, 2009), mientras que cuando la temperatura media fue mayor a 35 °C la concentración de proteína disminuyó (Thomas et al., 2003; Wolf et al., 1982). Más recientemente, en ensayos a campo y con incrementos de 4,5 °C sobre una temperatura media de 26 °C durante todo el llenado se encontraron aumentos de la concentración de proteína en la mayoría de los genotipos evaluados con reducciones de la concentración de aceite (Ortiz et al., 2022). En estudios previos y similarmente, Gibson y Mullen (1996) y Thomas et al. (2003) encontraron que la concentración de aceite disminuyó con temperaturas medias mayores a 26 °C. Se ha mencionado que aumentos en la concentración de proteína con reducciones en la concentración de aceite podría relacionarse con un efecto matemático en los contenidos de cada uno de los componentes, dado que la concentración relaciona el contenido de un componente en particular respecto al peso de grano final (representado por la suma de los contenidos de proteína, aceite y fracción residual) (Rotundo y Westgate, 2009; Thomas et al., 2003). Aquel componente que se reduzca en mayor medida provocaría el incremento de la concentración del otro componente. De allí surge la importancia de tener en cuenta el peso del grano en estos estudios como variable integradora de los procesos fisiológicos que suceden durante el periodo de llenado en el que se acumulan los distintos componentes químicos del grano (Carrera et al., 2021). La composición del aceite también varía ante incrementos de la temperatura. Por ejemplo, con temperaturas medias superiores a 29 °C (Dornbos y Mullen, 1992) y 31 °C (Thomas et al., 2003) hallaron aumentos de la concentración de ácido oleico con reducciones de las concentraciones de ácido linoleico y linolénico. En este sentido, Carrera et al. (2011) observaron que la relación oleico linolénico aumentaba (lo que implica un incremento de la concentración de ácido oleico y una reducción de ácido linolénico) en ambientes cálidos, es decir aquellos cuya temperatura media durante el llenado de grano era de 24 °C. Respecto a los tocoferoles, Britz y Kremer (2002) y Chennupati et al. (2011) encontraron que las plantas expuestas a 29 °C durante todo el llenado de grano tuvieron granos con mayor

concentración de alfa tocoferol y menor concentración de delta tocoferol en comparación con los granos provenientes de plantas expuestas a un rango de temperatura entre 19 y 23 °C. Por otro lado, el estrés hídrico genera cambios en la composición del grano de soja, aunque con respuestas contrapuestas en algunos casos. Por ejemplo, Dornbos y Mullen (1992), Kumar et al. (2006) y Rotundo y Westgate (2010) mostraron que la concentración proteínica aumentó y la concentración de aceite disminuyó ante condiciones de estrés hídrico, mientras que Boydak et al. (2002), Carrera et al. (2009), Foroud et al. (1993) y Specht et al. (2001) encontraron lo contrario. Estas respuestas aparentemente opuestas, podrían atribuirse en parte, a las diferencias en el momento del inicio del estrés hídrico como así también a la intensidad y duración del estrés generado, que varía entre los experimentos mencionados. Respecto a la calidad del aceite, se ha evidenciado que el estrés hídrico afecta la composición de ácidos grasos que determinan su estabilidad (Bellaloui et al., 2014). Es así que, en condiciones de déficit hídrico, se observaron aumentos de la concentración de ácido oléico acompañados de disminuciones de los ácidos linoleico y linolénico (Boydak et al., 2002; Carrera et al., 2017; Dornbos y Mullen, 1992). En cuanto a los tocoferoles, Britz y Kremer (2002) informaron que el estrés hídrico aumentó 2 o 3 veces la concentración de alfa tocoferol, mientras que delta y gamma tocoferol disminuyeron en menor magnitud, y la concentración de tocoferoles totales se mantuvo relativamente constante en comparación con el control. El efecto de la interacción de ET×EH durante el llenado de grano sobre la composición química del grano ha sido abordado en algunos experimentos en condiciones controladas. Por ejemplo, Dornbos y Mullen (1992) encontraron que temperaturas medias de 35 °C y déficit hídrico severo provocaron aumentos en la concentración de proteína y disminución de la concentración de aceite. Además, observaron aumentos en la concentración de ácido oleico y disminución de linoleico y linolénico. Britz y Kremer (2002) encontraron que la temperatura media de 28 °C combinado con déficit hídrico durante el llenado de grano incrementó la concentración de alfa tocoferol y disminuyó la concentración de delta y gamma tocoferol. Sin embargo, la información sobre el impacto de la combinación del ET y EH sobre los componentes químicos del grano en condiciones de campo es limitada. Más aún, la dinámica temporal de acumulación de proteína, aceite y fracción residual bajo la combinación de condiciones estresantes no ha sido abordada hasta donde conocemos.

Por otro lado, Collins y Cartter (1956), Escalante y Wilcox (1993) y Sharma et al. (2013) mostraron que la composición química del grano de soja varía a través del tallo principal. En los estudios mencionados, encontraron que los granos desarrollados en el cuarto superior de la planta lograron mayor concentración de proteína y menor concentración de aceite que aquellos desarrollados en el cuarto inferior de la misma. Estos resultados fueron confirmados por Huber et al. (2016) quienes sugirieron que la mayor concentración de proteína de los granos ubicados en el estrato superior podría deberse a la mayor disponibilidad de asparagina libre, aminoácido

determinante en la acumulación de proteína en los granos. Respecto a la calidad del aceite, Bellaloui y Gillen (2010) encontraron que granos de nudos superiores exhibieron mayor concentración de ácido oleico comparado con los de nudos inferiores. Recientemente y en coincidencia, Moro Rosso et al. (2021) encontraron una mayor relación OI/Li-Ln en el estrato superior de la planta, lo que implica aumentos de la concentración de ácido oleico y reducciones de la concentración de ácido linoleico y linolénico. Resulta importante destacar que los estudios antes señalados dividieron a la planta en los distintos estratos a cosecha, para luego analizar la composición química de los granos. En este sentido, se propone un avance de metodología para estudiar la variación de la composición química a través del tallo principal. La misma consiste en identificar vainas de igual edad fenológica al inicio del llenado de grano y así determinar con precisión la dinámica de acumulación de los distintos componentes del grano. Teniendo en cuenta lo mencionado y al igual que para el peso de grano evaluado anteriormente (ver Capítulo 2), el contenido de proteína, aceite y fracción residual puede ser descripto en función de la tasa de acumulación y duración de acumulación de cada uno de estos componentes (Poeta et al., 2016; Rotundo y Westgate, 2010). Ambos parámetros podrían contribuir a explicar y entender los procesos fisiológicos involucrados en la determinación de la composición final del grano influenciada por el ET y/o EH considerando, además, la posición que ocupan las vainas dentro del canopeo.

2. Objetivos

En genotipos de soja con concentración diferencial de proteína en grano sometidos a breves intervalos de altas temperaturas, déficit hídrico y su interacción durante el llenado se propone:

1. Cuantificar los cambios en concentración y contenido de proteína, aceite y fracción residual en función de la tasa y duración del período de acumulación de los componentes mencionados.
2. Determinar la composición del aceite correspondiente a vainas de la misma edad fenológica en diferentes posiciones del canopeo, evaluando el perfil de ácidos grasos y tocoferoles del grano.

3. Materiales y métodos

El diseño experimental y los tratamientos fueron previamente descriptos en el Capítulo 2.

3.1 Determinaciones de calidad química final del grano

A cosecha, a nivel de parcela, se determinó la concentración de proteína y aceite (expresado como porcentaje en base seca) mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRs) Infratec 1241 (Foss Tecator; Höganäs, Sweden). La concentración de fracción residual (Res) (carbohidratos y cenizas) se estimó como $[100 - (\text{aceite} (\%) + \text{proteína} (\%))]$. El contenido de proteína, aceite y fracción residual (mg grano^{-1}) se calculó como el producto entre el peso seco de grano y la concentración de proteína, aceite y fracción residual, respectivamente.

3.2 Calidad química de granos por estratos

A fin de establecer la dinámica de acumulación de los distintos componentes químicos del grano, se siguió la misma metodología descrita para el PGE donde se utilizaron los granos provenientes del estrato superior e inferior (Capítulo 2). Se ajustaron modelos de regresión bilineal con *plateau* para estimar la tasa de acumulación (TA) y duración de acumulación (DA) de la proteína, aceite y fracción residual utilizando las ecuaciones 3.1 y 3.2, respectivamente.

Componente químico del grano (mg grano^{-1}) = $a + bx$ para $x < c$ (función lineal) (3.1)

Componente químico del grano (mg grano^{-1}) = $a + bc$ para $x > c$ (función *plateau*) (3.2)

Donde “x” es el día después de la fase fenológica de R5.5 (d), “a” la intersección con “y” (mg grano^{-1}), “b” la tasa de acumulación del componente químico durante el período de llenado efectivo del grano ($\text{mg grano}^{-1}\text{d}^{-1}$), y “c” es el punto de intersección entre la fase lineal de acumulación del componente químico y el contenido máximo del componente químico del grano definido por la función *plateau*. La duración de acumulación se calculó entonces como la diferencia en días entre “c” y la intersección “x” de la función lineal para la acumulación del componente químico del grano (Rotundo y Westgate, 2010). El modelo bilineal se ajustó a la base de datos del componente químico utilizando el programa Table Curve 3D (Scientific, 1991).

Para estas dinámicas, los granos fueron molidos y a partir de la harina obtenida se determinaron cada uno de los componentes químicos, cuyos análisis se detallan a continuación:

Extracción de aceite

La concentración de aceite (expresados como % en base seca) se determinó a partir de 5-10 g de harina de soja, mediante la extracción con un equipo Soxhlet durante 12 horas usando como disolvente n-hexano. Luego, se eliminó el disolvente por destilación al vacío a 45 °C durante 20-30 min, de manera similar a lo descrito en Maestri et al. (1998). El porcentaje de contenido total de aceite se determinó como la relación de peso entre el aceite obtenido y el peso seco de la muestra de harina de soja.

Proteína

Para la concentración de proteína (expresado como % en base seca), primero se obtuvo el contenido de nitrógeno a partir de 0,5 g del residuo seco de la harina desgrasada por el método Kjeldahl y luego se convirtió en concentración proteica utilizando el factor de conversión 6,25 (AOCS, 1998).

Ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico y linolénico)

A partir de 100 μ l del aceite obtenido previamente se realizó una saponificación alcalina (1 N KOH en metanol) durante 10 min. La materia insaponificable se extrajo con 30 ml de n-hexano. Los ésteres metílicos de ácidos grasos, expresados como una proporción de los ácidos grasos totales (% en base seca) se obtuvieron utilizando 20 ml de la solución 1 N H₂SO₄ en metanol y se analizaron en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-R1A con detector de ionización de llama y columna capilar de vidrio (30 m x 0,25 mm id) recubierta de polietilenglicoles. Se utilizó un programa de temperatura de 180- 240 °C (4 °C min⁻¹). Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 250 °C. Los picos se identificaron comparando sus tiempos de retención relativos con los de las muestras auténticas (Maestri y Guzmán, 1993; Maestri et al., 1998). El número de yodo teórico se calculó según Carreras et al. (1989). Además, se calculó la relación oleico linolénico como indicador de la estabilidad oxidativa del aceite.

Tocoferoles

La extracción de tocoferoles (toc) se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Almeida et al. (2011) con algunas modificaciones: los granos de soja fueron molidos hasta obtener una harina y 200 mg de ese material se extrajeron con 1,5 ml de metanol y, luego de mezclar en vórtex, se añadió 1 ml de cloroformo. Luego de 5 min de sonicación, se añadió 1 ml de tampón Tris (50 mM Tris pH 7,5/1 M NaCl). Se recuperó la fase de cloroformo y la fase de metanol (pellet restante) se volvió a extraer con cloroformo (2 ml). Los extractos de cloroformo se mezclaron y se ajustaron a un volumen final de 4 ml. Dos mililitros se secaron bajo gas nitrógeno y se volvieron a suspender en 0,2 ml de 99,5:0,5 hexano/isopropanol. La concentración de tocoferoles se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello, se utilizó un equipo Hewlett-Packard serie 1100 acoplado a un detector de fluorescencia (Agilent Technologies serie 1200). La separación de las distintas isoformas de tocoferoles (alfa, beta, gamma y delta) se realizó en una columna de fase normal Metasil Si (250 mm x 34,6 mm, 5 μ m, Varian; Metachem, Torrance, CA, EE.UU.) utilizando un sistema de disolvente isocrático (fase móvil) de 0,5% de isopropanol en hexano con un caudal de 1 ml min⁻¹. Los compuestos se detectaron y cuantificaron por fluorescencia con excitación a 296 nm y emisión a 340 nm. La identificación y cuantificación de las isoformas de tocoferoles se realizó por comparación con los tiempos de retención y las áreas de los picos de los estándares adquiridos a Merck (set de tocoferol; Calbiochem #613424). Finalmente, se calculó la concentración total de tocoferoles (expresados como μ g g⁻¹ grano) como la suma de las concentraciones de alfa, beta, gamma y delta tocoferol.

3.3 Análisis estadístico

En cada experimento, los datos se analizaron estadísticamente utilizando el modelo de ANAVA según el diseño experimental. Cada efecto principal o interacción se analizó en base a la correspondiente fuente de error del diseño en parcelas sub subdivididas. Las medias se compararon

con una prueba de diferencia mínima significativa al nivel de probabilidad de 0,05 (Di Rienzo et al., 2014). Las relaciones entre cada componente químico del grano (proteína, aceite y fracción residual) y sus atributos TA y DA, se analizaron mediante un análisis de regresión lineal. El estadístico Cp de Mallows, los residuos parciales y coeficiente de determinación (R^2) fueron analizados para identificar los modelos de ajuste más apropiados.

4. Resultados

4.1 Composición final de granos: concentración y contenido de proteína, aceite y fracción residual

En el Exp I, la concentración de Pr fue modificada significativamente ($p < 0,001$) por el nivel hídrico y el genotipo. En las parcelas bajo déficit hídrico (EH y ET×EH), la concentración de Pr se redujo un 5% respecto a las parcelas bajo riego (Control y ET). A través de los tratamientos, Alim5.09 presentó un 5% más de proteína respecto de Jocketta. La concentración de aceite fue afectada diferencialmente en ambos genotipos de acuerdo al NH ($p < 0,05$). En Jocketta, la concentración de aceite aumentó un 3% en las parcelas bajo déficit hídrico respecto de las parcelas regadas, mientras que Alim5.09 si bien presentó menores valores de aceite que Jocketta, no hubo diferencias por el nivel hídrico. En ambos genotipos, el ET regado no produjo cambios significativos en concentración de Pr y Ac respecto al control. La concentración de Res no se modificó entre genotipo ni entre tratamientos (Tabla 3.1). Los contenidos de Pr, Ac y Res del grano variaron de forma similar al peso individual de los mismos (Tabla 2.3, capítulo 2). En general, en los genotipos evaluados se observó que el ET no produjo modificaciones significativas en los diferentes componentes del grano comparados con el control. Por el contrario, en las parcelas bajo déficit hídrico se observaron reducciones significativas ($p < 0,05$) en los contenidos de Pr, Ac y Res en ambos genotipos. La respuesta diferencial de los genotipos ante las dos condiciones de déficit hídrico (EH y ET×EH), se evidenció por ejemplo en la interacción NH×G×NT para el contenido de Pr y NH×G para el contenido de Ac (Tabla 8). En Alim5.09, el EH redujo un 22, 21 y 14% los contenidos de Pr, Ac y Res respectivamente. El tratamiento que generó mayores cambios fue el ET×EH, con caídas del 45, 40 y 35% para los contenidos de Pr, Ac y Res, respectivamente. En el caso de Jocketta, los porcentajes de reducción del contenido de Pr, Ac y Res fueron menores comparados con Alim5.09 y el mayor impacto fue debido al EH con reducciones del 25%, 17% y 13% para Pr, Ac y Res, respectivamente. El ET×EH redujo un 12, 8 y 7% los contenidos de Pr, Ac y Res. Aquí es interesante destacar que en Jocketta la magnitud de la disminución frente a los tratamientos de déficit hídrico fue diferente para los tres componentes químicos mostrando un mayor impacto negativo en la proteína (la que disminuyó 19% comparado con el 12% en Ac y 10% en Res), y por lo tanto resultó en una mayor concentración de aceite en esos tratamientos como se menciona anteriormente.

En el Exp II, a través de los tratamientos, Alim5.09 presentó un 7% más de Pr que Jocketta, el cual alcanzó mayor concentración de Ac (5%) respecto a Alim5.09. Las concentraciones de Pr, Ac y Res de ambos genotipos no fueron modificadas significativamente ($p > 0,05$) en las parcelas de ET regadas (Tabla 3.1). En Alim5.09, las parcelas bajo déficit hídrico tampoco modificaron las concentraciones de Pr y Ac, aunque si disminuyó un 8% la concentración Res respecto al control. Por otro lado, en Jocketta, las parcelas bajo déficit hídrico registraron caídas del 4% en la concentración de Pr, mientras que las concentraciones de Ac y Res aumentaron un 4% y 2% respectivamente. En cuanto a los contenidos de Pr, Ac y Res, éstos siguieron la misma tendencia observada en el PG_p (Tabla 2.3, capítulo 2). El ET regado no provocó cambios significativos de los distintos componentes del grano. Al igual que en el Exp I, las parcelas bajo déficit hídrico disminuyeron significativamente todos los contenidos de los componentes químicos del grano (Tabla 3.1). En Alim5.09, las parcelas bajo EH y ET×EH disminuyeron los contenidos de Pr, Ac y Res de manera similar, con caídas promedio del 15% respecto al control. Por el contrario, en Jocketta las parcelas bajo EH y ET×EH afectaron diferencialmente a cada uno de los componentes del grano. De esta manera, se observó una mayor disminución del contenido de Pr (16%) comparado con las caídas del Ac y Res, los que disminuyeron un 9 y 11%, respectivamente. La mayor disminución en el contenido de Pr explicaría los incrementos observados en la concentración de Ac y Res. La respuesta diferencial entre los genotipos al EH y ET×EH estaría resaltando la interacción significativa de NH×G observada tanto para Pr como para Ac ($p < 0,05$; Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Concentración y contenido de proteína, aceite y fracción residual en grano considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [TAmb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento (Exp) I y II.

Nivel hídrico	Genotipo	Nivel térmico	Proteína						Aceite						Fracción residual					
			Exp I		Exp II		Exp I		Exp II		Exp I		Exp II		Exp I		Exp II			
			(% en base seca)						(mg grano ⁻¹)											
Riego	Alim5.09	TAmb	40,5	40,7	23,5	22,7	36,0	40,0	89,3	89,1	51,5	49,7	79,0	80,3						
		ET	40,2	40,8	23,4	23,4	38,3	41,2	85,0	88,9	49,1	51,0	80,9	85,7						
	Jocketta	TAmb	38,7	38,9	24,2	23,5	37,2	37,6	63,4	66,4	39,7	40,2	61,0	64,2						
		ET	38,2	38,5	24,0	23,5	39,9	37,9	62,5	65,6	36,2	40,0	65,0	64,5						
EH	Alim5.09	TAmb	39,2	40,5	22,8	22,9	38,0	36,5	69,4	77,1	40,8	43,8	67,8	69,4						
		ET	37,4	40,7	23,6	22,4	38,9	36,9	49,0	74,7	31,0	41,2	51,0	67,5						
	Jocketta	TAmb	36,1	37,0	25,0	24,4	38,9	38,6	47,6	53,1	32,8	35,1	51,0	55,5						
		ET	37,1	37,5	24,5	24,3	38,3	38,1	55,6	58,2	36,4	37,7	56,9	59,2						
DMS (doble interacción)			1,1	0,8	0,5	0,8	2,5	2,8	8,3	11,0	6,0	7,4	8,6	11,5						
DMS (triple interacción)			1,5	1,1	0,8	1,2	3,5	3,9	11,7	15,5	8,5	10,5	12,2	16,3						
Nivel de significancia																				
Nivel hídrico (NH)			***	**	ns	ns	ns	ns	***	**	**	*	***	*						
Genotipo (G)			***	***	***	**	ns	ns	***	***	**	**	**	**						
Nivel térmico (NT)			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns						
NH×G			ns	*	*	*	ns	*	*	ns	*	ns	ns	ns						
NH×NT			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns						
G×NT			ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns						
NH×G×NT			ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns						

ns, no significativo

***, **, * Significativo al $p \leq 0,001$, $0,01$ y $0,05$, respectivamente.

4.2 Composición por estrato: concentración y contenido de proteína, aceite y fracción residual

En el Exp I, el contenido de Pr y Res fueron explicados significativa y principalmente por la TA ($R^2=0,62$; $p < 0,0001$ y $R^2=0,15$; $p = 0,0262$ respectivamente), sin efecto significativo ($p > 0,05$) de la DA (Figura 3.1 A, B, E y F). Por el contrario, el contenido de Ac se explicó similarmente por la TA ($R^2=0,20$; $p < 0,0095$) y la DA ($R^2=0,29$; $p = 0,0014$) (Figura 3.1 C y D), siendo esta última relación menos robusta que la relación entre Pr y TA. Las pendientes de 29 y 12 mg grano⁻¹ d⁻¹ para Pr, y Res indicaron incrementos de ~29 y 12 mg en el contenido de Pr y Res por cada incremento en la tasa de acumulación, mientras que para el Ac las pendientes de 16 mg grano⁻¹ d⁻¹ en la TA y de 0,7 d en la DA promovieron aumentos de ~16 mg en el contenido de Ac (Figura 3.1). A través de los tratamientos y estratos, Alim5.09 alcanzó los mayores contenidos de Pr, Ac y Res comparado con Jocketta (17%, 11% y 19%, respectivamente). Asimismo, a través de los tratamientos y estratos se observó que, Alim5.09 tuvo un 16% más de TA de Pr respecto a Jocketta. Las diferencias genotípicas también se registraron en términos de concentración, donde Alim5.09 presentó un 4% más de concentración de Pr respecto a Jocketta, que a su vez exhibió un 4% y 2% más de concentración de Ac y Res que Alim5.09 respectivamente (Tabla 3.2). El NH fue otro factor que afectó significativamente a la composición química del grano. Es así que, independientemente del genotipo y del estrato, el contenido de Pr, Ac y Res en las parcelas bajo déficit hídrico se redujo en promedio un 23% respecto a las parcelas regadas. En este sentido, se observó que la TA también se redujo en las parcelas bajo déficit hídrico, un 21% en Pr y un 13% en Res, aunque sin cambios en Ac (Tabla 3.2). La DA fue entre 3-4 días mayor en las parcelas regadas en Pr y Ac sin modificaciones en Res (Tabla 3.2). Estos cambios impactaron en la concentración de los componentes del grano, donde en las parcelas bajo déficit hídrico se redujo un 5% la concentración de Pr, mientras que aumentaron un 1% y 5% la concentración de Ac y Res en comparación con las parcelas regadas. A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 3.2 la dinámica de acumulación del peso de grano y los componentes químicos en el control de cada genotipo y bajo la condición de déficit hídrico que generó las mayores diferencias en composición: ET×EH en Alim5.09 y EH en Jocketta. Por otro lado, las parcelas estresadas térmicamente (independientemente del genotipo y estrato) redujeron en promedio un 9% el contenido de Pr y Ac comparado con las parcelas sin ET donde el contenido Res no varió. La TA y DA no se modificaron significativamente por los tratamientos de ET. Estos cambios en las parcelas bajo ET y ET×EH, provocaron una reducción del 2% en la concentración de Pr, aumentando en igual proporción la concentración Res respecto a las parcelas sin ET (control y EH). En general, el déficit hídrico y el ET redujeron en mayor proporción los contenidos de Pr, Ac y fracción residual en Alim5.09 comparado con Jocketta, evidenciando las interacciones significativas de NH×G y G×NT (Tabla 3.2). Por último, resulta interesante destacar el efecto significativo del estrato en la composición química, donde a través de tratamientos y genotipos,

el contenido de Pr y Ac fue un 12% y 8% mayor en el estrato superior respecto del inferior. Coincidentemente, la TA en el estrato superior fue un 15% y 40% mayor en Pr y Res respectivamente, comparado con el estrato inferior. La DA de Pr, Ac y Res no varió entre estratos. También se observó que el estrato superior alcanzó un 3% más de concentración de Pr comparado con el estrato inferior, que disminuyó en igual proporción la concentración de Res (Tabla 3.2).

En el Exp II, el contenido de Pr, Ac y Res fueron explicados significativa y positivamente por la TA ($R^2=0,71$; $p < 0,0001$, $R^2=0,42$; $p < 0,0001$ y $R^2=0,18$; $p = 0,0147$ respectivamente), sin efectos significativos sobre la DA (Figura 3.3). Las pendientes de 27, 21 y 10 mg grano⁻¹ d⁻¹ para Pr, Ac y Res respectivamente indicaron incrementos de ~27, 21 y 10 mg en el contenido de Pr, Ac y Res por cada incremento en la tasa de acumulación (Figura 3.3). Las variaciones en la composición química del grano se muestran en la Tabla 3.3. Se observó que, independientemente de los tratamientos y estrato, el contenido de Pr, Ac y Res fue un 26%, 17% y 18% mayor en Alim5.09 respecto a Jocketta. Siguiendo el orden de los mencionados componentes, la TA en Alim5.09 fue un 30%, 16% y 14% más alta comparada con Jocketta. La DA no difirió entre genotipos para Pr y Ac, mientras que para Res fue 4 días de mayor duración en Alim5.09 respecto a Jocketta. Además, Alim5.09 exhibió un 6% más de concentración de Pr comparado con Jocketta, que a su vez alcanzó un 6% y 3% más de concentración de Ac y Res vs. Alim5.09 respectivamente (Tabla 3.3). El nivel hídrico modificó significativamente a la composición química del grano, donde independientemente de los genotipos y estratos, las parcelas bajo déficit hídrico redujeron en promedio un 14% el contenido de Pr, Ac y Res respecto a las parcelas regadas. La reducción en estos contenidos estuvo explicada por caídas en igual proporción de la TA en las parcelas bajo déficit hídrico, mientras que la DA no se modificó. Se observó también que en las parcelas bajo déficit hídrico se redujeron un 2% y 1% las concentraciones de Pr y Res comparado con las parcelas regadas. Si bien la concentración de aceite no se modificó significativamente ante el factor individual nivel hídrico, si lo hizo ante la interacción NH×G, al igual que la concentración de Pr ($p < 0,01$; Tabla 3.3). Aquí observamos que en las parcelas bajo déficit hídrico Alim5.09 prácticamente no modificó la concentración de Pr ni Ac, mientras que Jocketta disminuyó un 4% la concentración de Pr y aumentó un 3% la concentración de Ac respecto a las parcelas bajo riego. Esto podría ser atribuido a que en Jocketta el déficit hídrico provocó una mayor reducción en el contenido de Pr (20%) respecto del contenido de Ac (10%) y Res (10%) por lo que disminuyó la concentración de Pr aumentando la concentración de Ac. A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 3.4 la dinámica de acumulación del peso de grano y los componentes químicos en el control de cada genotipo y bajo la condición de déficit hídrico que generó las mayores diferencias en composición: ET×EH en Alim5.09 y EH en Jocketta. Por otro lado, los distintos componentes del grano y sus parámetros, TA y DA no fueron modificados significativamente en las parcelas bajo ET. Tampoco se registraron cambios en la Pr, Ac y Res

en términos de concentración (Tabla 3.3). El factor estrato no produjo cambios significativos del contenido de Pr, Ac y Res ($p > 0,05$). Sin embargo, en contenido de Pr, se observó una mayor TA en el estrato superior respecto del inferior. Además, la DA para todos los componentes fue en promedio 4 días de mayor duración en el estrato inferior respecto del superior (Tabla 3.3). Por último, debido a la interacción significativa de NH×E para la concentración de Pr y Res, en el estrato superior el déficit hídrico redujo un 3% la concentración de Pr y aumentó un 2% la concentración de Res respecto de las parcelas regadas. En el estrato inferior, sin embargo, no se observaron cambios significativos para Pr y Res.

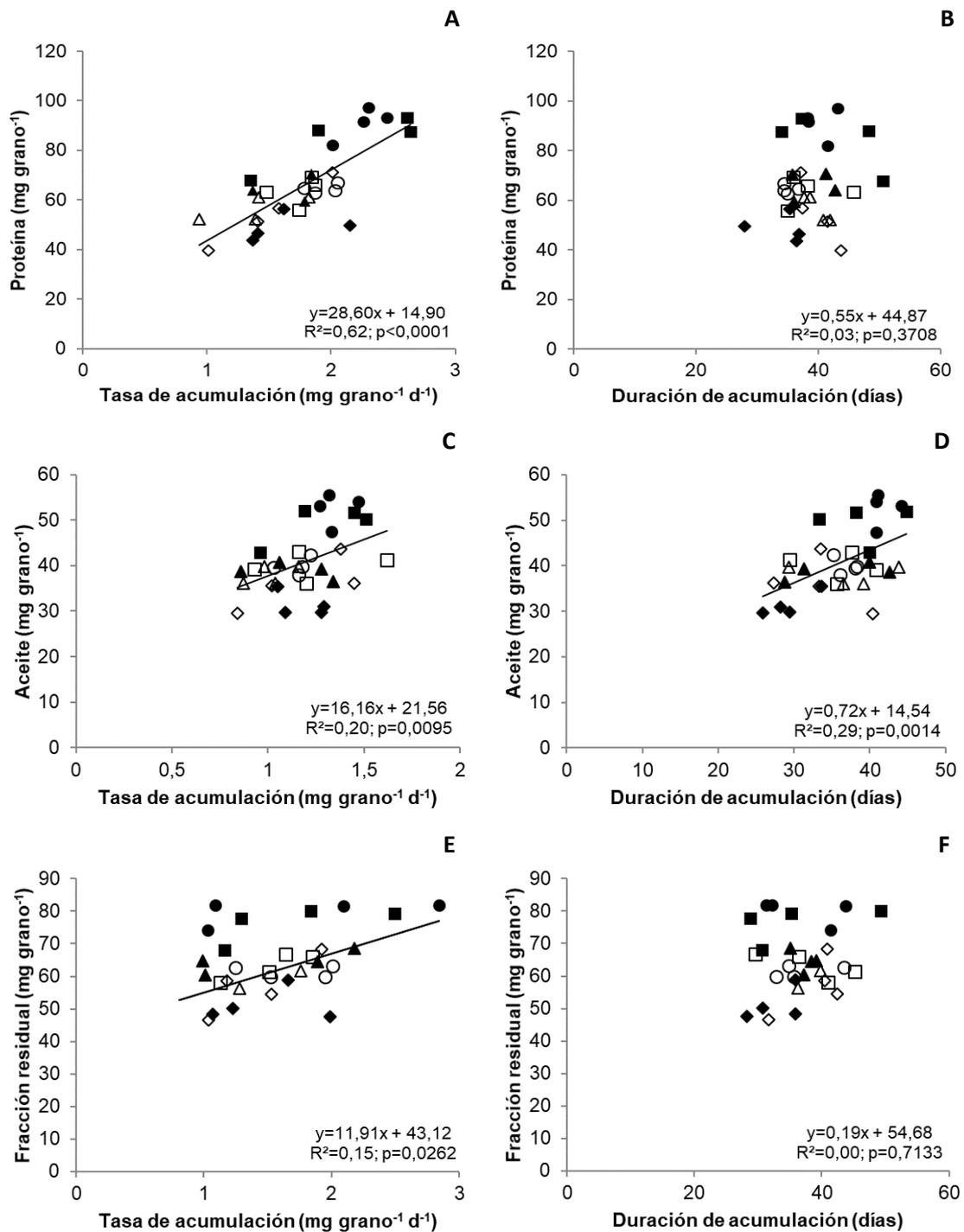


Figura 3.1. Tasa de acumulación y duración de acumulación de los distintos componentes del grano en vainas de la misma edad fenológica (los datos representan el promedio de los dos estratos del canopeo) a través de genotipos (Alim5.09 [símbolos llenos] y Jocketta [símbolos vacíos]) y de tratamientos, que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (riego a temperatura ambiente) [círculos], estrés térmico (riego bajo ET) [cuadrados], estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) [triángulos] y ET×EH [rombos] en el experimento I: proteína (A y B), aceite (C y D) y fracción residual (E y F).

Tabla 3.2. Concentración (Conc), contenido (Cont), tasa de acumulación (TA) y duración de acumulación (DA) de proteína, aceite y fracción residual en granos correspondientes a vainas de la misma edad fenológica en dos estratos del canopeo (superior e inferior) considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [TAmb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento I.

Nivel hídrico	Genotipo	Nivel térmico	Estrato	Proteína				Aceite				Fracción residual			
				Conc %	Cont (mg grano ⁻¹)	TA (mg grano ⁻¹ d ⁻¹)	DA (d)	Conc %	Cont (mg grano ⁻¹)	TA (mg grano ⁻¹ d ⁻¹)	DA (d)	Conc %	Cont (mg grano ⁻¹)	TA (mg grano ⁻¹ d ⁻¹)	DA (d)
Riego	Alim5.09	Tamb	superior	41,1	95,3	2,4	40,6	23,7	54,9	1,4	41,0	35,3	81,8	2,5	37,5
			inferior	40,4	86,9	2,1	39,9	23,4	50,3	1,3	42,5	36,3	78,1	1,1	36,8
		ET	superior	40,8	90,6	2,3	42,8	23,3	51,8	1,3	41,5	35,9	79,8	2,2	42,2
			inferior	39,3	77,8	2,0	42,3	23,7	46,7	1,2	36,7	37,0	72,9	1,2	29,7
	Jocketta	TAmb	superior	39,1	65,4	2,0	34,4	24,1	40,2	1,2	35,6	36,8	61,6	2,0	35,2
			inferior	38,7	63,8	1,8	35,8	24,1	39,7	1,1	38,1	37,2	61,3	1,4	38,2
		ET	superior	38,8	66,4	1,7	40,8	24,0	41,1	1,0	39,2	37,3	63,8	1,7	40,8
			inferior	37,6	61,0	1,8	36,6	23,9	38,7	1,4	32,5	38,5	62,4	1,4	35,3
EH	Alim5.09	Tamb	superior	39,8	70,4	2,0	38,5	22,6	40,0	1,2	35,6	37,6	66,6	2,0	36,7
			inferior	38,1	61,7	1,6	39,4	23,2	37,5	1,1	35,7	38,7	62,6	1,0	38,2
		ET	superior	38,3	53,0	1,9	31,6	23,4	32,5	1,2	29,8	38,3	53,2	1,8	32,0
			inferior	36,2	45,1	1,4	36,6	24,4	30,4	1,2	28,8	39,5	49,2	1,2	33,3
	Jocketta	TAmb	superior	37,6	61,1	1,6	38,1	24,5	39,7	1,1	36,6	37,9	42,7	1,7	36,8
			inferior	36,1	52,1	1,2	41,3	25,0	36,1	1,0	37,9	39,0	37,3	1,0	38,8
		ET	superior	37,6	61,3	1,7	39,3	24,5	39,6	1,2	33,4	38,0	61,5	1,7	41,7
			inferior	35,9	48,3	1,3	40,5	24,7	32,8	1,1	33,9	39,5	52,6	1,1	36,1
DMS (doble interacción)				1,0	6,2	0,3	4,7	0,4	3,1	0,2	5,7	0,7	10,0	0,2	5,8

DMS (triple interacción)	1,4	8,7	0,4	6,7	0,6	4,4	0,3	8,1	1,0	14,1	0,3	8,2
DMS (cuadruple interacción)	1,9	12,3	0,6	9,4	0,8	6,2	0,5	11,4	1,4	19,9	0,4	11,6
Nivel de significancia												
Nivel hídrico (NH)	***	***	***	ns	ns	***	ns	*	***	***	**	ns
Genotipo (G)	***	***	**	ns	***	***	ns	ns	*	**	ns	ns
Nivel térmico (NT)	*	**	ns	ns	ns	**	ns	ns	*	ns	ns	ns
Estrato (E)	***	**	*	ns	ns	**	ns	ns	***	ns	***	ns
NH×G	ns	***	ns	*	*	***	ns	ns	*	ns	ns	ns
NH×NT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NH×E	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
G×NT	ns	*	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	*	ns	ns
G×E	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns
NT×E	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NH×G×NT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns, no significativo

***, **, * Significativo al $p \leq 0,001$, $0,01$ y $0,05$, respectivamente. Sólo se muestran las interacciones significativas.

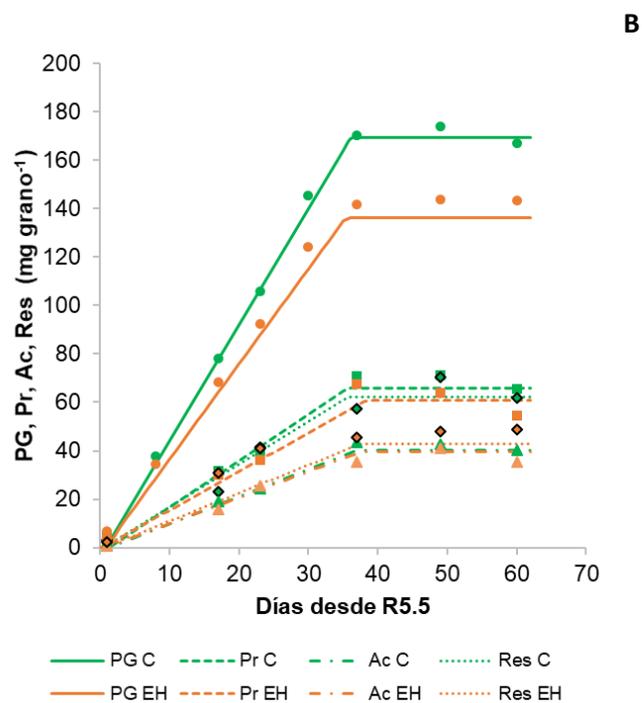
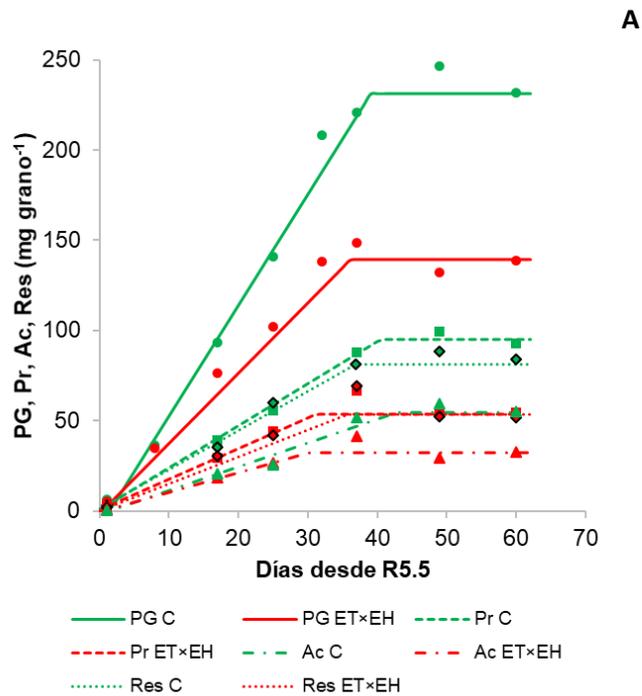


Figura 3.2. Dinámica de acumulación del peso de grano (PG) y del contenido de proteína (Pr), aceite (Ac) y fracción residual (Res) en los genotipos Alim5.09 (A) y Jocketta (B) bajo los tratamientos que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (C, indicado en verde), estrés hídrico (EH, indicado en naranja) y la interacción de estrés térmico con estrés hídrico (ET×EH, indicado en rojo) en el experimento I. Los símbolos representan el peso de grano (círculos), proteína (cuadrados), aceite (triángulos) y fracción residual (rombos).

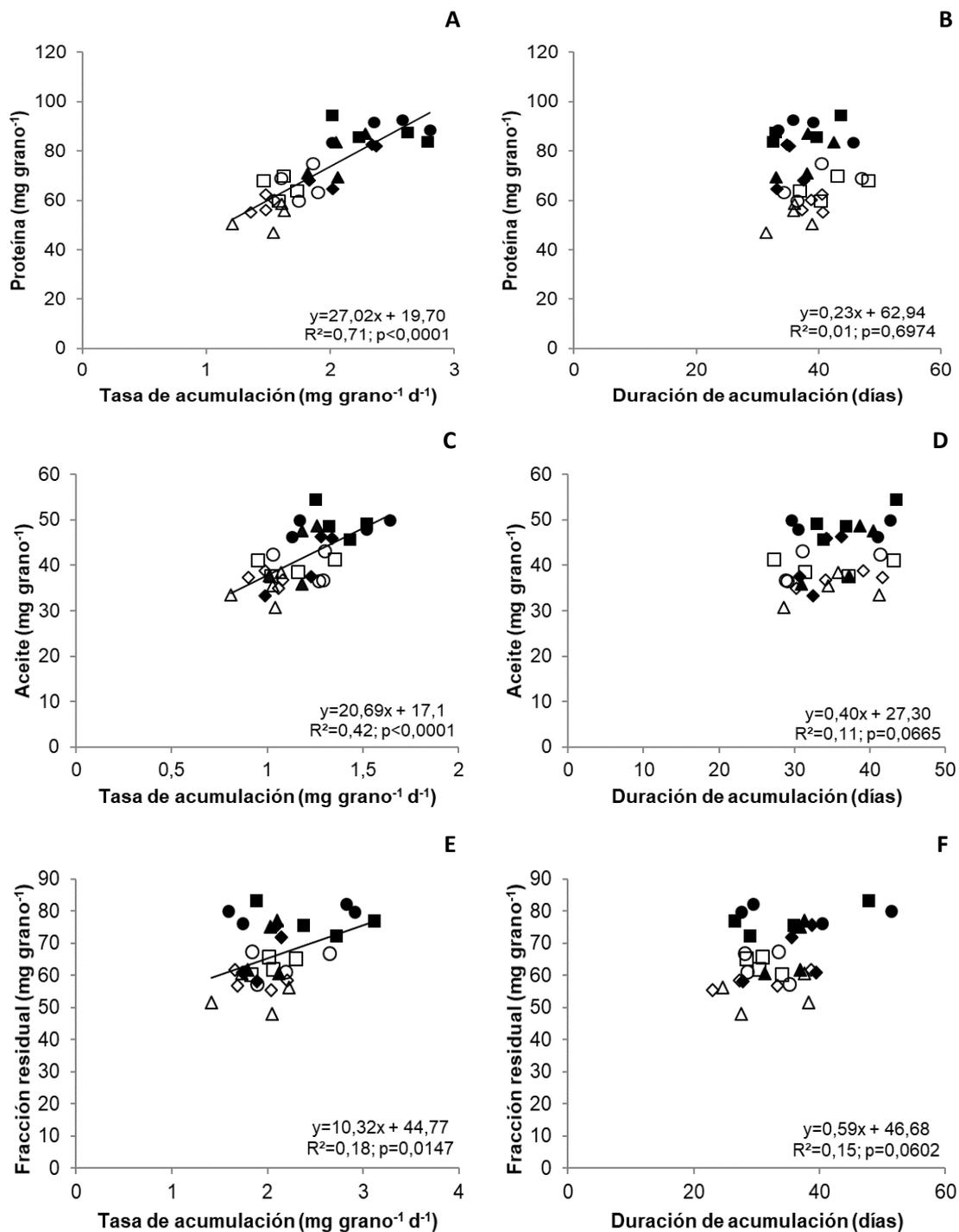


Figura 3.3. Tasa de acumulación y duración de acumulación de los distintos componentes del grano en vainas de la misma edad fenológica (los datos representan el promedio de los dos estratos del canopeo) a través de genotipos (Alim5.09 [símbolos llenos] y Jocketta [símbolos vacíos]) y de tratamientos, que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (riego a temperatura ambiente) [círculos], estrés térmico (riego bajo ET) [cuadrados], estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) [triángulos] y ET×EH [rombos] en el experimento II: proteína (A y B), aceite (C y D) y fracción residual (E y F).

Tabla 3.3. Concentración (Conc), contenido (Cont), tasa de acumulación (TA) y duración de acumulación (DA) de proteína, aceite y fracción residual en granos correspondientes a vainas de la misma edad fenológica en dos estratos del canopeo (superior e inferior) considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [Tamb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento II.

Nivel hídrico	Genotipo	Nivel térmico	Estrato	Proteína				Aceite				Fracción residual			
				Conc %	Cont (mg grano ⁻¹)	TA (mg grano ⁻¹ d ⁻¹)	DA (d)	Conc %	Cont (mg grano ⁻¹)	TA (mg grano ⁻¹ d ⁻¹)	DA (d)	Conc %	Cont (mg grano ⁻¹)	TA (mg grano ⁻¹ d ⁻¹)	DA (d)
Riego	Alim5.09	Tamb	superior	41,7	92,2	2,5	37,4	22,2	49,0	1,3	36,6	36,2	80,0	2,3	39,4
			inferior	40,3	86,1	2,4	39,5	22,5	48,1	1,4	35,3	37,1	79,3	2,3	34,9
		ET	superior	41,3	85,8	2,7	32,7	22,7	47,1	1,4	35,3	36,0	74,8	2,9	27,7
			inferior	40,7	90,2	2,1	41,6	23,4	51,9	1,4	38,2	35,9	79,4	2,1	41,8
	Jocketta	Tamb	superior	40,4	69,2	1,9	37,4	23,3	39,9	1,3	30,1	36,3	62,1	2,3	31,6
			inferior	38,3	64,4	1,7	41,7	23,6	39,7	1,2	35,1	38,2	64,2	2,0	31,0
		ET	superior	39,5	66,9	1,7	40,0	23,6	40,0	1,3	29,3	37,0	62,7	2,1	31,1
			inferior	38,2	64,0	1,5	44,2	23,6	39,4	1,0	40,1	38,2	63,9	2,0	30,6
EH	Alim5.09	Tamb	superior	41,4	78,2	2,2	35,7	22,3	42,3	1,2	34,8	36,4	68,8	2,1	34,4
			inferior	41,1	77,3	1,9	40,3	22,6	42,6	1,1	38,8	36,3	68,4	1,9	36,9
		ET	superior	41,3	73,4	2,2	34,2	22,2	39,6	1,2	33,4	36,6	64,9	2,0	31,7
			inferior	40,6	75,4	2,1	36,2	22,6	41,9	1,3	33,5	36,8	68,3	1,9	39,1
	Jocketta	Tamb	superior	37,6	51,4	1,6	33,7	24,3	33,2	1,0	31,5	38,1	52,1	2,1	26,1
			inferior	37,2	54,5	1,4	37,5	24,6	36,0	0,9	38,6	38,3	56,1	1,6	37,9
		ET	superior	38,2	57,7	1,5	39,8	23,8	35,9	1,1	32,2	37,7	56,9	2,1	25,1
			inferior	37,8	59,2	1,5	38,9	24,3	38,1	0,9	40,4	37,8	59,2	1,7	36,0
DMS (doble interacción)				0,5	7,0	0,2	4,2	0,5	4,6	0,2	5,5	0,4	6,0	0,4	6,0

DMS (triple interacción)	0,7	9,9	0,3	6,0	0,7	6,4	0,2	7,8	0,6	8,4	0,6	8,5
DMS (cuadruple interacción)	1,0	13,9	0,4	8,4	1,0	9,1	0,3	11,0	0,8	11,9	0,8	12,0
Nivel de significancia												
Nivel hídrico (NH)	**	***	***	ns	ns	**	**	ns	*	***	ns	*
Genotipo (G)	***	***	***	ns	***	***	**	ns	***	***	*	ns
Nivel térmico (NT)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Estrato (E)	***	ns	**	*	ns	ns	ns	*	**	ns	ns	*
NH×G	***	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NH×NT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NH×E	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
G×NT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
G×E	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NT×E	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NH×G×NT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns

ns, no significativo

***, **, * Significativo al $p \leq 0,001$, $0,01$ y $0,05$, respectivamente. Sólo se muestran las interacciones significativas.

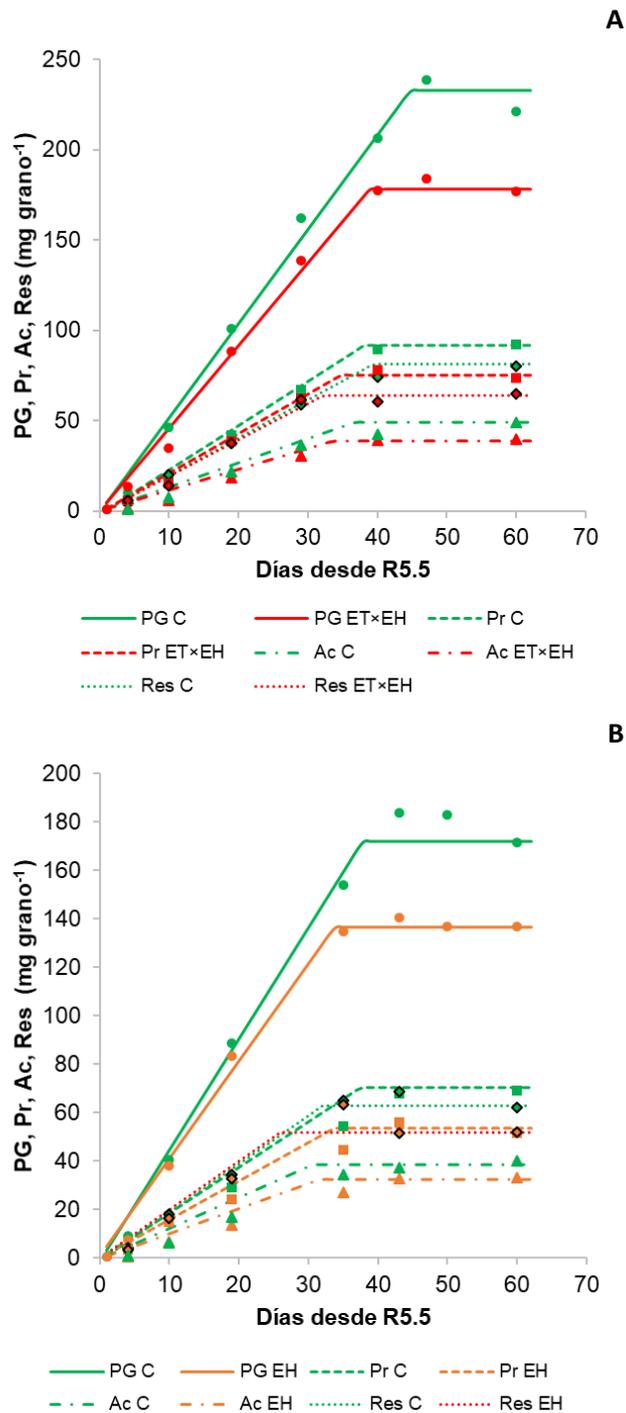


Figura 3.4. Dinámica de acumulación del peso de grano (PG) y contenido de proteína (Pr), aceite (Ac) y fracción residual (Res) en los genotipos Alim5.09 (A) y Jocketta (B) bajo los tratamientos que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (C, indicado en verde), estrés hídrico (EH, indicado en naranja) y la interacción de estrés térmico con estrés hídrico (ET×EH, indicado en rojo) en el experimento II. Los símbolos representan el peso de grano (círculos), proteína (cuadrados), aceite (triángulos) y fracción residual (rombos).

4.3 Relaciones entre proteína, aceite y fracción residual con la relación fuente destino, contenido máximo de agua y peso de vaina

A partir de las tablas 2.4, 2.6, 2.7, 3.2 y 3.3, se establecieron asociaciones entre las variables mediante correlaciones de Pearson (Tabla S1 del anexo). Así, a través de los tratamientos, se evidenció que el contenido y la tasa de acumulación de cada uno de los componentes químicos (proteína, aceite y fracción residual) se asoció significativa y positivamente con la relación fuente destino, indicando que a mayor relación fuente destino se lograrían mayores tasas de acumulación y, por ende, mayor contenido de proteína, aceite y fracción residual. A diferencia de ello, la duración de acumulación de los mencionados componentes químicos no fue asociada significativamente con la relación fuente destino. Adicionalmente, se observó que la tasa de acumulación de proteína, aceite y fracción residual fueron asociadas significativa y positivamente con el contenido máximo de agua, el peso de vaina y la tasa de crecimiento del grano. De este modo, el contenido y la tasa de acumulación de proteína, aceite y fracción residual siguieron la tendencia de asociación observada en el peso de grano y sus parámetros (capítulo 2).

4.4 Concentración de ácidos grasos insaturados y relación ácido oleico linolénico

En la Tabla 3.4 se muestran las variaciones en la concentración de ácidos grasos insaturados y la relación oleico linolénico para los experimentos I y II. En el Exp I, independientemente del genotipo y estrato, se observó un efecto significativo del nivel hídrico, donde las parcelas bajo déficit hídrico modificaron la composición del aceite, incrementando un 7% la concentración de ácido oleico respecto de las parcelas regadas. Por el contrario, la concentración de los ácidos linoleico y linolénico disminuyó un 1% y 10% en las parcelas con EH. De esta forma, la relación Ol/Ln se incrementó un 16% en las parcelas bajo déficit hídrico respecto de las parcelas regadas. En general, los factores genotipo y nivel térmico no provocaron cambios significativos en los distintos ácidos grasos insaturados. De manera interesante, se observó que el aceite de granos del ES presentó mayor concentración de ácido oleico (9%) y menor concentración de ácido linoleico y linolénico (4 y 6% respectivamente) comparado con el EI. Estas diferencias se reflejaron en la relación Ol/Ln que fue un 14% mayor en el ES comparado con el EI. Debido al efecto significativo de la interacción G×E observamos que, si bien en el EI hubo menor concentración de ácido oleico y relación Ol/Ln respecto del ES, en el caso del genotipo Alim.09 esa diferencia entre estratos fue del 13% para el ácido oleico y 23% para la relación Ol/Ln, mientras que en Jocketta la diferencia fue menor, 3% y 5% para el ácido oleico y la relación Ol/Ln respectivamente (Tabla 3.4).

En el Exp II, independientemente del genotipo y estrato, las parcelas bajo déficit hídrico incrementaron un 8% la concentración de ácido oleico y disminuyeron un 3% y 6% la concentración ácidos linoleico y linolénico respecto de las parcelas regadas. De esta manera, la relación Ol/Ln se incrementó un 13% en las parcelas bajo déficit hídrico respecto a las parcelas regadas. El factor genotipo al igual que el nivel térmico no fueron significativos para ninguno de los ácidos grasos insaturados evaluados. Sin embargo, en Jocketta, los granos del EI alcanzaron un 4% y 10% más de ácido linoleico y linolénico respecto del ES, mientras que en Alim5.09 no hubo diferencia por estrato destacando la interacción significativa G×E ($p < 0,05$; Tabla 3.4). En la relación Ol/Ln el mayor valor se observó en el ES de Jocketta (3,7%), sin embargo, en Alim5.09 tampoco se registraron diferencias por estrato señalando la interacción significativa G×E ($p < 0,05$; Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Perfil de ácidos grasos insaturados y relación ácido oleico/linolénico (O/Ln) del aceite de granos correspondientes a vainas de la misma edad fenológica en dos estratos del canopeo (superior e inferior) considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [TAmb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento (Exp) I y II.

Nivel hídrico	Genotipo	Nivel térmico	Estrato	% (porcentaje en base seca)							
				Oleico		Linoléico		Linolénico		O/Ln	
				Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II
Riego	Alim5.09	Tamb	superior	26,5	24,7	51,0	51,6	6,4	7,5	4,1	3,3
			inferior	22,6	23,0	51,8	52,9	7,4	8,1	3,1	2,9
		ET	superior	27,3	24,2	50,0	50,4	6,0	7,1	4,6	3,4
			inferior	21,5	26,0	54,5	50,2	7,6	7,4	2,9	3,5
	Jocketta	TAmb	superior	23,5	21,8	51,3	51,8	7,3	7,4	3,2	3,0
			inferior	22,2	23,1	54,5	53,2	7,5	8,0	3,0	2,9
		ET	superior	25,0	25,3	50,2	49,6	6,4	6,9	3,9	3,7
			inferior	25,2	23,3	52,0	50,3	6,6	7,3	3,8	3,2
EH	Alim5.09	Tamb	superior	24,0	22,8	53,0	53,3	7,1	7,6	3,4	3,0
			inferior	22,6	23,9	54,7	53,3	7,4	7,9	3,0	3,0
		ET	superior	27,2	23,5	50,2	52,5	6,1	7,5	4,5	3,2
			inferior	24,2	26,3	52,6	50,1	6,4	7,3	3,8	3,6
	Jocketta	TAmb	superior	24,2	24,2	51,6	49,5	7,0	7,3	3,5	3,3
			inferior	23,5	21,0	52,7	54,2	7,1	8,4	3,3	2,5
		ET	superior	25,9	26,1	51,9	50,6	6,3	7,0	4,2	3,7
			inferior	25,2	24,0	52,8	51,7	6,5	7,8	3,9	3,1
DMS (doble interacción)				1,5	2,0	1,5	1,6	0,5	0,3	0,4	0,4
DMS (triple interacción)				2,1	2,8	2,1	2,3	0,7	0,5	0,6	0,5

DMS (cuadruple interacción)	3,1	4,0	3,0	3,2	1,0	0,7	0,9	0,7
Nivel de significancia								
Nivel hídrico (NH)	**	*	ns	**	***	***	***	**
Genotipo (G)	ns							
Nivel térmico (NT)	ns							
Estrato (E)	**	ns	***	ns	*	***	**	ns
NH×G	ns							
NH×NT	ns							
NH×E	ns							
G×NT	ns							
G×E	*	ns	ns	*	ns	*	*	*
NT×E	ns							
NH×G×NT	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns

ns, no significativo

***, **, * Significativo al $p \leq 0,001$, $0,01$ y $0,05$, respectivamente. Sólo se muestran las interacciones significativas.

4.5 Concentración de tocoferoles

En el Exp I, se registraron diferencias significativas de las interacciones NH×G ($p < 0,01$) para alfa toc y NH×E ($p < 0,05$) y G×E ($p < 0,01$) para beta toc, aunque éstas representaron $\leq 10\%$ de la variabilidad de los mencionados tocoferoles (datos no mostrados). Además, se registraron diferencias significativas entre genotipos ($p < 0,05$) para todas las isoformas de tocoferoles (Tabla 3.5). Alim5.09 presentó los valores más altos de alfa toc y beta toc (243% y 60% respectivamente) en relación a Jocketta. Este último genotipo exhibió un 29% y 47% más de gamma toc y delta toc respecto a Alim5.09. Las parcelas regadas bajo ET no se diferenciaron significativamente del control ($p > 0,05$). A través de los genotipos, las parcelas bajo déficit hídrico provocaron aumentos significativos de alfa toc y disminuciones de delta toc en ambos genotipos. Los tratamientos de EH solo o combinados con ET, provocaron un incremento del 140% de alfa toc respecto a las parcelas regadas, mientras que el impacto en delta toc fue considerablemente menor con disminuciones que alcanzaron el 34%. Por último, no se observaron diferencias significativas debido al genotipo y tratamientos en la concentración total de tocoferoles, indicando solo la modificación de su composición (Tabla 3.5). El factor estrato tampoco resultó significativo para ninguno de los tocoferoles analizados (Tabla 3.5).

En el Exp II, se observaron diferencias significativas entre genotipos para alfa toc, beta toc y delta toc (Tabla 3.5). Similar al Exp I, Alim5.09 presentó valores más altos para alfa toc y beta toc (170% y 73% respectivamente) comparado con Jocketta y este último un 29% más de delta toc respecto a Alim5.09. Las parcelas bajo déficit hídrico incrementaron significativamente ($p < 0,05$) un 25% alfa toc, disminuyendo un 14% delta toc respecto a las parcelas regadas. A través de los genotipos, en las parcelas regadas se observó una tendencia de mayor concentración de gamma toc y tocoferoles totales respecto a las parcelas bajo déficit hídrico. Al igual que en el Exp I, las parcelas regadas bajo ET no modificaron ($p > 0,05$) a las distintas isoformas de tocoferoles incluyendo los tocoferoles totales (Tabla 3.5). Por último, tampoco se registraron diferencias en las distintas isoformas de tocoferoles entre estratos (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Concentración de alfa, beta, gamma, delta tocoferol y tocoferoles totales de granos correspondientes a vainas de la misma edad fenológica en dos estratos del canopeo (superior e inferior) considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [TAmb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento (Exp) I y II.

Nivel hídrico	Genotipo	Nivel térmico	Estrato	Tocoferoles ($\mu\text{g g}^{-1}$ grano)									
				Alfa		Beta		Gamma		Delta		Total	
				Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II
Riego	Alim5.09	Tamb	superior	25,2	47,2	9,9	12,9	110,8	165,8	43,7	65,4	189,6	291,3
			inferior	34,5	48,2	10,7	14,3	132,8	169,1	48,9	67,0	227,0	298,6
		ET	superior	30,1	55,6	12,3	16,2	137,7	163,7	55,3	63,9	235,4	299,3
			inferior	29,3	36,3	9,7	11,4	138,2	132,5	49,3	53,6	226,5	233,8
	Jocketta	TAmb	superior	5,8	24,4	5,0	9,9	93,5	188,5	46,6	87,1	150,9	310,0
			inferior	14,1	12,4	7,0	6,3	168,0	119,8	76,8	56,8	265,8	195,3
		ET	superior	5,6	18,4	6,2	8,0	121,3	165,0	75,0	76,3	208,1	267,7
			inferior	10,9	12,9	8,0	6,4	245,9	125,0	76,9	60,1	341,7	204,4
EH	Alim5.09	Tamb	superior	72,6	64,2	16,5	13,6	121,3	147,7	33,6	48,0	243,9	273,5
			inferior	40,8	54,8	9,5	12,4	121,1	156,3	36,5	49,7	207,9	273,1
		ET	superior	87,9	57,6	13,2	12,3	128,1	123,4	26,6	39,9	255,8	233,2
			inferior	80,7	50,7	8,9	10,6	120,8	137,7	26,5	44,7	236,9	243,6
	Jocketta	TAmb	superior	22,0	19,9	7,6	6,8	163,3	170,0	40,2	62,6	233,1	259,4
			inferior	28,0	24,3	8,9	7,6	217,5	199,3	46,3	80,0	300,7	311,2
		ET	superior	16,5	21,6	8,1	7,5	162,1	152,8	51,3	60,6	238,1	242,5
			inferior	18,0	22,4	6,6	7,9	138,4	179,7	55,8	75,7	218,7	285,7
DMS (doble interacción)				13,8	8,6	2,1	2,5	41,9	35,1	14,4	13,2	57,0	57,1
DMS (triple interacción)				19,6	12,1	3,0	3,6	59,4	49,7	20,4	18,7	80,8	81,0

DMS (cuadruple interacción)	28,0	17,3	4,3	5,1	84,8	71,0	29,1	26,8	115,4	115,7
Nivel de significancia										
Nivel hídrico (NH)	***	*	ns	ns	ns	ns	***	*	ns	ns
Genotipo (G)	***	***	***	***	*	ns	**	**	ns	ns
Nivel térmico (NT)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Estrato (E)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NH×G	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NH×NT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NH×E	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
G×NT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
G×E	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NT×E	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NH×G×NT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns, no significativo

***, **, * Significativo al $p \leq 0,001$, $0,01$ y $0,05$, respectivamente. Sólo se muestran las interacciones significativas.

4.6 Relaciones entre tocoferoles, peso de grano y aceite en el grano

A partir de los resultados de las tablas 2.5, 3.2, 3.3 y 3.5, se establecieron asociaciones entre el peso de grano y los componentes químicos, a través del ajuste de regresiones lineales simples (Figura 3.5). De esta manera, se observó que la concentración total de tocoferoles fue explicada significativa y negativamente por el peso de grano ($R^2=0,30$; $p=0,0032$), indicando que la concentración de tocoferoles totales disminuyó ante incrementos del peso de grano (Figura 3.5 A). Por el contrario, la concentración de tocoferoles totales se incrementó ante aumentos de la concentración de aceite ($R^2=0,15$; $p=0,0441$) y disminuyó ante aumentos del contenido de aceite ($R^2=0,26$; $p=0,0056$), indicando una relación de tipo dilución con la cantidad de aceite por grano (Figura 3.5 B y C). Por último, a través de análisis de correlación de Pearson, se observó que las variaciones en las distintas isoformas de tocoferoles se asociaron con el peso de grano: alfa tocoferol ($r= 0,61^{**}$), beta tocoferol ($r= 0,76^{***}$), gamma tocoferol ($r= -0,51^{**}$) y delta tocoferol ($r= -0,41^*$), señalando que granos más pesados lograrían mayores concentraciones de alfa y beta tocoferol y menores concentraciones de gamma y delta tocoferol.

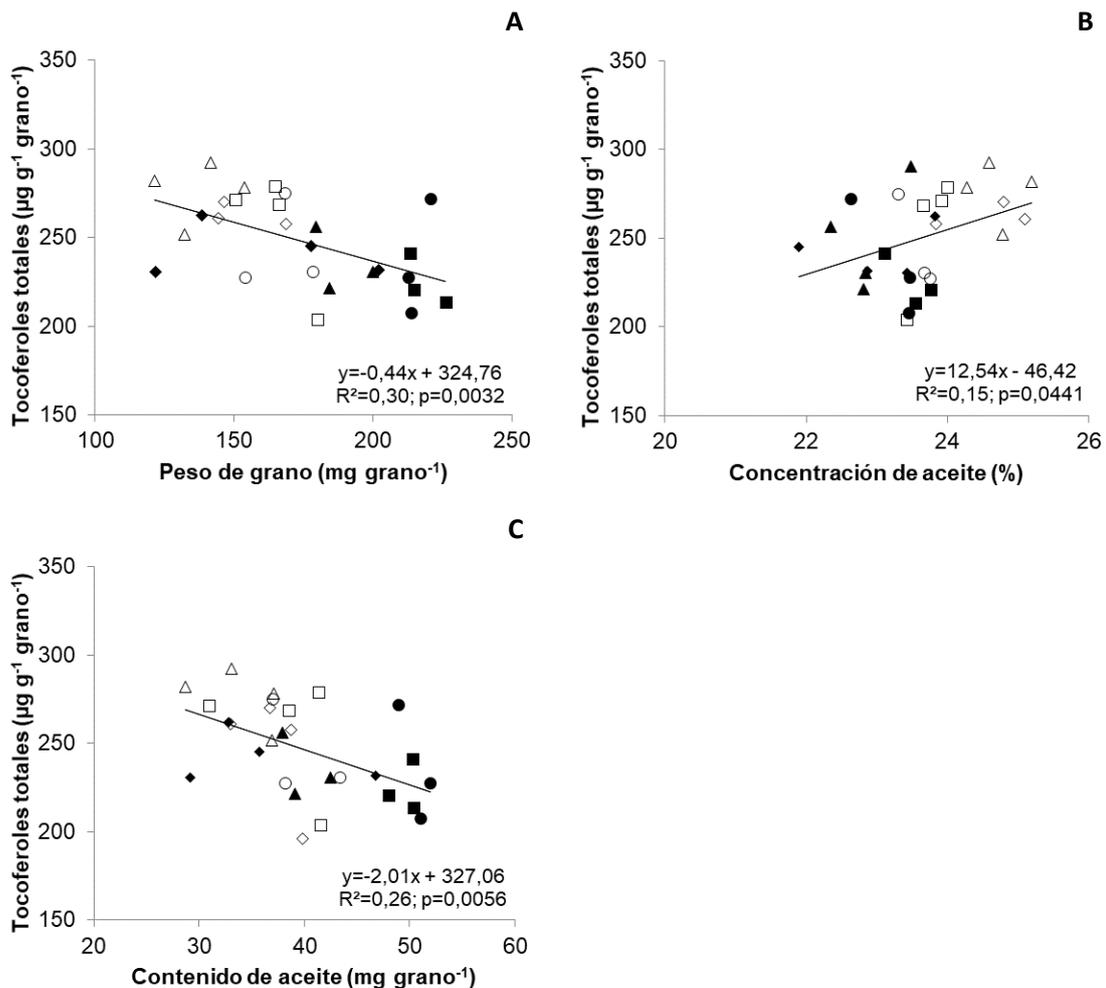


Figura 3.5. Relación de la concentración de tocoferoles totales con el peso de grano (A), la concentración de aceite (B) y el contenido de aceite (C) en granos de soja a través de genotipos (Alim5.09 y Jocketta) y de tratamientos, que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH en el experimento I y II. Los símbolos llenos representan a Alim5.09 y los símbolos vacíos a Jocketta. Las formas representan a los tratamientos: círculos (control), cuadrados (ET), triángulos (EH) y rombos (ET×EH).

5. Discusión

Los resultados de este capítulo evidenciaron que el contenido de los principales componentes del grano, es decir, la proteína, aceite y fracción residual disminuyeron ante condiciones de déficit hídrico durante el llenado de grano, coincidiendo con Dornbos y Mullen (1992) y Rotundo y Westgate (2009). Contrario a nuestra hipótesis, no observamos efectos aditivos debido a la combinación del ET×EH sobre los componentes químicos del grano, siendo las reducciones en Pr, Ac y Res de magnitudes similares bajo EH solo o combinado con ET (Tabla 3.1). Dicho resultado estuvo en línea con lo observado en el PG_P (Tabla 2.3, Capítulo 2), variable para la cual se concluyó que EH, aplicado durante todo el llenado del grano, ejercería un efecto dominante sobre el ET, aplicado durante 15 días del llenado del grano. Al mismo tiempo, el EH y el ET×EH provocaron caídas de similares magnitudes en variables como la relación fuente destino (Tabla 2.4, Capítulo 2), afectando negativamente la acumulación de Pr, Ac y Res en el grano a través del suministro de asimilados (Tabla S1 del anexo). A través de los experimentos y tratamientos, se evidenció un marcado efecto genotípico, siendo el contenido de Pr, Ac y Res y concentración de Pr siempre mayor en Alim5.09 respecto a Jocketta, mientras que este último genotipo tuvo mayor concentración de Ac y Res respecto a Alim5.09 (Tabla 3.1). Este resultado destaca la importancia de la elección del genotipo como práctica de manejo, dado que aún en condiciones estresantes cada genotipo conservó su característica diferencial de composición química para la cual fueron seleccionados. Además, si bien las condiciones ambientales modulan el suministro de asimilados hacia el grano para la síntesis de los distintos componentes que determinan su calidad, las diferencias genéticas en su composición química están probablemente reguladas por el mismo grano (Hayati et al., 1996; Wyss et al., 1991). Por lo tanto, ambas fuentes de variación en la composición química del grano deben ser tenidas en cuenta.

En este estudio, el EH ya sea solo o combinado con el ET disminuyó levemente más al contenido de Pr respecto del resto de los componentes, provocando un ligero incremento en la concentración de Ac y/o Res (Tabla 3.1). Por el contrario, Rotundo y Westgate (2010) encontraron que el contenido de Ac y Res fueron más reducidos ante el déficit hídrico, aumentando así la concentración de Pr. La acumulación de Ac en el grano depende mayormente de la asimilación actual de carbono vía fotosíntesis y en menor medida de removilización de reservas (Yamagata et al., 1987). Por ello, ha sido propuesto que, si el estrés reduce la oferta de asimilados durante el llenado, la síntesis de Ac sería disminuida proporcionalmente más que la de Pr (Rotundo et al., 2009, 2011). Una posible explicación de las diferencias encontradas en nuestro trabajo respecto a Rotundo et al. (2009, 2011) podría ser que debido a que la acumulación de Pr comienza antes que la deposición de Ac (Yazdi-Samadi et al., 1977) un inicio temprano del estrés, como en nuestros experimentos, tendría un mayor impacto negativo en la Pr que uno tardío. Esta hipótesis se apoya en Rose (1988) y Carrera et al. (2009), quienes concluyeron que un EH temprano en el

período de llenado de grano redujo la concentración de Pr e incrementó la concentración de Ac. Por otro lado, la falta de respuesta del contenido de Pr, Ac y Res ante el ET regado, podría relacionarse a que tanto la producción de asimilados por parte de las hojas (Ergo et al., 2021), así como la capacidad intrínseca del grano para sintetizar y almacenar los componentes del grano (Tabla 2.6 y 2.7, Capítulo 2) no fueron afectadas en las parcelas bajo ET regado.

Para avanzar en la comprensión de los cambios que se observaron en los componentes del grano debido a los tratamientos, determinamos la dinámica de acumulación del contenido de Pr, Ac y Res a través de la tasa y duración de acumulación. En general y teniendo en cuenta ambos experimentos, los contenidos de Pr, Ac y Res se asociaron principalmente con la TA (a excepción del aceite en el Exp I) y las relaciones más robustas se alcanzaron entre el contenido de Pr y la TA de este componente (Figura 3.1 y 3.2). En general, las reducciones del contenido de Pr, Ac y Res en las parcelas estresadas hídricamente se asociaron a caídas en la TA de los mismos (Tabla 3.2 y 10). En coincidencia con lo observado por Rotundo y Westgate (2010), la TA y DA variaron en forma independiente. Más aún, en el Exp I, en las parcelas bajo déficit hídrico la reducción en el contenido de Pr se asoció a la reducción en la TA, mientras que la disminución en el contenido de Ac se asoció principalmente a un acortamiento en la DA (Tabla 3.2). Contrariamente a lo hipotetizado, la acumulación de Pr no se mantuvo ante condiciones de estrés, y su disminución estuvo asociada a una caída del 17% promedio de su TA a través de los experimentos. La TA de Pr y la TCG se asociaron positivamente (Tabla S1 del anexo). En este sentido, la TA de Pr, Ac y Res en las parcelas bajo déficit hídrico siguieron similar tendencia a lo observado para la TCG, es decir que disminuyeron. La TCG depende de los asimilados, principalmente sacarosa y aminoácidos suministrados por la planta madre; mientras que la proteína de almacenamiento y el aceite son sintetizados en el grano (Egli, 1998, 2017), sugiriendo una regulación de la TCG a nivel de planta y grano. La asociación positiva entre la TA de Pr, Ac y Res con el CMA y peso de la vaina (Tabla S1 del anexo) indicó que al igual que lo discutido en el capítulo 2, en parte la reducción de estas dos últimas variables bajo condiciones déficit hídrico restringieron la expansión celular durante la fase lineal del desarrollo del grano, generando así limitaciones en la capacidad intrínseca del grano para sintetizar y acumular los distintos componentes químicos. Por otro lado, a nivel de planta-cultivo, el déficit hídrico disminuyó significativamente la fuente de asimilados estimada a través del IAF al inicio del llenado (Tabla 2.4; Capítulo 2) y también la fotosíntesis durante el mismo periodo (Ergo et al., 2021), condicionando de esta forma la producción y el posterior suministro de asimilados hacia el grano en activo crecimiento.

Otro resultado interesante de este capítulo fue que independientemente de los experimentos, genotipos y aún en condiciones de estrés, se observó que los granos del estrato superior alcanzaron mayor concentración de Pr que los granos del estrato inferior (Tabla 3.2 y 3.3) coincidiendo con lo observado por Bennett et al. (2003), Collins y Cartter (1956) y Escalante y Wilcox (1993). Se

han indicado distintas razones por las cuales el ES alcanzaría mayor concentración de Pr. Algunos autores lo atribuyen a una mayor acumulación de la proteína de reserva en los nudos apicales respecto del de los basales (Bennett et al., 2003). Otros a una mayor actividad de la enzima nitrato reductasa (clave en la asimilación de nitrato) en los nudos superiores respecto a los inferiores (Bellaloui y Gillen, 2010). Tanto en los estudios mencionados como en los de Ghassemi-Golezani y Lotfi (2013) y Sharma et al. (2013) donde no se realizó la evaluación de la dinámica de acumulación, determinándose la calidad de granos a cosecha, pudo haber influido también el momento de cuajado de las vainas, determinando diferencias en el tamaño de grano que explicarían la variación de la concentración de Pr y Ac entre los distintos nudos. En nuestro trabajo se consideró el factor etario de las vainas, y se observaron diferencias en la composición del grano a través de los estratos de la planta. Estas diferencias observadas podrían responder a condiciones microclimáticas propias de cada estrato, es decir, luz y temperatura que se generan dentro del canopeo (Baldochi et al., 1983; Hiebsch et al., 1976). En este sentido, se ha encontrado una mayor interceptación de la radiación solar y mayor temperatura en la parte superior del canopeo respecto del inferior (Liu y Song, 2012; Schwerz et al., 2019) lo cual promovería una mayor tasa de asimilación de carbono y síntesis de los principales componentes del grano. Nuestros resultados del Exp I, donde encontramos mayor contenido de Pr, Ac y Res en los granos del estrato superior vs. el estrato inferior podrían relacionarse con ello. Para poder corroborar esta hipótesis sería necesario avanzar en la medición de la interceptación de la luz solar y la temperatura en distintas posiciones del canopeo.

Un aspecto clave en la calidad del grano, es la composición del aceite, dado que por ejemplo la proporción de ácidos grasos insaturados determinan la estabilidad oxidativa del aceite con fines industriales, mientras que los tocoferoles con propiedades antioxidantes le otorgan valor nutracéutico para los humanos. A través de los experimentos y genotipos encontramos que el EH individual o combinado con ET, incrementó la concentración del ácido oleico, disminuyendo la de los ácidos linoleico y linolénico respecto al control. De esta manera, la relación Ol/Ln se incrementó en las parcelas bajo déficit hídrico (Tabla 3.4). Esta respuesta coincidió con lo documentado por Bellaloui y Mengistu (2008) en condiciones de secano a campo y Gao et al. (2009) en ensayos de larga duración a campo con menor disponibilidad de precipitaciones. Se ha mencionado que el EH podría ejercer su efecto a través de un aumento interno de la temperatura de la planta incluyendo sus órganos (vainas y granos), afectando así a las enzimas oleato y linoleato desaturasa, que desaturan sucesivamente el Ol a Li y Ln, las que se conoce que disminuyen su actividad ante incrementos de temperatura (Cheesbrough, 1989; Tang et al., 2005). En este sentido, en las parcelas bajo déficit hídrico observamos aumentos de la temperatura del canopeo respecto a las parcelas regadas (Ergo et al., 2021) que apoyarían esta hipótesis, acompañado también de caídas de hasta el 50% en la fijación de carbono, suministro clave para

la síntesis de los ácidos grasos insaturados. Por otro lado, numerosos trabajos han encontrado que ante incrementos de la temperatura ambiental durante el llenado del grano, aumenta el ácido oleico, con disminuciones de ácido linoleico y linolénico (Carrera et al., 2011; Carrera y Dardanelli, 2017; Dornbos y Mullen, 1992; Oliva et al., 2006). Sin embargo, en nuestro estudio no se observaron cambios significativos en las proporciones de los distintos ácidos grasos en las parcelas bajo ET (Tabla 3.4), tal vez porque al estar bajo riego esto podría haber permitido la recuperación del cultivo una vez finalizados los tratamientos de incremento térmico. Esta respuesta va en línea con lo observado en la concentración del aceite que tampoco fue modificado en las parcelas mencionadas. Además, la falta de respuesta significativa tanto de las relaciones hídricas dentro del grano (CMA) (Tabla 2.6, capítulo 2), como de la fijación de carbono (tasa de fotosíntesis) y temperatura del canopeo en las parcelas regadas bajo ET (Ergo et al., 2021), podrían contribuir a explicar la ausencia de repuestas significativas en la síntesis de los distintos AG insaturados en estas parcelas.

Cuando se analizó la calidad del aceite en las distintas posiciones del canopeo se observó que, independientemente de los tratamientos de estrés, el ES presentó mayor concentración de ácido oleico (exceptuando al Exp II) y menor concentración de ácido linoleico y linolénico comparado con el EI (Tabla 3.4). Estos resultados coincidieron con lo observado por Bellaloui y Gillen (2010) en ensayos en invernadero y Moro Rosso et al. (2021) en experimentos a campo, pero sin limitantes hídricas. Anteriormente, Britz y Cavins (1993) encontraron que los granos de las posiciones superiores del canopeo tuvieron mayor concentración de oleico y menor de linoleico respecto a los granos de las posiciones inferiores de la planta. Estos autores atribuyeron las diferencias observadas al rol de la calidad de la luz en la síntesis de ácidos grasos, donde la actividad de la enzima citosólica omega-6-desaturasa, que cataliza la conversión del ácido oleico en ácido linoleico, aumentó en los granos desarrollados bajo luz azul reducida, condición que se da en los estratos inferiores del canopeo. Además, la cantidad de luz (radiación interceptada acumulada) también cambia entre estratos del canopeo y podría ejercer un rol sobre la composición de ácidos grasos. Por ejemplo, en girasol se observaron efectos aditivos de la temperatura nocturna y de la radiación interceptada sobre el contenido de ácido oleico (Echarte et al., 2012). Por otro lado, como se mencionó previamente, ambientes más cálidos favorecen la síntesis de ácido oleico, mientras que ambientes más fríos alcanzan mayores concentraciones de los ácidos linoleico y linolénico (Carrera et al., 2011). Dentro del canopeo, se ha mostrado una mayor temperatura (entre 1 y 3 °C) en los estratos superiores de la planta respecto de los inferiores tanto en soja (Baldocchi et al., 1983), como en maíz (Liu y Song, 2012). En este sentido, tanto la variación de la temperatura a través del canopeo, como así también la calidad y cantidad de la luz podrían ser factores que contribuyen a explicar las diferencias observadas en la síntesis de los distintos AG insaturados.

Respecto a la composición de tocoferoles en el aceite de soja, en general observamos que los distintas isoformas y los tocoferoles totales no variaron según la posición que ocuparon los granos dentro del canopeo. No obstante, si se registraron modificaciones debido a los tratamientos de estrés y al factor genotípico (Tabla 3.5). A través de los tratamientos y experimentos, el genotipo Alim5.09 presentó mayores concentraciones de alfa y beta tocoferol respecto a Jocketta, mientras que este último tuvo mayores concentraciones de gamma y delta tocoferol. Diversos estudios han observado diferencias genotípicas entre las distintas isoformas de tocoferoles (Almonor et al., 1998; Seguin et al., 2009; Yoshida et al., 1998). Mas aun, Seguin et al. (2009) en ensayos a campo y luego Carrera et al. (2021) en un analisis que consideró la combinacion de distintas condiciones de manejo, ambientes y genotipos observaron que los tocoferoles totales (concentración y/o contenido) se asociaron negativamente con el peso de grano y positivamente con la concentración de Ac. Estas asociaciones también fueron observadas en nuestro trabajo (Figura 3.5 A y B), mientras que la concentración de tocoferoles totales ($\mu\text{g g}^{-1}$ grano) aumentó ante reducciones del contenido de aceite (Figura 3.5 C), mostrando una respuesta de tipo dilución que coincide con lo documentado por González Belo et al. (2017), Izquierdo et al. (2011) y Nolasco et al. (2004). Sin embargo, es importante señalar que la dirección de esta relación podría depender de las unidades en las que estén expresados los tocoferoles totales, como lo muestran los trabajos de Carrera y Seguin (2016) y Carrera et al. (2021), quienes analizando los tocoferoles totales pero expresados en términos de contenido (mg grano^{-1}), encontraron que, a medida que aumentaba el peso de grano (mg grano^{-1}), los tocoferoles totales disminuían a una mayor tasa que la concentración de aceite (%), sin una relación significativa entre tocoferoles totales y el contenido de aceite. Los autores sugirieron que la falta de asociación entre los tocoferoles totales y el contenido de aceite podría relacionarse a efectos compensatorios de respuestas opuestas del contenido total de tocoferoles a la concentración de aceite (positiva) y al peso de grano (negativa), respectivamente. De manera interesante, la concentración de alfa y beta tocoferol se asociaron positivamente al peso de grano como lo muestran las correlaciones de Pearson. Dichas asociaciones permitirían explicar que el genotipo Alim5.09, de mayor peso de grano, alcance mayores concentraciones de alfa y beta tocoferol respecto a Jocketta. A partir de estos resultados, el peso de grano podría ser de gran utilidad como biomarcador sencillo de alta concentración de alfa tocoferol, útil para ser considerado en un plan de mejoramiento. Por otro lado, es conocido que las condiciones ambientales como la temperatura y la disponibilidad hídrica durante el llenado del grano también influyen la acumulación de tocoferoles pudiendo modificar su composición (Britz et al., 2008; Britz y Kremer, 2002; Carrera et al., 2011). Independientemente de los experimentos y genotipos, encontramos que en las parcelas regadas bajo ET no se modificaron significativamente las distintas isoformas de tocoferoles, incluyendo los tocoferoles totales. Contrariamente, el EH solo o combinado con ET aumentó la concentración de alfa tocoferol y disminuyó la concentración de delta tocoferol, sin cambios significativos en los tocoferoles totales (Tabla 3.5). Este último

resultado coincide con estudios previos de Britz y Kremer (2002), quienes observaron en experimentos bajo condiciones controladas que el EH (10-25% humedad del suelo) aplicado durante el llenado del grano provocó aumentos en la concentración de alfa tocoferol y reducciones de gamma y delta tocoferol, manteniendo relativamente constante la concentración de tocoferoles totales. En ensayos multiambientales en Brasil, Carrão-Panizzi y Erhan (2007) encontraron que si agrupaban localidades con precipitaciones similares durante el llenado del grano, pero sin considerar la temperatura media no lograban establecer una relación entre disponibilidad hídrica y la concentración de las distintas isoformas y el total de tocoferoles. Sin embargo, cuando consideraban localidades con temperatura media similares, pero diferentes precipitaciones (variación de ~4 veces) durante el llenado, observaban un gran aumento de la concentración de alfa tocoferol junto con reducciones gamma, delta y tocoferoles totales a medida que aumentaba la temperatura y disminuían las precipitaciones. En una revisión bibliográfica, Carrera y Seguin (2016) propusieron que el EH podría alterar el metabolismo de síntesis de los tocoferoles, mediante un aumento de la temperatura interna de las plantas, que modificaría la actividad de enzimas claves como la gamma tocoferol metiltransferasa (que metila tanto gamma tocoferol en alfa tocoferol como delta tocoferol en beta tocoferol) o los genes que la codifican (Sattler et al., 2004). En estudios sobre actividad enzimática, se determinó que la temperatura óptima para la actividad de la enzima gamma tocoferol metil transferasa fue de alrededor de 34 °C para pimiento (*Capsicum annuum*) y *Arabidopsis thaliana* (Koch et al., 2003) y ligeramente mayor, aproximadamente 40°C, para el alga verde (*Chlamydomonas reinhardtii*) (Gálvez-Valdivieso et al., 2011). Teniendo en cuenta esto y la hipótesis de Carrera y Seguin (2016), en nuestro trabajo observamos que el EH aumentó entre 3-4 °C la temperatura del canopeo respecto al control (30 °C), por lo que la actividad enzimática podría haberse visto alterada. Sin embargo, se necesitan más estudios para corroborar este efecto indirecto de la temperatura a través del EH, ya sea midiendo la actividad enzimática o a través del análisis de expresión génica de genes clave que codifican para la síntesis de cada uno de los tocoferoles, aspecto que se abordará en el capítulo 5.

6. Conclusiones

El estrés hídrico individual o combinado con estrés térmico durante el llenado modificó la composición química de los granos de soja, a diferencia del estrés térmico individual que, en general, no la modificó. El déficit hídrico redujo el contenido de proteína, aceite y fracción residual debido principalmente a una disminución en la tasa de acumulación, más que a la reducción de la duración de acumulación de estos compuestos. Además, la mayor reducción en el contenido de proteína respecto al contenido de aceite provocó aumentos en la concentración de este último, destacando la importancia de la interrelación entre los distintos componentes químicos del grano. La composición del aceite se modificó, aumentando la concentración del ácido oleico y disminuyendo la de los ácidos linoleico y linolénico. Asimismo, aumentó la

concentración de alfa tocoferol y disminuyó la de delta tocoferol, sin cambios significativos en los tocoferoles totales. Por otro lado, a pesar de que la composición química varió entre genotipos, éstos respondieron en la misma dirección ante las distintas condiciones de estrés, manteniendo las características para los cuales fueron mejorados (i.e., alta concentración de proteína en Alim5.09 y alta concentración de aceite en Jocketta), destacando así la importancia de la selección de variedades en el manejo agrícola. De manera interesante, encontramos variabilidad de la calidad química del grano a través del canopeo, exhibiendo el estrato superior una mayor concentración de proteína y menor concentración de fracción residual, ácido linoleico y linolénico comparado con el estrato inferior. Finalmente, en este capítulo proporcionamos información relevante acerca del impacto de los estreses hídrico y/o térmico sobre la calidad química del grano de soja, tanto a nivel de planta entera como a través de estratos dentro del canopeo. Sin embargo, para poder avanzar sobre la comprensión de mecanismos fisiológicos que modulan la acumulación de los componentes químicos del grano de soja es necesario indagar, el funcionamiento del cultivo como fuente de asimilados a través de un enfoque bioquímico-fisiológico, aspectos que serán abordados en el capítulo 4.

CAPÍTULO 4

ASOCIACIONES ENTRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GRANO Y VARIABLES ECOFISIOLÓGICAS RELACIONADAS A LA FUENTE DE CARBONO Y NITRÓGENO EN SOJA BAJO ESTRÉS TÉRMICO, ESTRÉS HÍDRICO Y SU INTERACCIÓN

1. Introducción

El rendimiento potencial de los cultivos, desde el punto de vista fisiológico, es el producto de la transformación de la radiación solar en biomasa, mediante la fijación de dióxido de carbono a través de la fotosíntesis. Este proceso es afectado en gran medida por la calidad de luz (color o longitud de onda de la luz) estimada mediante la relación rojo-rojo-lejano; como así también por la cantidad de luz recibida por las plantas (Li et al., 2014; Yang et al., 2018). Durante la fijación del carbono se tienen en cuenta las eficiencias de captación (i.e. eficiencia de intercepción de la luz, eficiencia del uso de la radiación) y la posterior distribución de biomasa a los órganos reproductivos (índice de cosecha) (Gifford et al., 1984; Monteith, 1972; Sinclair y Wit, 1975). En condiciones de crecimiento no limitantes, se establece una relación lineal entre la acumulación de biomasa y la cantidad de radiación fotosintéticamente activa interceptada por el cultivo, permitiendo ajustar un modelo simple para la estimación de la producción potencial (Gosse et al., 1986; Monteith y Moss, 1977; Tardieu, 2013). La cantidad de radiación fotosintéticamente activa interceptada y acumulada por un cultivo depende de la duración del ciclo y de la dinámica de intercepción, fuertemente ligada a la evolución del índice de área foliar (Maddoni y Otegui, 1996).

En condiciones de campo, los cultivos están frecuentemente expuestos a condiciones de estrés abiótico (déficit hídrico, altas temperaturas, déficit nutricional, entre otros) que, dependiendo del momento dentro del ciclo ontogénico en el que ocurran, la intensidad y duración del mismo pueden afectar su productividad (Loomis y Connor, 1992). Particularmente, el estrés térmico por altas temperaturas y el déficit hídrico provocan cambios a nivel fisiológico, bioquímico y morfológico en las plantas (Barnabás et al., 2008; Mittler, 2006; Prasad et al., 2008; Turner et al., 2001; Wahid et al., 2007). Diversos estudios mostraron que el estrés hídrico y/o térmico durante el llenado de grano redujeron la fotosíntesis en cereales como trigo, arroz (*Oryza Sativa*) (Yang y Zhang, 2006) y cebada (*Hordeum vulgare*) (Samarah, 2005) y en soja (Egli y Bruening, 2004; Ergo et al., 2021). Estas disminuciones en la tasa fotosintética han sido relacionadas a modificaciones estructurales y ultraestructurales a nivel de cloroplastos en las hojas (Carrera et al., 2021) y a dos tipos de respuestas: estomáticas como la inhibición o disminución de conductancia estomática y transpiración foliar generando aumento de la temperatura del canopy (Ergo et al., 2021; Sehgal et al., 2017); como así también a respuestas no estomáticas evidenciadas por aumento del estrés oxidativo (Ergo et al., 2018; Inamullah e Isoda, 2005). Además, se ha

indicado que el estrés hídrico afecta la absorción de minerales (Gunes et al., 2006) y puede reducir la fijación de nitrógeno en soja (Serraj et al., 1999; Serraj, 2003). En conjunto, los efectos adversos mencionados pueden reducir la producción de asimilados (carbono y nitrógeno) y la removilización hacia los granos en formación (Leport et al., 2006) impactando negativamente en la producción (Carrera et al., 2021; De Souza et al., 1997; Ergo et al., 2018; Frederick et al., 1991) y calidad química de los granos (Britz y Kremer, 2002; Carrera et al., 2009, 2011; Dornbos y Mullen, 1992).

El llenado de grano es la etapa en la cual se produce la acumulación de biomasa en el grano, procesos de movilización de reservas y la síntesis de proteína, aceite (compuesto principalmente por ácidos grasos y en menor medida por tocoferoles) y carbohidratos (Bewley et al., 2013; Gallardo et al., 2008; Wilson, 2004). En el capítulo 3 de esta tesis se cuantificó y detalló el impacto del estrés térmico e hídrico y su interacción durante la etapa de llenado en los mencionados componentes de calidad química del grano. Sin embargo, mediante la implementación de técnicas multivariadas, como el análisis de componentes principales y regresiones lineales simples y/o múltiples se podrían identificar parámetros dentro de las variables ecofisiológicas que contribuyan a explicar los cambios de calidad química en los genotipos evaluados frente a las condiciones estresantes. Este tipo de abordaje ha sido utilizado previamente en distintos estudios, incluyendo los de nuestro equipo de trabajo (Ergo et al., 2018; Carrera et al., 2021; Carrera et al., 2015). Por otro lado, Rotundo et al. (2009) evaluaron genotipos de soja contrastantes en concentración de proteína y encontraron una relación positiva entre el área foliar y el contenido de proteína, observando un alto contenido de proteína en los granos a valores más altos del índice de área foliar. Por otro lado, Izquierdo et al. (2009) modificaron la radiación solar interceptada durante el llenado de granos mediante sombreado y raleo de plantas en cultivos de maíz, girasol y soja. Dichos autores hallaron que independientemente de la especie, el porcentaje de ácido oleico aumentó al incrementarse la radiación solar interceptada por planta. Más recientemente, en un estudio con diferentes niveles de defoliación durante el llenado de grano en soja, Carrera et al. (2022) encontraron que la radiación fotosintéticamente activa interceptada durante el llenado de grano se correlacionó fuerte y positivamente con el rendimiento, número y peso de granos y el contenido de proteína y aceite y la relación oleico linolénico. Teniendo en cuenta los antecedentes indicados, proponemos avanzar sobre mecanismos fisiológicos que puedan estar involucrados en la definición de la calidad química del grano de soja bajo los estreses abióticos evaluados en nuestro estudio.

2. Objetivo

En genotipos de soja con concentración diferencial de proteína en grano sometidos a breves intervalos de altas temperaturas, déficit hídrico y su interacción durante el llenado se propone:

establecer asociaciones entre la composición química del grano y variables ecofisiológicas relacionadas a la fuente de carbono y nitrógeno.

3. Materiales y métodos

3.1 Determinación de variables ecofisiológicas

Radiación fotosintéticamente activa interceptada acumulada durante el llenado de grano

La radiación global diaria incidente se registró a partir de la estación meteorológica de la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Manfredi (31°49'S, 63°46'O Córdoba, Argentina). Los valores registrados de dicha variable se multiplicaron por el coeficiente 0,48 (el cual comprende las longitudes de onda del espectro visible aprovechable por las plantas) para obtener la radiación fotosintéticamente activa (Pinker y Laszlo, 1992). La interceptación solar se midió en cada parcela con un sensor cuántico lineal de 1 m de longitud (Cavadevices, Buenos Aires, Argentina). Se tomaron cinco mediciones por parcela ubicando la barra de manera oblicua entre dos surcos centrales. La proporción de radiación fotosintéticamente activa interceptada por el cultivo (RFAI, MJ m⁻²) se determinó como: $1 - R_d/R_e$, donde R_d es la radiación medida por debajo del canopeo verde y R_e es la radiación medida por encima del canopeo (Gallo y Daughtry, 1986). La radiación por debajo y por encima del canopeo se midieron con una frecuencia semanal, entre las 12:00 y las 14:00 hs en días completamente despejados y vientos menores a los 5 km h⁻¹. La proporción diaria de radiación fotosintéticamente activa interceptada entre dos mediciones se calculó por interpolación lineal. Finalmente, la radiación fotosintéticamente activa interceptada acumulada durante el llenado de grano (RFAI_{R5-R7}) se calculó sumando los valores de radiación solar interceptada diaria desde el inicio de llenado de grano (R5) hasta la madurez fisiológica (R7) según la escala propuesta por Fehr y Caviness (1977).

Índice de cosecha

El índice de cosecha (IC) se estimó como el cociente entre el rendimiento en grano (g m⁻²) y la biomasa aérea total (g m⁻²) incluyendo tallos, vainas y granos al final del ciclo del cultivo. Ambas variables se obtuvieron según lo detallado en la sección materiales y métodos del capítulo 2.

Valor SPAD

El valor SPAD se determinó mediante el aparato Minolta SPAD-502 (SPAD-502; Minolta Camera Co., Osaka, Japan) que evalúa cuantitativamente la intensidad del verde de la hoja entre las longitudes de onda 650 y 940 nm, de esta forma es un estimador indirecto de la concentración de clorofila. Las mediciones se tomaron en tres momentos durante el llenado de grano a partir del estadio R5.5, en el Exp I se correspondieron con los días 12, 18, 32 mientras que para el Exp II

fueron los días 5, 19 y 32. Las lecturas del valor SPAD se realizaron en el folíolo central de la tercera hoja trifoliada desde el ápice, en seis plantas seleccionadas al azar de los surcos centrales dentro de cada parcela.

Relación rojo-rojo-lejano

En el Exp II, se realizaron mediciones relacionadas a la calidad de la luz, para ellos se cuantificó la relación rojo-rojo-lejano (R/RL) utilizando un sensor Skye SKR 110 Red/Far Red (Skye Instruments Ltd, Llandrindod Wells, Reino Unido). Se tomaron cuatro mediciones por parcela en dos posiciones: entre e intra-surcos, en cuatro momentos durante el llenado de grano: 7, 19, 28 y 33 días desde el estadio de R5.5. El sensor se posicionó horizontalmente a 10 cm por encima del canopeo y en el estrato superior de las plantas de manera similar a lo descrito en Bianculli et al. (2016). Dicha medición, al igual que la interceptación de radiación solar, se realizó entre las 12:00 y 14:00 hs en días soleados y vientos menores a los 5 km h⁻¹.

Fotosíntesis

La tasa fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) se midió utilizando un analizador portátil Licor 6400XT (Li-Cor Inc., Lincoln, USA). Las determinaciones se realizaron en tres plantas seleccionadas al azar por parcela, en tres momentos en el Exp I y cuatro momentos en el Exp II durante el llenado de granos a partir del estadio de R5.5. Para el primer experimento las mediciones se realizaron durante los días 12, 18, 32 mientras que, para el Exp II las mediciones se realizaron durante los días 5, 8, 19 y 32. Dichas mediciones se tomaron en el folíolo central de la tercera hoja trifoliada desde el ápice, entre las 12:00 y 14:00 hs en días soleados y vientos menores a los 5 km h⁻¹.

Concentración de carbono y nitrógeno en hojas y tallos

En el Exp I, la concentración de carbono (C) y nitrógeno (N) en hojas y tallos se determinaron utilizando un analizador elemental Perkin Elmer 2400 Serie II (PerkinElmer, Inc., EEUU). Luego, se calculó el contenido de C en hoja (C_{hoja}), N en hoja (N_{hoja}), C en tallo (C_{tallo}) y N en tallo (N_{tallo}), expresados como base seca (mg de C o N mg hoja o tallo seco⁻¹). Para ello, a los 32 días desde R5.5 se colectaron tres hojas al azar del tercer nudo desde el ápice, correspondiente a tres plantas ubicadas en los surcos centrales de cada parcela. También, en el estadio de R8 se recolectaron tres tallos seleccionados al azar ubicados en los surcos centrales de cada parcela. Las muestras de hojas y tallos se secaron a 60 °C durante 72 horas siguiendo el protocolo propuesto por Zhang et al. (2020). A partir de los valores de C y N obtenidos, se calculó la relación entre los mismos como el cociente entre C_{hoja} y N_{hoja} (C/N_{hoja}) y C_{tallo} y N_{tallo} (C/N_{tallo}).

Temperatura del canopeo

La temperatura del canopeo (°C) se midió utilizando un termómetro infrarrojo (Testo 845, Barcelona, España) manteniéndolo en un ángulo menor a 45° respecto a la horizontal sobre el canopeo abarcando distintas áreas de la parcela para integrar la mayor cantidad de hojas. Se realizaron cinco mediciones por parcela en tres y cuatro momentos durante el llenado de grano a partir del estadio de R5.5 en el Exp I y Exp II, respectivamente. Para el primer experimento fueron los días 12, 18, 32 mientras que para el Exp II fueron los días 5, 8, 19 y 32. Las mediciones se tomaron entre las 12:00 y 14:00 hs en día soleados y vientos menores a los 5 km h-1.

Es importante destacar que en las variables en las que se realizaron mediciones en más de un momento durante el llenado de grano (SPAD, temperatura del canopeo, relación rojo rojo-lejano y fotosíntesis), solo se consideraron para el análisis estadístico el día 18 para el Exp I y el día 19 para el Exp II desde el estadio de R5.5. Ambos días corresponden a 3 o 4 días luego de finalizado el ET (i.e., post ET) y corresponden a la misma fase fenológica (la que involucra al llenado de grano temprano) El momento mencionado fue en el que se registraron las mayores diferencias entre los tratamientos de estrés en las variables observadas en trabajos previos realizados por nuestro equipo de trabajo en la misma estación experimental, usando la misma aproximación metodológica y validada ante la comunidad científica (Carrera et al., 2021; Ergo et al., 2018).

3.2 Análisis estadístico

En ambos experimentos los datos se analizaron estadísticamente utilizando el modelo trifactorial en parcelas sub-sub divididas con dos repeticiones para determinar las diferencias entre los tratamientos. Las medias se compararon con una prueba de mínima diferencia significativa (DMS) utilizando un nivel de probabilidad de 0,05 (Di Rienzo et al., 2014).

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para cada experimento con el objetivo de establecer asociaciones entre la composición química del grano de soja y variables eco-fisiológicas relacionadas a la fuente de carbono y nitrógeno teniendo en cuenta los tratamientos control, ET, EH y ET×EH. El ACP es un método de análisis multivariado que permite reducir la dimensión de un conjunto de datos, aumentando su interpretación y minimizando al mismo tiempo la pérdida de información (Jolliffe y Cadima, 2016). A partir del ACP se obtuvo una representación gráfica denominada biplot (Gabriel, 1971), teniendo en cuenta los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2). Para avanzar en el análisis, a partir de ambos biplots, se seleccionaron variables ecofisiológicas (variables predictoras o independientes) que permitieran explicar los cambios de distintos componentes químicos del grano (variables respuestas) mediante modelos de regresión lineal simple y/o múltiple. El estadístico Cp de Mallows, los residuos parciales y coeficiente de determinación (R^2) fueron analizados para identificar los modelos de ajuste más apropiados. Para todos los análisis se utilizó el software Infostat versión 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

4. Resultados

4.1 Variables ecofisiológicas relacionadas a la fuente de carbono y nitrógeno en soja

En el Exp I, la $RFAI_{R5-R7}$ fue afectada significativamente por el nivel hídrico y el genotipo (Tabla 4.1). En las parcelas bajo déficit hídrico (EH y ET×EH), la $RFAI_{R5-R7}$ disminuyó un 43% respecto a las parcelas bajo riego (control y ET). Se observó también que, independientemente de los tratamientos, la $RFAI_{R5-R7}$ fue un 16% mayor en el genotipo Alim5.09 comparado con Jocketta. Respecto a la fotosíntesis, se observaron diferencias significativas debido las interacciones NH×NT y NH×G. En la primera interacción, las parcelas bajo déficit hídrico disminuyeron la fotosíntesis un 32%, mientras que en el tratamiento combinado (i.e., ET×EH) dicha disminución alcanzó el 47%, ambas comparadas con las parcelas regadas. En la interacción NH×G, las parcelas bajo déficit hídrico disminuyeron la fotosíntesis respecto a las parcelas regadas, dicha reducción fue del 33% en el genotipo Alim5.09, mientras que en Jocketta fue del 48%. La temperatura del canopeo fue afectada significativamente por el nivel hídrico, observándose aumentos de 4 °C en las hojas de plantas correspondientes a las parcelas bajo déficit hídrico (independientemente del nivel térmico) en comparación con las de las parcelas regadas (34 °C vs 30 °C, respectivamente). En el caso del valor SPAD, se observaron diferencias significativas por genotipo, nivel hídrico y la interacción NH×NT. El genotipo Alim5.09 presentó mayor valor SPAD (~4%) respecto a Jocketta a través de los tratamientos. Independientemente del genotipo, el valor SPAD disminuyó en promedio un 3% en los tratamientos de ET, EH y ET×EH respecto al control. La relación carbono nitrógeno en la hoja fue afectada significativamente por la interacción NH×G×NT. En el genotipo Alim5.09 se observaron aumentos en dicha relación del orden de 13, 51 y 71% para los tratamientos de ET, EH y ET×EH respectivamente. En el caso de Jocketta, se observaron aumentos del 17, 68 y 39% para ET, EH y ET×EH respectivamente. En ambos genotipos, el aumento en la relación C/N en hoja indicaría procesos de removilización de N desde dicho órgano hacia los granos en crecimiento. A diferencia de lo observado en la relación C/N en hoja, esta relación en tallo presentó disminuciones del 38% en las parcelas bajo déficit hídrico respecto a las parcelas regadas, indicando posiblemente un impedimento en la removilización de N desde los tallos. El índice de cosecha también fue afectado por el nivel hídrico, disminuyendo un 28% en las parcelas bajo déficit hídrico respecto de las parcelas regadas, indicando una menor partición de biomasa hacia los granos.

En el Exp II, tanto la cantidad (estimada a través de la $RFAI_{R5-R7}$) como la calidad de la luz (estimada a través de la relación rojo-rojo-lejano) fueron afectadas significativamente solo por el nivel hídrico (Tabla 4.1). La $RFAI_{R5-R7}$ disminuyó un 38% en las parcelas bajo déficit hídrico respecto a las parcelas regadas. Mientras que la relación rojo-rojo-lejano aumentó un 54% en las parcelas bajo déficit hídrico respecto a las parcelas regadas, implicando que más luz roja está

penetrando a través del canopeo, pudiendo ser aprovechada en estratos inferiores. La tasa fotosintética también fue afectada sólo por el nivel hídrico, exhibiendo las plantas de parcelas bajo déficit hídrico una reducción de la fotosíntesis del orden del 26% respecto a las plantas de parcelas regadas. La temperatura del canopeo fue afectada significativamente por el nivel hídrico y la interacción NH×G×NT. En Alim5.09, la temperatura del canopeo aumentó 2, 4 y 3 °C en los tratamientos de ET, EH y ET×EH respectivamente, comparado con el control (27,9 °C). En Jocketta, la temperatura del canopeo también se incrementó en 1 y 2 °C para el EH y ET×EH, mientras que para el ET disminuyó en 1 °C, con relación al control (28,9 °C). En general, la temperatura del canopeo aumentó ~3 °C en las parcelas bajo déficit hídrico (31,3 °C) respecto de las parcelas regadas (28,6 °C). En el SPAD se registraron diferencias significativas debido al genotipo, presentando Alim5.09 un 5% más de valor SPAD comparado con Jocketta. El índice de cosecha se redujo significativamente un 13% sólo en las parcelas bajo déficit hídrico comparado con las parcelas bajo riego, indicando una menor partición y/o menor rendimiento tanto por caídas del NG como del PG.

Tabla 4.1. Variables ecofisiológicas relacionadas a la fuente de carbono y nitrógeno en soja: radiación fotosintéticamente activa interceptada acumulada durante el llenado de grano (RFAI_{R5-R7}), relación rojo rojo-lejano (R/L), fotosíntesis, temperatura del canopeo (TC), valor SPAD, relación carbono nitrógeno en hoja (C/N_{hoja}) y tallo (C/N_{tallo}) e índice de cosecha (IC) considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [T_{Amb}] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento (Exp) I y II.

Nivel hídrico	Genotipo	Nivel térmico	RFAI _{R5-R7}		R/L		Fotosíntesis		TC		Valor SPAD		C/N _{hoja}		C/N _{tallo}		IC	
			(MJ m ⁻²)				(μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)		(°C)					(mg C mg N ⁻¹)				
			Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II
Riego	Alim5.09	T _{Amb}	437,7	418,2	–	0,53	26,0	27,2	30,7	27,9	48,1	46,2	9,7	–	127,1	–	0,58	0,47
		ET	447,2	397,1	–	0,53	32,8	28,9	29,7	29,8	46,2	46,8	11,0	–	102,7	–	0,58	0,46
	Jocketta	T _{Amb}	368,1	388,4	–	0,60	33,8	26,8	29,6	28,9	45,7	45,2	10,4	–	97,0	–	0,60	0,51
		ET	383,6	387,1	–	0,56	34,7	31,6	29,2	27,8	45,0	45,6	12,2	–	118,7	–	0,56	0,47
EH	Alim5.09	T _{Amb}	256,6	248,7	–	0,86	24,6	22,0	33,6	31,6	45,7	47,2	14,7	–	67,6	–	0,44	0,43
		ET	235,3	252,0	–	0,85	21,5	23,9	34,1	31,3	46,4	44,4	16,7	–	63,5	–	0,45	0,38
	Jocketta	T _{Amb}	220,8	222,0	–	0,87	21,5	21,5	33,0	30,1	44,6	42,2	17,4	–	67,6	–	0,38	0,40
		ET	215,2	263,3	–	0,86	14,4	16,8	35,0	32,3	44,8	43,2	14,4	–	78,3	–	0,42	0,45
DMS doble interacción			36,7	120,2	–	0,25	6,0	4,2	2,1	1,1	1,0	3,0	1,6	–	47,0	–	0,12	0,07
DMS triple interacción			51,9	170,0	–	0,36	8,5	6,0	2,9	1,5	1,4	4,2	2,2	–	66,5	–	0,17	0,10
Nivel de significancia																		
Nivel hídrico (NH)			***	**	–	**	***	***	***	***	*	ns	***	–	*	–	**	*
Genotipo (G)			**	ns	–	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	–	ns	–	ns	ns
Nivel térmico (NT)			ns	ns	–	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	–	ns	–	ns	ns
NH×G			ns	ns	–	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	–	ns	–	ns	ns
NH×NT			ns	ns	–	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	–	ns	–	ns	ns
G×NT			ns	ns	–	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	–	ns	–	ns	ns
NH×G×NT			ns	ns	–	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	*	–	ns	–	ns	ns

ns, no significativo

***, **, * Significativo al p ≤ 0,001, 0,01 y 0,05, respectivamente.

4.2 Asociaciones entre variables ecofisiológicas y de calidad química del grano de soja

En el Exp I, las dos primeras componentes principales del ACP explicaron el 80,2% de la variabilidad total de los datos. El CP1 y el CP2 representaron el 56,5 y 23,7% de la variación total (Figura 4.1). A lo largo del CP1 (componente que explicó la mayor variabilidad) se diferenciaron los tratamientos según el nivel hídrico, es decir, las parcelas regadas (Control y ET) se ubicaron en el plano opuesto a las parcelas estresadas hídricamente (EH y ET×EH). El CP2 separó los genotipos Alim5.09 y Jocketta. Los vectores de contenido de proteína, aceite y fracción residual junto con la concentración de proteína y el peso de grano se orientaron hacia las parcelas regadas. Estas variables se asociaron positivamente con la relación fuente destino y el valor SPAD, ambas orientadas, hacia el genotipo Alim5.09. Los vectores del ácido linoleico y linolénico también se orientaron hacia las parcelas bajo riego y se asociaron negativamente con la relación carbono nitrógeno en hoja y positivamente con la RFAI_{R5-R7}, el índice de área foliar, el índice de cosecha, la relación carbono nitrógeno en tallo y la fotosíntesis. De forma interesante, el vector del delta tocoferol se direccionó hacia las parcelas regadas próximo al genotipo Jocketta. Además, delta tocoferol se asoció negativamente al vector de alfa tocoferol, que se orientó hacia el tratamiento de EH del genotipo Alim5.09. El vector de beta tocoferol se asoció positivamente al alfa tocoferol. El ácido oleico y la relación oleico linolénico se orientaron hacia las parcelas bajo déficit hídrico, particularmente cercanas al genotipo Alim5.09. Las últimas tres variables químicas mencionadas se asociaron positivamente con la temperatura del canopeo y la relación carbono nitrógeno en hoja, ambas orientadas hacia las parcelas bajo EH. Por último, se observó asociaciones positivas entre los vectores de concentración de aceite, fracción residual y concentración de gamma tocoferol y tocoferoles totales, todos ellos orientados hacia las parcelas bajo EH.

En el Exp II, las dos primeras componentes principales del ACP explicaron el 77,8% de la variabilidad total de los datos. El CP1 y el CP2 representaron el 47,7% y 30,1% de la variación total (Figura 4.2). La tendencia observada en el Exp I se mantuvo en el Exp II, dado que el CP1 separó los tratamientos según el nivel hídrico, es decir, las parcelas regadas (Control y ET) se ubicaron en el plano opuesto a las parcelas estresadas hídricamente (EH y ET×EH); mientras que, el CP2 separó al genotipo Alim5.09 de Jocketta. Coincidentemente con el Exp I, los vectores de contenido de proteína, aceite y fracción residual junto con la concentración de proteína y el peso de grano se orientaron hacia las parcelas regadas. Estas variables se asociaron positivamente con la relación fuente destino y el valor SPAD, ambas orientadas hacia las parcelas regadas y próximas al genotipo Alim5.09. En el Exp II, los vectores de alfa y beta tocoferol también se asociaron positivamente entre sí, y se mantuvo la asociación negativa entre alfa y beta tocoferol con gamma y delta tocoferol, estos dos últimos orientados hacia las parcelas bajo EH y más cercanos al genotipo Jocketta. Similarmente al Exp I, los ácidos linoleico y linolénico se asociaron

positivamente con la $RFAR_{R5-R7}$, el índice de área foliar, el índice de cosecha y la fotosíntesis. Todos estos vectores se orientaron hacia las parcelas bajo riego, hacia donde también se orientó la concentración de la fracción residual. La menor longitud del vector del total tocoferol respecto al resto de los vectores, indicó su escaso aporte a la determinación de las CPs. Finalmente, el ácido oleico y la relación oleico linolénico se asociaron positivamente con la temperatura del canopeo (al igual que en el Exp I) y con la relación rojo rojo-lejano; todos ellos orientados hacia las parcelas bajo EH y próximos al genotipo Alim5.09.

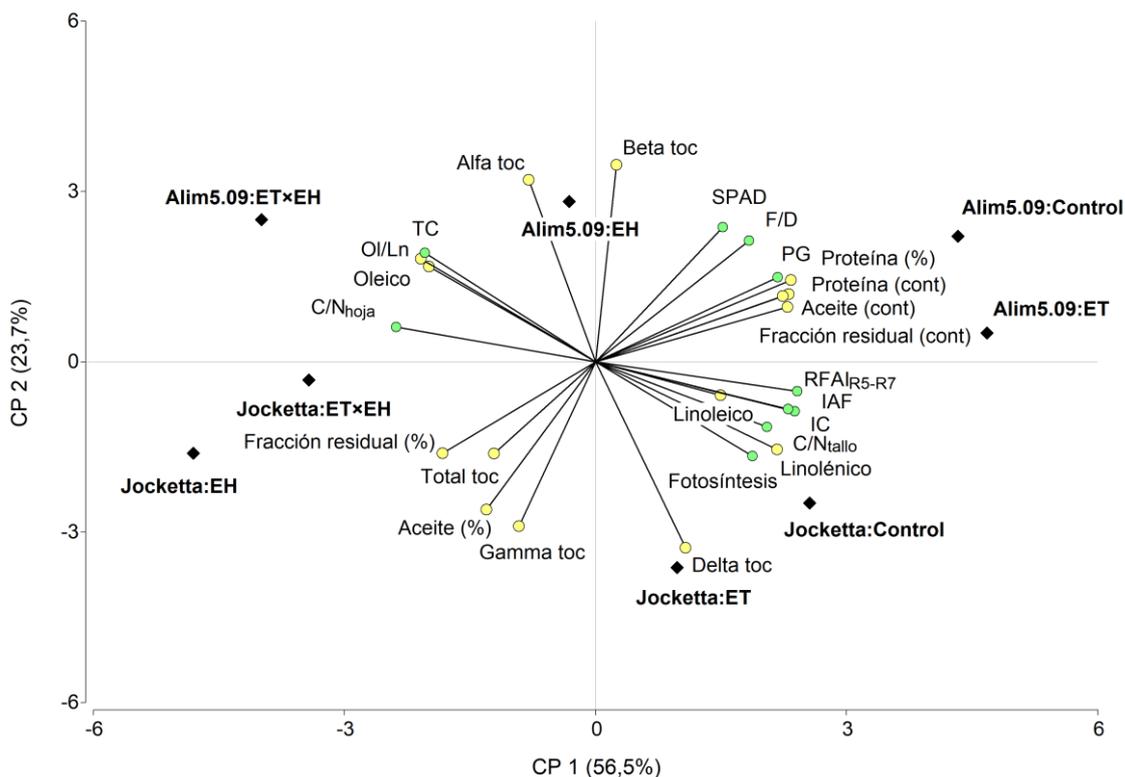


Figura 4.1. Biplot que muestra las relaciones entre variables ecofisiológicas (círculos verdes) y variables de composición química del grano de soja (círculos amarillos) a través de genotipos (Alim5.09 y Jocketta) y de tratamientos, que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH en el experimento I. Variables: Contenido de proteína (Proteína cont); contenido de aceite (Aceite cont); contenido de fracción residual (Fracción residual cont); concentración de proteína (Proteína %); concentración de aceite (Aceite %); concentración de fracción residual (Fracción residual %); ácido oleico (Ol); ácido linoleico (Li); ácido linolénico (Ln); relación ácido oleico linolénico (Ol/Ln); alfa tocoferol (Alfa toc); beta tocoferol (Beta toc); gamma tocoferol (Gamma toc); delta tocoferol (Delta toc); tocoferoles totales (Total toc); peso de grano (PG); valor SPAD (SPAD); relación fuente destino (F/D); radiación fotosintéticamente activa interceptada acumulada durante el llenado de grano ($RFAR_{R5-R7}$); índice de área foliar (IAF);

índice de cosecha (IC); relación carbono nitrógeno de tallo (C/N_{tallo}); relación carbono nitrógeno en hoja (C/N_{hoja}); temperatura del canopeo (TC). La relación F/D y el IAF fueron tomadas del capítulo 2.

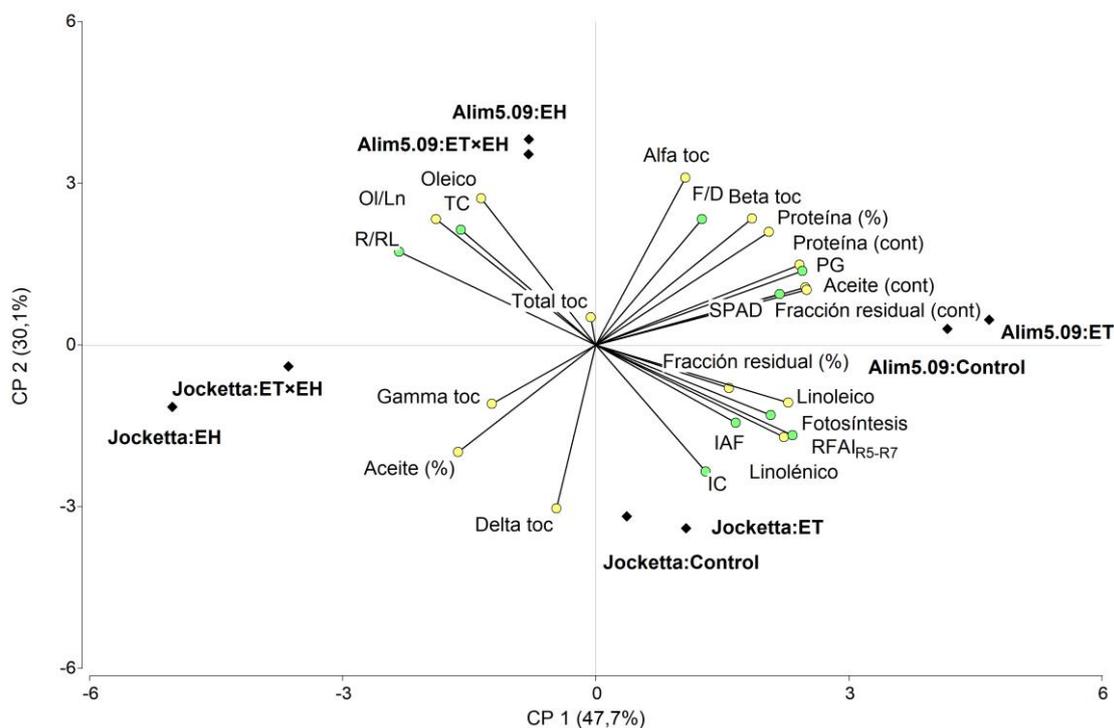


Figura 4.2. Biplot que muestra las relaciones entre variables ecofisiológicas (círculos verdes) y variables de composición química del grano de soja (círculos amarillos) a través de genotipos (Alim5.09 y Jocketta) y de tratamientos, que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ETxEH en el experimento II. Variables: Contenido de proteína (Proteína cont); contenido de aceite (Aceite cont); contenido de fracción residual (Fracción residual cont); concentración de proteína (Proteína %); concentración de aceite (Aceite %); concentración de fracción residual (Fracción residual %); ácido oleico (Ol); ácido linoleico (Li); ácido linolénico (Ln); relación ácido oleico linolénico (Ol/Ln); alfa tocoferol (Alfa toc); beta tocoferol (Beta toc); gamma tocoferol (Gamma toc); delta tocoferol (Delta toc); tocoferoles totales (Total toc); peso de grano (PG); valor SPAD (SPAD); relación fuente destino (F/D); radiación fotosintéticamente activa interceptada acumulada durante el llenado de grano (RFAI_{R5-R7}); índice de área foliar (IAF); índice de cosecha (IC); relación rojo rojo-lejano (R/RL) y temperatura del canopeo (TC). La relación F/D y el IAF fueron tomadas del capítulo 2.

Luego de realizar el análisis exploratorio de los datos mediante el análisis de componentes principales, se seleccionaron aquellas variables ecofisiológicas que mostraron fuertes asociaciones con cada uno de los componentes químicos del grano en ambos experimentos. Para ello, en una segunda etapa se ajustaron regresiones lineales simples o múltiples con el objetivo de modelar los distintos componentes químicos del grano de soja (contenido y concentración de proteína, contenido y concentración de aceite, concentración de ácido oleico, linoleico y linolénico; relación oleico linolénico; concentración de alfa, beta, gamma y delta tocoferoles y tocoferoles totales) en función de variables ecofisiológicas (Tabla 4.2). Las regresiones múltiples para el contenido de proteína y aceite, así como para la concentración de proteína y aceite incluyeron como variables explicatorias o regresoras a la $RFAI_{R5-R7}$ y la relación fuente destino. Antes de realizar el análisis de regresiones múltiples, se chequeo la correlación entre estas dos variables (i.e., F/D y la $RFAI_{R5-R7}$) y, se observó que no hubo correlación significativa entre ambas. Además, en cada una de las regresiones múltiples se tuvo en cuenta el factor de inflación de la varianza, que en todos los casos fue entre 1 y 1,7. Este factor analiza la magnitud de multicolinealidad entre las variables y para que sea considerada alta debería ser mayor a 10 (Kutner et al., 2005), lo cual no se dio en ningún caso.

A través de los tratamientos y genotipos, las regresiones para el contenido de proteína y de aceite indicaron en ambos casos que la $RFAI_{R5-R7}$ y la relación fuente destino presentaron una relación lineal, positiva, y significativa con estos componentes químicos, explicando dichos modelos el 65% de la variabilidad total. Ambas regresiones señalaron que aumentos en la $RFAI_{R5-R7}$ y de la relación fuente destino (lo que implica mayor cantidad de asimilados para el grano) promueven incrementos tanto del contenido de proteína como de aceite en el grano. La concentración de proteína también mostró una relación lineal, positiva, y significativa con la $RFAI_{R5-R7}$ y la relación fuente destino, aunque la $RFAI_{R5-R7}$ tuvo una contribución mayor respecto de la relación fuente destino en el modelo ajustado (C_p Mallows, Tabla 4.2). Respecto a la concentración de aceite, la $RFAI_{R5-R7}$ y la relación fuente destino también fueron variables significativas en el modelo ajustado ($R^2= 45\%$), aunque en este caso se relacionaron negativamente con la concentración de aceite.

En el caso de los ácidos grasos insaturados, i.e., oleico, linoleico y linolénico y las distintas isoformas de tocoferoles se ajustaron regresiones lineales simples (Figura 4.3 y 4.4). Las variaciones en el ácido oleico fueron explicadas significativa y positivamente por la temperatura del canopeo ($p < 0,0001$, Figura 4.3A). Este modelo explicó el 58% de la variabilidad del ácido oleico, y la pendiente de $0,37 \% \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ indicó un aumento de $\sim 0,37$ en la concentración de ácido oleico por cada grado centígrado de incremento en la temperatura del canopeo. El ácido linoleico se asoció significativa y negativamente con la temperatura del canopeo ($R^2= 0,22$; $p=0,0079$, Figura 4.3B). Similarmente, el ácido linolénico mostró una asociación significativa y negativa

con la temperatura del canopeo ($R^2= 0,72$; $p < 0,0001$, Figura 4.3C). La pendiente de $-0,20 \text{ \% } ^\circ\text{C}^{-1}$ indicó una disminución de $\sim 0,20$ en la concentración de ácido linolénico por cada grado centígrado de incremento en la temperatura del canopeo. La relación oleico linolénico, indicador de la calidad del aceite, se explicó significativa y positivamente por la temperatura del canopeo ($R^2= 0,69$; $p < 0,0001$, Figura 4.3D), indicando aumentos en dicha relación ante aumentos en la temperatura del canopeo. Otro predictor significativo para los ácidos grasos insaturados y la relación oleico linolénico fue la $\text{RFAI}_{\text{R5-R7}}$; sin embargo, el Cp Mallow's indicó que el efecto de la temperatura del canopeo fue mayor respecto de la $\text{RFAI}_{\text{R5-R7}}$ (datos no mostrados).

Respecto a las isoformas de tocoferoles, la variable regresora de mayor ajuste fue la temperatura del canopeo, aunque solo fue significativa para la concentración de gamma y delta tocoferol ($p= 0,0449$, Figura 4.4C y $p < 0,0001$, Figura 4.4D). La concentración de gamma y delta tocoferol mostraron una asociación significativa y negativa con la temperatura del canopeo, indicando una reducción de 3,5 y 5,25 $\mu\text{g g}^{-1}$ grano, respectivamente por cada grado centígrado de aumento en la temperatura del canopeo (Figura 4.4C y D). Si bien se observó que la concentración de alfa tocoferol se relacionó de manera positiva y beta tocoferol de manera negativa con la temperatura del canopeo, dichas relaciones no resultaron significativas ($p= 0,0837$ y $p= 0,9614$, respectivamente; Figura 4.4A y B). Finalmente, la concentración de tocoferoles totales, aunque se asoció de manera negativa con la temperatura del canopeo, dicha relación tampoco resultó significativa ($p= 0,05$, Figura 4.4E).

Tabla 4.2. Coeficientes de regresión lineal para contenido y concentración de proteína y aceite vs. radiación fotosintéticamente activa interceptada acumulada durante el llenado de grano ($\text{RFAI}_{\text{R5-R7}}$) y relación fuente destino (F/D) considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [TAmb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento I y II.

Variable dependiente	Variable explicatoria	Coeficiente			Cp Mallow's	R^2_{Aj}
		de regresión	Error estándar	p-valor		
Contenido de proteína (mg grano^{-1})	Constante	18,917	6,747	0,0091	0,65	
	$\text{RFAI}_{\text{R5-R7}}$	0,071	0,017	0,0002		
	F/D	1,608	0,354	0,0001		
Contenido de aceite (mg grano^{-1})	Constante	17,980	3,151	<0,0001	0,65	
	$\text{RFAI}_{\text{R5-R7}}$	0,035	0,008	0,0001		
	F/D	0,715	0,165	0,0002		
Concentración de proteína (%)	Constante	33,264	0,760	<0,0001	0,65	
	$\text{RFAI}_{\text{R5-R7}}$	0,010	0,002	0,0001		
	F/D	0,130	0,040	0,0028		
Concentración de aceite (%)	Constante	25,827	0,424	<0,0001	0,45	
	$\text{RFAI}_{\text{R5-R7}}$	-0,003	0,001	0,0046		
	F/D	-0,053	0,022	0,0216		

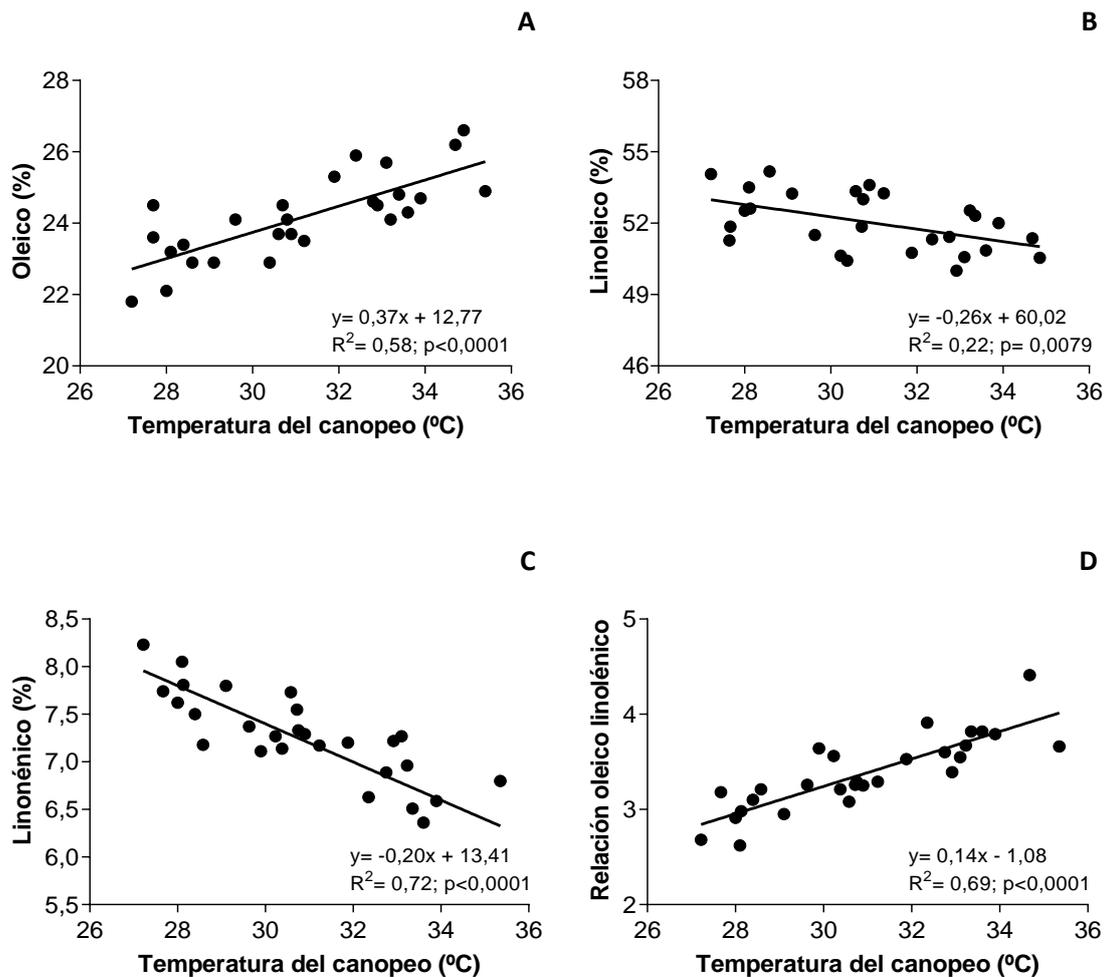


Figura 4.3. Relación de la temperatura del canopeo (°C) con la concentración de ácido oleico (A), ácido linoleico (B), ácido linolénico (C) (%) y relación oleico linolénico (D) en granos de soja a través de genotipos (Alim5.09 y Jocketta) y de tratamientos, que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH en el experimento I y II.

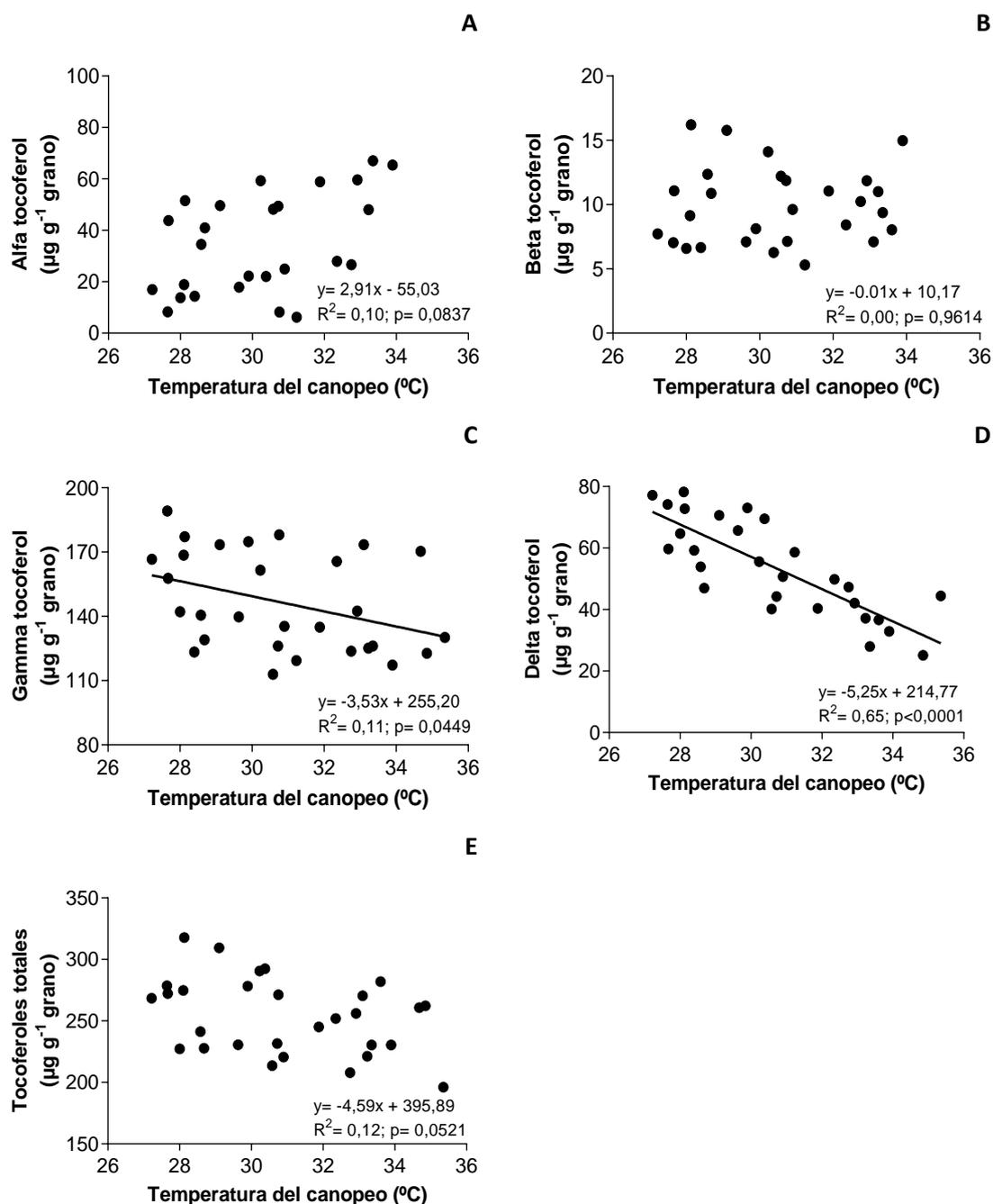


Figura 4.4. Relación de la temperatura del canopeo ($^{\circ}\text{C}$) con la concentración de alfa tocoferol (A), beta tocoferol (B), gamma tocoferol (C), delta tocoferol (D) y tocoferoles totales (E) ($\mu\text{g g}^{-1}$ grano) en granos de soja a través de genotipos (Alim5.09 y Jocketta) y de tratamientos, que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET \times EH en el experimento I y II.

5. Discusión

Diferentes estudios han avanzado sobre el entendimiento de la generación del rendimiento y la calidad química del grano ante diferentes escenarios productivos, explorando y estableciendo relaciones entre variables ambientales (como la temperatura del aire y régimen hídrico) y/o fisiológicas, que caracterizan a la fuente de asimilados y destinos, con la composición química del grano. En general, los trabajos que modificaron la fuente o destinos lo hicieron a través de tratamientos de sombreado, raleo, defoliación, desvainado de plantas a campo (Carrera et al., 2022; Izquierdo et al., 2009; Rotundo et al., 2009, 2011). Es menos conocido si las relaciones establecidas se mantienen o cambian bajo condiciones de ET, EH y ET×EH, aunque existen algunas evidencias en estudios de déficit hídrico (Carrera et al., 2009, 2011; Carrera y Dardanelli, 2017; Rotundo y Westgate, 2009), aumentos de temperatura (Carrera et al., 2009, 2011) y la interacción ET×EH (Carrera et al., 2015). En esta tesis, a través de técnicas de análisis que combinaron análisis de componentes principales, así como regresiones lineales simples y múltiples, encontramos que las variables explicativas más robustas para el contenido de proteína y aceite, así como la concentración de proteína y aceite fueron la $RFAI_{R5-R7}$ y la relación F/D (Tabla 4.1). Reducciones en la $RFAI_{R5-R7}$ y la relación F/D promovieron disminuciones lineales en el contenido de proteína, aceite y concentración de proteína, mientras que la concentración de aceite se incrementó levemente (Tabla 4.2). Estos resultados coincidieron parcialmente con lo observado por Carrera et al. (2022), quienes, encontraron que reducciones en la $RFAI_{R5-R7}$ redujeron el contenido de proteína y aceite. Los autores observaron que el contenido de aceite fue afectado más negativamente conduciendo a un incremento en la concentración de proteína y reducción en la concentración de aceite. Las diferencias observadas podrían estar relacionadas al tipo de tratamientos abordados entre ambos estudios dado que en Carrera et al. (2022), aplicaron tratamientos de defoliación durante el llenado de grano, mientras que en nuestros experimentos tratamientos de ET, EH y ET×EH, lo que genera respuestas muy diferentes en las plantas y luego en la calidad de los granos cosechados. No obstante, en nuestros experimentos el componente más afectado fue el contenido de proteína, lo cual habría resultado en un incremento de la concentración del aceite como se discutió en el capítulo 3.

Mediante el análisis de componentes principales, cuyos resultados se visualizan a través de gráficos biplots, observamos que el contenido de proteína, aceite y fracción residual, junto a la concentración de proteína estuvieron relacionados al genotipo Alim5.09 (Figura 4.1 y 4.2), el cual alcanzó un mayor peso de grano respecto a Jocketta, a través de ambos experimentos y tratamientos (excepto en el Exp I, donde Alim5.09 en la condición ET×EH alcanzó menor PG que Jocketta Tabla 2.3, capítulo 2). Además, los mencionados atributos químicos, se relacionaron positivamente con la relación F/D y el valor SPAD, estimador indirecto de clorofila y por ende del contenido de N foliar, de forma tal que a mayor valor SPAD mayor es el contenido de N foliar

(Figura 4.1 y 4.2). Observamos que el genotipo Alim5.09 alcanzó mayor valor SPAD y mayor relación F/D, presentando mayor contenido de N foliar y mayor cantidad de asimilados disponibles por grano en comparación con Jocketta a través de ambos experimentos y tratamientos (Tabla 4.1 y 2.4, capítulo 2). Estas características del genotipo Alim5.09 junto a la mayor tasa de removilización de N desde el tallo documentada en Ergo et al. (2021), podrían aumentar la disponibilidad de carbono y nitrógeno, esenciales para la síntesis de los distintos componentes químicos del grano permitiendo explicar el mayor contenido y concentración de Pr en grano. Además, podría justificar la ausencia de un adelantamiento de la senescencia y de un acortamiento de la duración del llenado de grano en las parcelas bajo riego observadas en este genotipo de alta Pr analizado en el mismo sistema experimental. Es interesante destacar que, aparte de los recursos provenientes de la planta madre, el grano también regula la síntesis de los distintos componentes químicos en su interior (Weber et al., 2005). En este sentido, la mayor tasa de acumulación de proteína, aceite y fracción residual exhibida por Alim5.09 respecto de Jocketta (Tabla 3.2 y 3.3, capítulo 3) indicaría una mayor actividad metabólica del grano, destacando así la importancia de considerar no solo la fuente de asimilados sino también, la capacidad intrínseca del grano para la síntesis de los diferentes componentes químicos.

Como se mencionó previamente, la cantidad de asimilados (principalmente carbono y nitrógeno) para la síntesis de los componentes químicos del grano resulta fundamental durante la etapa del llenado de grano. Las fuentes nitrogenadas para la síntesis de proteína en soja provienen de la absorción de nitrato del suelo, la fijación de nitrógeno atmosférico y la removilización del N acumulado en los tejidos vegetativos (Shibles et al., 1994). Esta última es la más predominante, dado que, entre el 50 y 100% del nitrógeno final del grano proviene de la redistribución a partir de las hojas (Zeihner et al., 1982). Por otro lado, la capacidad de utilización del nitrógeno por las plantas está íntimamente ligada a la disponibilidad de luz en relación a la actividad fotosintética (Johnson et al., 2010). Durante el proceso de fotoasimilación, se generan agentes reductores que reducen el nitrato a nitrito y, posteriormente, a amoníaco que será asimilado en forma de aminoácido. Este proceso es fundamental en las plantas y se ha indicado que, si se reduce la cantidad de luz que llega al canopeo, el proceso de fotoasimilación también se reduciría (Evans, 1989). En nuestro estudio observamos que condiciones de estrés hídrico individual o acompañado de estrés térmico durante el llenado de grano en soja afectaron la fuente fotosintética, lo cual se evidenció a través de reducciones tanto de la captura de $RFAI_{R5-R7}$ como de la funcionalidad de dicha fuente, debido a reducciones de la fotosíntesis (Tabla 4.1). La reducción en la $RFAI_{R5-R7}$ en las parcelas bajo déficit hídrico podría deberse a la disminución del índice de área foliar (Tabla 2.4, capítulo 2) y al acortamiento del periodo de llenado de grano inducido por la senescencia foliar anticipada (Ergo et al., 2021), lo cual también afectaría el periodo de fotosíntesis activa y, finalmente, la producción de asimilados. El valor SPAD también se redujo ante condiciones de

déficit hídrico en el Exp I y aunque no fue significativo en el Exp II, Ergo et al. (2021) detectaron la caída de este valor en una medición posterior en el llenado de grano. La disminución de esta variable indicaría menor contenido de N foliar y por lo tanto podría afectar la síntesis de proteína. Por otra parte, en las parcelas bajo déficit hídrico aumentó la relación C/N_{hoja} (indicando disminuciones de carbono y en mayor proporción de nitrógeno en las hojas) (Tabla 4.1), sugiriendo removilización de N desde las hojas. Sin embargo, la reducción de la relación C/N_{tallo} (lo cual implica leves aumentos de carbono y mayores incrementos de nitrógeno en el tallo) y el IC (indicando menor partición de asimilados hacia órganos reproductivos) (Tabla 4.1) sugirieron limitaciones en el proceso de removilización de reservas desde ese tejido y, por lo tanto, la disminución de la partición de asimilados hacia los granos en activo crecimiento. Esto podría afectar de manera irreversible la disponibilidad de los precursores necesarios para la síntesis de los distintos componentes químicos del grano, explicando, al menos en parte las reducciones observadas en el contenido de proteína (Tabla 3.1, capítulo 3). Teniendo en cuenta que la cantidad de asimilados (estimado como $RFAI_{R5-R7}$ e IAF), así como la removilización de reservas nitrogenadas son fundamentales para la síntesis de proteína en el grano, esto podría estar explicando la asociación positiva entre el contenido y concentración de proteína con la relación F/D que observamos en este estudio (Tabla 4.2).

Por otro lado, para la síntesis de aceite e hidratos de carbono la mayor parte del carbono, hasta el 77%, proviene de la fotosíntesis actual, mientras que el 23% restante proviene de la removilización de reservas (Yamagata et al., 1987). La sacarosa es la principal forma de transporte de carbono para los granos en crecimiento. Adicionalmente, la sacarosa puede almacenarse en forma de almidón en diferentes tejidos de la planta madre antes de su movilización (Huber et al., 1984). La fotosíntesis actual, así como la removilización de reservas y la capacidad intrínseca del grano para acumular biomasa pueden ser modificadas por condiciones de estrés hídrico (De Souza et al., 1997; Egli y Bruening, 2004), estrés térmico (Djanaguiraman et al., 2011; Prasad et al., 2008; Thomas et al., 2003) y/o interacción de ambos estreses (Ergo et al., 2018, 2021; Prasad et al., 2011, Carrera et al., 2022) pudiendo afectar tanto el peso de grano (Tabla 2.3, capítulo 2) como la composición química del grano de soja (Tabla 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5, capítulo 3). El índice de área foliar es un indicador del tamaño de la fuente fotosintética a nivel de cultivo, mientras que la fotosíntesis mide la tasa de fijación de CO_2 instantánea en la hoja. El IAF está íntimamente relacionado con la $RFAI_{R5-R7}$ (Maddonni y Otegui, 1996) y bajo condiciones de déficit hídrico estas variables, junto con la fotosíntesis se redujeron (Tabla 4.1), por lo que la producción de compuestos carbonados estaría limitada. Como se mencionó en el párrafo anterior, observamos que la removilización y la partición de asimilados hacia los granos estuvo condicionada y se evidenció a través reducciones en el IC en las parcelas bajo déficit hídrico. De forma tal que, la menor producción y movilización de compuestos carbonados bajo condiciones

de estrés hídrico impactaría negativamente en la síntesis de aceite y fracción residual (Tabla 3.1, capítulo 3). Considerando ambos procesos fisiológicos, se desprende que la cantidad de asimilados acumulados durante el llenado de grano (i.e. $RFAI_{R5-R7}$), así como la distribución de los mismos por grano (i.e. relación F/D) permitirían explicar la asociación positiva de estas variables con el contenido de aceite (Tabla 4.2). Otro aspecto interesante de destacar es que, en el capítulo 3, bajo condiciones de déficit hídrico el contenido de proteína fue levemente más afectado que el contenido de aceite, resultando en un ligero aumento en la concentración de este último componente (Tabla 3.1, capítulo 3). Esto en conjunto con la ampliamente documentada relación negativa entre la concentración de proteína y aceite (Hymowitz et al., 1972; Panthee et al., 2005; Wilcox y Cavins, 1995), contribuirían a comprender la asociación negativa entre la $RFAI_{R5-R7}$ y relación F/D con la concentración de aceite (Tabla 4.2).

Respecto a la composición del aceite, en el capítulo 3 se observaron cambios en los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico ante los distintos tratamientos (Tabla 3.4), derivando en la modificación de calidad final del aceite. Del análisis de componentes principales (Figuras 4.1 y 4.2) se desprende que la $RFAI_{R5-R7}$ y fotosíntesis se asociaron positivamente con los ácidos linoleico y linolénico y de manera negativa con el ácido oleico, indicando la fuerte dependencia de los ácidos grasos insaturados de la fuente generadora y asimiladora de carbono. En este sentido, en estudios de manipulación de la fuente de asimilados, que incluyeron tratamientos de defoliación en soja durante el llenado de grano (Carrera et al., 2022; Izquierdo et al., 2009) encontraron incrementos de la concentración del ácido oleico y reducciones de los ácidos linoleico y linolénico ante incrementos en la radiación solar interceptada. Willms et al. (1999) señaló que ante incrementos de la radiación aumentaría el suministro de carbono hacia los granos y la síntesis total de aceite, por lo que ha sido sugerido que ese carbono extra sería preferencialmente direccionado hacia la síntesis del ácido oleico por sobre la de los ácidos linoleico y linolénico (Carrera et al., 2022; Izquierdo et al., 2009). Por otro lado, es conocido también, que los ácidos grasos insaturados también responden a la temperatura (Carrera et al., 2011; Izquierdo et al., 2002; Rondanini et al., 2003), y en nuestros experimentos la temperatura interna de la planta, (cuantificada mediante la temperatura del canopeo) fue modificada en respuesta a los tratamientos de déficit hídrico (Tabla 4.1). El ácido oleico se desatura sucesivamente formando los ácidos linoleico y linolénico mediante las enzimas oleato y linoleato desaturasa. Ha sido documentado que la actividad de estas enzimas puede afectarse y disminuir ante incrementos de la temperatura en el rango comprendido entre los 30 y 35 °C (Cheesbrough, 1989; Tang et al., 2005). Como se discutió previamente en el capítulo 3, el aumento sostenido de la temperatura del canopeo durante el llenado de grano en las parcelas bajo déficit hídrico (30-35 °C; Tabla 4.1), habría limitado la capacidad de la planta de refrigerar, pudiendo afectar la actividad de las enzimas implicadas en la desaturación del ácido oleico, provocando una mayor acumulación del ácido oleico en detrimento

de los ácidos linoleico y linolénico, aumentando así la relación Ol/Ln (Tabla 3.4, capítulo 3). Esto contribuiría a explicar por qué la temperatura del canopeo se asoció de manera positiva con el ácido oleico y negativamente con los ácidos linoleico y linolénico (Figura 4.1 y 4.2). Estas asociaciones fueron confirmadas a través de regresiones lineales simples (Figura 4.3). Además de la temperatura, se ha señalado que la calidad de la luz (i.e., relación R/RL) también influye en la síntesis de los ácidos grasos insaturados (Britz y Cavins, 1993). Más aun, en ensayos en condiciones controladas donde se evaluó el rol de la calidad de luz sobre la síntesis de los ácidos grasos insaturados en soja, Holden et al. (1994) encontraron que reducciones en la relación R/RL condujeron a disminuciones de la concentración de ácido oleico en los granos y se relacionaron con incrementos en la actividad de la enzima citosólica omega-6-desaturasa, que cataliza la conversión del ácido oleico en ácido linoleico. Considerando este antecedente, es posible proponer que el aumento en la relación R/RL en las parcelas bajo condiciones de déficit hídrico en nuestro experimento (Tabla 4.1), promovería incrementos en la concentración de ácido oleico, derivando así en la asociación positiva entre la concentración de ácido oleico y la relación R/RL observada en el gráfico biplot (Figura 4.2). Finalmente, el aumento en la relación R/RL en las parcelas bajo déficit hídrico podría deberse a los movimientos paraheliotrópicos de las hojas de soja como documentó previamente Hirata et al. (1983) y más recientemente Carrera et al. (2021) en ensayos realizados con la misma aproximación experimental que esta tesis. Dicho movimiento permite mantener los folíolos de las hojas paralelos a los rayos solares y evitar el sobrecalentamiento de las mismas (Bielenberg et al., 2003), contribuyendo a mitigar los efectos adversos del déficit hídrico (disminuyendo la superficie evapotranspirante) y facilitando además el ingreso de luz solar a través del canopeo.

Con relación a las distintas isoformas de tocoferoles, se observó que la concentración de alfa y beta tocoferol se asociaron positivamente entre si y, negativamente con la concentración de gamma y delta tocoferol (Figura 4.1 y 4.2). La asociación negativa entre la concentración de alfa y delta tocoferol ha sido ampliamente documentada (Carrera et al., 2011; Frankel, 1989; Sattler et al., 2004; Seguin et al., 2009). Carrera et al. (2011) sugirieron que dicha relación podría reflejar la competencia por el 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinona, precursor común para la síntesis de alfa y delta tocoferol. Por otro lado, una de las principales funciones de los tocoferoles está asociada a su actividad antioxidante relacionada al mantenimiento de la integridad de las membranas celulares protegiendo los lípidos de éstas del estrés oxidativo (Foyer y Shigeoka, 2011; Munné-Bosch y Alegre, 2002). En un estudio paralelo, utilizando la misma aproximación de esta tesis, Ergo et al. (2021) encontraron que condiciones de déficit hídrico promovieron el cierre estomático, aumentos de la temperatura foliar y del estrés oxidativo. Estos eventos a nivel de planta podrían haber promovido el cambio en la composición de los tocoferoles en el aceite como respuesta al estrés. Coincidentemente a lo discutido en el capítulo 3, un EH durante el llenado de

grano, podría alterar el metabolismo de síntesis de los tocoferoles, mediante un aumento de la temperatura interna de las plantas (evidenciado en el aumento significativo de la temperatura del canopeo, Tabla 4.1), que podría modificar la actividad enzimática de la gamma tocoferol metil transferasa (enzima que interviene en la conversión de gamma a alfa tocoferol) y/o los genes que codifican dicha enzima (Carrera y Seguin, 2016), permitiendo una mayor síntesis de alfa tocoferol a partir de su precursor gamma tocoferol, y explicando así al menos en parte la asociación negativa con delta tocoferol y positiva con alfa tocoferol de la temperatura del canopeo (Figura 4.1 y 4.2). Reforzando esta hipótesis, las regresiones lineales simples, indicaron que los precursores de alfa y beta tocoferol, es decir gamma y delta tocoferol fueron explicados significativamente por la temperatura del canopeo. En este caso, aumentos de la temperatura del canopeo promovieron disminuciones lineales delta y gamma tocoferol (Figura 4.4C y D), confirmando lo observado en los biplots. No obstante, la regresión lineal entre la temperatura del canopeo y alfa tocoferol no fue significativa (Figura 4.4A). Esto podría deberse a que en el Exp I se generó una mayor respuesta y rango de alfa tocoferol bajo los tratamientos respecto al Exp II (87,9-5,6 g g⁻¹ grano vs 64,2-12,4 g g⁻¹ grano; Tabla 3.5, capítulo 3) y dado que en la regresión se incluyeron ambos experimentos, el efecto de la temperatura del canopeo se habría atenuado ($R^2= 0,34$; $p=0,0171$ para el Exp I y $R^2= 0,05$; $p=0,2194$ para el Exp II). A pesar de ello, se observó la tendencia de aumento en la concentración de alfa tocoferol ante el incremento de temperatura del canopeo (Figura 4.4A). Teniendo en cuenta estos resultados y el mecanismo por el cual la temperatura interna de la planta podría modificar la composición de tocoferoles, aún queda por dilucidar cómo son regulados estos componentes a nivel genético. Por lo que en el capítulo siguiente avanzaremos en el estudio de la regulación de la síntesis de los tocoferoles en distintos momentos del llenado de grano ante condiciones control y de ET, EH y ET×EH.

Es interesante destacar que el precursor inmediatamente anterior de alfa tocoferol es gamma tocoferol, y en la conversión de gamma a alfa tocoferol interviene la enzima gamma tocoferol metil transferasa (Van Eenennaam et al., 2003). Mediante estrategias de ingeniería genética, como la sobreexpresión de los genes que codifican para la enzima gamma tocoferol metil transferasa se ha logrado incrementar la concentración de alfa tocoferol disminuyendo la concentración de delta tocoferol en el grano (Chen et al., 2012; Shintani y DellaPenna, 1998; Vinutha et al., 2015). Por lo tanto, considerar la regulación de la actividad de esta enzima bajo condiciones de estrés abiótico también resultaría clave para comprender los cambios en la composición de tocoferoles en el grano en nuestro estudio.

6. Conclusiones

La respuesta de los componentes de calidad química del grano de soja bajo condiciones control, ET, EH y ET×EH fueron relacionadas con variables ecofisiológicas que caracterizaron a la fuente generadora de asimilados. La $RFAI_{R5-R7}$ y la relación F/D emergieron como las variables

explicativas más robustas del contenido de proteína y aceite como así también de la concentración de proteína y aceite del grano. Incrementos en la $RFAI_{R5-R7}$ y la relación F/D promovieron aumentos en el contenido de proteína, aceite y la concentración de proteína, disminuyendo la concentración de aceite. De esta manera, la intercepción de la radiación solar acumulada durante el llenado de grano, así como la distribución de los asimilados por grano permitieron explicar el impacto de los tratamientos de estrés y genotipos sobre los principales componentes industriales del grano de soja. Generalmente la composición del aceite de soja ha sido asociada a variables ambientales como la temperatura media del aire, régimen de precipitaciones como así también a la radiación acumulada por la planta durante el llenado de grano. Aquí hemos avanzado estableciendo como variable explicativa a la temperatura del canopeo, la cual además de ser indicador del estado hídrico de la planta, permitió explicar las variaciones de los ácidos grasos insaturados y los distintos tocoferoles. Incrementos de la temperatura del canopeo se relacionaron con aumentos de la concentración de ácido oleico y disminución del ácido linoleico y linolénico, aumentando así la relación OI/Ln. Así mismo, aumentos de la temperatura del canopeo promovieron incrementos de la concentración de alfa tocoferol y consecuentemente redujeron la concentración de delta y gamma tocoferol. A partir de estos resultados, se avanzará en el capítulo 5 sobre mecanismos que regulan la síntesis de las distintas isoformas de tocoferol teniendo en cuenta las variables explicativas aquí presentadas.

CAPÍTULO 5

EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA BIOSÍNTESIS DE TOCOFEROLES EN GRANOS DE SOJA EXPUESTA A ESTRÉS TÉRMICO Y DÉFICIT HÍDRICO DURANTE EL LLENADO

1. Introducción

El aceite de soja contiene compuestos menores denominados tocoferoles, cuya importancia radica en la estabilidad oxidativa que le confieren al aceite en las semillas, sumado al valor nutritivo que proporcionan a los granos debido a su actividad antioxidante como vitamina E en humanos y animales (Sattler et al., 2004; Sherwin, 1976). Se ha indicado que, en humanos, el consumo diario de dietas ricas en tocoferoles contribuye a la prevención del envejecimiento, enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Grusak et al., 1999; Shintani y DellaPenna, 1998; Stephens et al., 1996). Existen cuatro isoformas de tocoferoles: alfa tocoferol, beta tocoferol, gamma tocoferol y delta tocoferol, que se diferencian entre sí por el número y la ubicación de los grupos metilo (Figura 5.1). Estas isoformas se encuentran en distintas proporciones en los granos de soja, siendo las formas predominantes gamma (60-65%) y delta (20-26%) tocoferol, seguidos de alfa (4-10%) y beta (1-3%) tocoferol (Bramley et al., 2009; Carrão-Panizzi y Erhan, 2007; Van Eenennaam et al., 2003). En general, los tocoferoles representan el 1,5% en relación al aceite total, siendo relativamente más elevado que el de otros cultivos oleaginosos como el cártamo (*Carthamus tinctorius*) y el girasol (*Helianthus annuus*) que poseen en promedio 0,5% y 0,8%, respectivamente (Carpenter, 1979; Speek et al., 1985). Mientras que en soja la isoforma más abundante es el gamma tocoferol, en cártamo y girasol predomina el alfa tocoferol (alrededor del 80% del total tocoferol) (Hass et al., 2006; Hoppe y Krennrich, 2000; Velasco et al., 2005). Entre las distintas fracciones, el delta tocoferol se destaca por poseer la mayor actividad antioxidante *in vitro* (Jung y Min, 1990; Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996), mientras que alfa tocoferol lo hace por poseer la mayor actividad antioxidante *in vivo* (Fukuzawa et al., 1982, 1985; Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996) como vitamina E, debido a su retención preferencial por la proteína de transferencia del tocoferol en animales (Kono et al., 2013). Por ello, el alfa tocoferol ha recibido especial atención en distintos estudios con el objetivo de mejorar el valor nutritivo de los alimentos (Dolde et al., 1999; Grusak et al., 1999; Konda et al., 2020; Shintani y DellaPenna, 1998; Van Eenennaam et al., 2003).

La biosíntesis de los tocoferoles se produce en la envoltura de plástidos como cloroplastos y cromoplastos, mediante una combinación de dos precursores derivados de diferentes vías (Hunter y Cahoon, 2007) (Figura 5.2). Estos precursores son el ácido homogentísico (HGA), que proviene del p-hidroxi fenil piruvato (HPP), y el fitil difosfato (HPDP). El ácido homogentísico y el fitil difosfato son condensados por la homogentisato fitil transferasa (HPT), generando 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinona (MPBQ). El MPBQ se metila para convertirse en 2,3-dimetil-6-fetil-1,4-

benzoquinona (DMPBQ). Luego, la tocoferol ciclasa (TC) convierte el MPBQ y el DMPBQ en delta tocoferol y gamma tocoferol, respectivamente. El último paso de la ruta de biosíntesis de los tocoferoles es la metilación del delta tocoferol y del gamma tocoferol por la gamma tocoferol metiltransferasa (γ -TMT), que produce beta tocoferol y alfa tocoferol, respectivamente (Sattler et al., 2004; Shintani y DellaPenna, 1998). De esta manera, las enzimas MPBQ-MT y γ -TMT resultan claves en la determinación de la composición final de tocoferoles en los granos en general.

En la soja, la concentración final de tocoferoles y su composición varía de acuerdo a factores genotípicos, ambientales y la interacción entre estos factores (Carrera et al., 2011; Carrera y Seguin, 2016; Dolde et al., 1999; Seguin et al., 2010). En los últimos años se han llevado a cabo distintas manipulaciones genéticas para mejorar el valor de la vitamina E en granos, incluida la sobreexpresión de genes que codifican para enzimas limitantes en biosíntesis de tocoferoles (Shintani y DellaPenna, 1998; Van Eenennaam et al., 2003). En *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), las enzimas MPBQ-MT y γ -TMT están codificadas por los genes VTE3 y VTE4, respectivamente (Bergmüller et al., 2003; Van Eenennaam et al., 2003). La coexpresión de VTE3 y VTE4 en plantas transformadas de soja, aumentó la proporción alfa tocoferol hasta en un 90% y disminuyó las proporciones de delta y gamma tocoferol en los granos (Van Eenennaam et al., 2003). Se ha identificado que, en soja, la MPBQ-MT está codificada por los genes: Glyma.02G143700, Glyma.10G030600, Glyma.02G002000, Glyma.20G211500, y Glyma.10G178600 (Knizia et al., 2022) y la γ -TMT por Glyma.12G014200 (TMT1), Glyma.12G014300 (TMT2) y Glyma.09G222800 (TMT3), siendo las tres isoformas del gen TMT (Dwiyanti et al., 2011; Vinutha et al., 2015). De manera interesante, se ha observado una correlación positiva entre la acumulación de alfa tocoferol y la expresión del gen TMT (Dwiyanti et al., 2011; Dwiyanti et al., 2007). Además, se ha encontrado una mayor expresión de la isoforma TMT3 en granos de soja con alta concentración de alfa tocoferol, en condiciones potenciales de crecimiento (Dwiyanti et al., 2011; Vinutha et al., 2017). Sin embargo, según nuestro conocimiento, no existen aun trabajos que aborden la expresión de los genes mencionados en granos de soja de plantas expuestas a condiciones combinadas de estrés térmico e hídrico.

Por otro lado, ha sido ampliamente investigado el efecto de los factores ambientales en la determinación de los tocoferoles (Almonor et al., 1998; Carrão-Panizzi y Erhan, 2007; Carrera et al., 2011; Seguin et al., 2010). Por ejemplo, aumentos de temperatura media de 21 °C a 29 °C durante el llenado de grano incrementaron la concentración de alfa tocoferol y disminuyeron la concentración de delta tocoferol (Britz y Kremer 2002; Chennupati et al., 2011). En condiciones de déficit hídrico, Britz y Kremer (2002) observaron aumentos de la concentración de alfa tocoferol con disminuciones de delta y gamma tocoferol, sin cambios significativos en la concentración total de tocoferoles. Los resultados del capítulo 3 referidos a los tocoferoles

mayoritariamente han coincidido con los resultados observados en los mencionados trabajos, dado que aumentos de la concentración de alfa tocoferol estuvieron acompañados de disminuciones de la concentración de delta tocoferol, sin modificaciones significativas en la concentración total de tocoferoles en las parcelas bajo déficit hídrico. Estos cambios observados fueron explicados, al menos en parte por modificaciones de la temperatura del canopeo, a través de regresiones lineales en el capítulo 4. Tanto la temperatura del canopeo como el contenido relativo de agua en hojas han sido utilizadas en numerosos estudios para caracterizar el estado hídrico de las plantas a nivel de cultivos (Carrera et al., 2015; Jackson et al., 1981; Prasad et al., 2011; Schonfeld et al., 1988). Se ha documentado también que, disminuciones progresivas del contenido relativo de agua (Djanaguiraman et al., 2011; Lawlor, 1995; Prasad et al., 2011; Ritchie et al., 1990) e incrementos de la temperatura del canopeo (Carrera et al., 2015; Jackson et al., 1981; Prasad et al., 2011; Schonfeld et al., 1988) a causa de estrés térmico y/o hídrico reducen la tasa de fotosíntesis. Este proceso es fundamental en el metabolismo de las plantas debido a su aporte de reservas carbonadas para la síntesis de aceite en el grano y por ende de los tocoferoles que lo conforman. Por lo tanto, consideramos que la inclusión de estas variables fisiológicas en nuestro trabajo podría aportar al entendimiento de la biosíntesis de tocoferoles en granos de plantas expuestas a los mencionados estreses abióticos.

Los antecedentes sobre la composición de los tocoferoles provienen principalmente de granos cosechados a madurez (Britz et al., 2008; Britz y Kremer, 2002; Carrão-Panizzi y Erhan, 2007; Carrera et al., 2011; Carrera et al., 2014b), mientras que la información sobre la biosíntesis de tocoferoles en granos inmaduros es muy limitada. En experimentos en condiciones controladas, Almonor et al. (1998) encontraron que la acumulación de tocoferoles totales era paralela a la acumulación de aceite durante el crecimiento del grano de soja. Adicionalmente, en un ensayo a campo en condiciones potenciales, Kumar et al. (2009) observaron que la proporción relativa de las distintas isoformas de tocoferoles cambiaba con el crecimiento del grano. Este estudio destacó que delta tocoferol fue la isoforma predominante en el estadio fenológico R5, mientras que en los siguientes estadios fenológicos y hasta la madurez fisiológica gamma tocoferol fue la isoforma que contribuyó en mayor proporción a los tocoferoles totales. Si este patrón de acumulación de tocoferoles se mantiene o cambia bajo condiciones de estrés abiótico resulta aún desconocido. Más aun, el estudio a nivel genético de los mecanismos de biosíntesis y acumulación de los tocoferoles y cómo son regulados bajo condiciones de estrés térmico e hídrico y su interacción es menos conocido. Por lo tanto, proponemos investigar el impacto de los estreses en la expresión génica de enzimas claves limitantes vinculadas a la biosíntesis de tocoferoles, considerando también variables fisiológicas relacionadas al funcionamiento de las plantas.

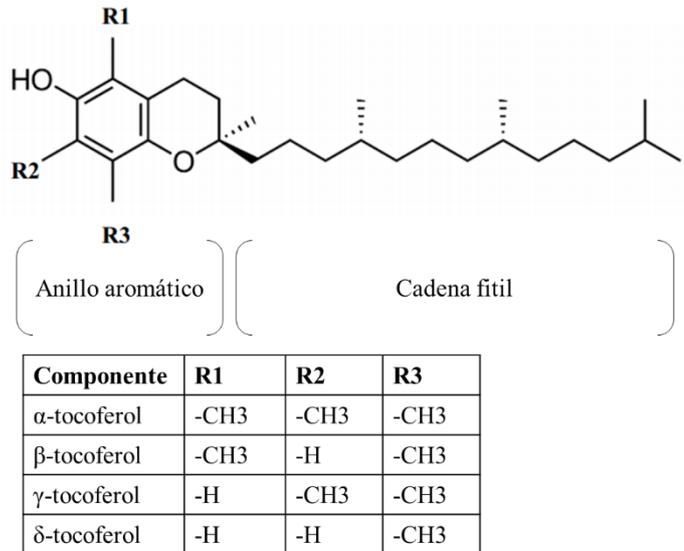


Figura 5.1. Estructura molecular de las 4 isoformas de tocoferoles presentes en soja, adaptado de (Wang, 2008).

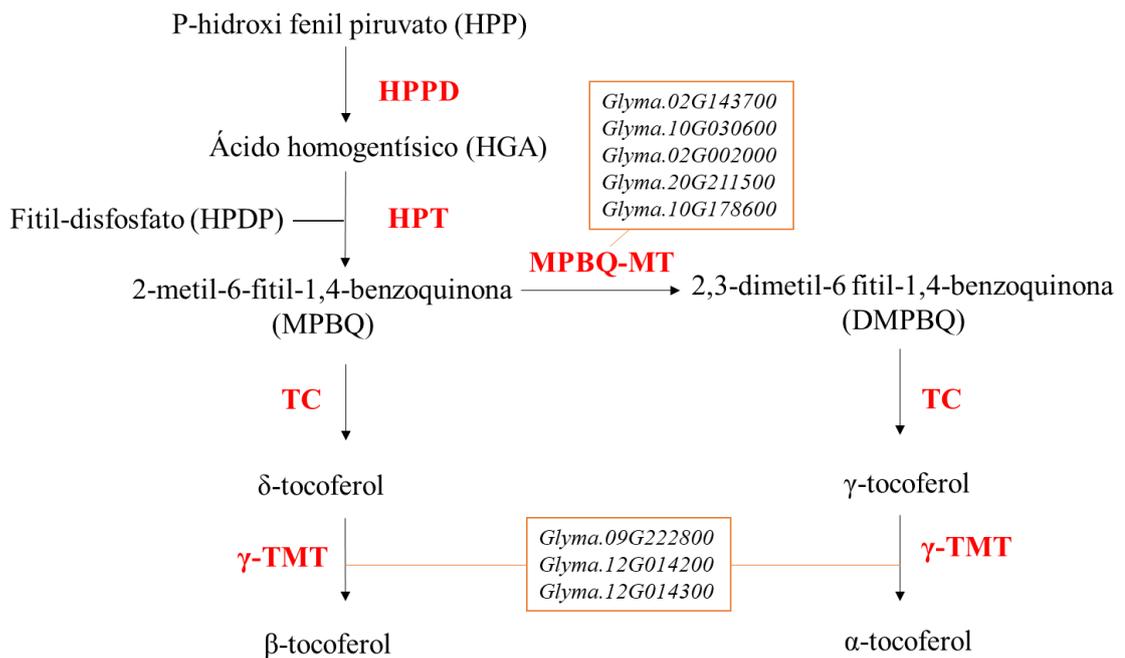


Figura 5.2. Vía simplificada de biosíntesis de tocoferoles adaptado de Muñoz y Munne-Bosch (2019). En rojo se destacan las enzimas involucradas: Hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPDD); Homogentisato fitil transferasa (HPT); Metilfitilbenzoquinona metiltransferasa (MPBQ-MT); Tocoferol ciclasa (TC); Gamma tocoferol metiltransferasa (γ -TMT). Dentro de las cajas están indicados los genes candidatos identificados en soja para las enzimas MPBQ-MT (Knizia et al., 2022) y γ -TMT (Dwiyanti et al., 2011; Vinutha et al., 2015).

2. Objetivo

En el genotipo de soja Alim5.09 sometido a breves intervalos de altas temperaturas, déficit hídrico y su interacción durante el llenado se propone, determinar si los cambios en las proporciones de los diferentes tocoferoles están correlacionados con la expresión de los cinco genes claves implicados en la biosíntesis de los mismos, considerando además aspectos fisiológicos del funcionamiento de las plantas.

3. Materiales y métodos

Se realizó un experimento durante la campaña 2018/19 en el invernadero del Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (Centro de Investigaciones Agropecuarias) INTA (31°28'S, 64°08'O Córdoba Argentina) bajo las siguientes condiciones: temperatura promedio diaria de 24 °C (con fluctuaciones de 19 °C de mínima durante la noche y 28 °C durante el día), humedad promedio de 60% e intensidad lumínica ~1200-1400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La fecha de siembra fue el 14 de diciembre. El genotipo utilizado fue Alim5.09, debido a que los resultados previos del capítulo 3 indicaron una mayor concentración de alfa y beta tocoferol y menor de delta tocoferol en este genotipo respecto a Jocketta. Además, en Alim5.09 la isoforma alfa tocoferol fue la que registró los mayores cambios ante los tratamientos de estrés, incrementándose ante el déficit hídrico, sin modificaciones significativas de los tocoferoles totales.

Las plantas se cultivaron en macetas de PVC cilíndricas de aproximadamente 4 litros de capacidad. Se utilizó una mezcla de ~3,5 kg de sustrato húmedo de tierra y arena en una relación 2:1. Para el manejo del riego en el ensayo se determinaron las constantes hídricas y composición del sustrato (Tabla 15). El contenido hídrico del sustrato (CHS) a capacidad de campo se determinó mediante la ecuación [5.1], mientras que el CHS en el punto de marchitez permanente (PMP) se determinó en laboratorio según el método ISO/FDIS 11274 (1998).

$$\text{CHS (\%)} = \frac{\text{PHcc} - \text{PS}}{\text{PS}} \times 100 \quad \text{ecuación [5.1]}$$

donde:

PHcc: peso húmedo promedio del sustrato a capacidad de campo (g)

PS: peso seco promedio del sustrato (g)

Para ello, se regaron cinco macetas hasta alcanzar la saturación del sustrato y una vez que se completó el drenaje de las mismas se registró el PHcc. Este peso, considerado como la capacidad de campo, es la cantidad máxima de agua capaz de ser retenida por el sustrato y representa el 100% del contenido hídrico del mismo (Cassel y Nielsen, 1986). Luego, se retiró el sustrato de

esas macetas y se llevó a una estufa de secado a 105 °C durante 72 horas para finalmente registrar el PS (según metodología propuesta por Brouwer et al. (1986)).

Tabla 5.1. Constantes hídricas y composición del sustrato utilizado en el experimento del invernadero durante la campaña 2018/19.

Constantes hídricas	Porcentaje (%)
Capacidad de campo (CC)	40
Punto de marchitez permanente (PMP)	12
Textura del suelo	
Arena (%)	76,61
Limo (%)	12,00
Arcilla (%)	11,39
Clasificación textural	Franco arenoso

La siembra se realizó manualmente colocando en cada maceta tres semillas, previamente curadas con fungicida (CRUISER® ADVANCED), a ~2cm de profundidad. En el estadio cotiledonar (VC, según escala de Fehr y Caviness, 1977), se raleó para dejar una planta por maceta y aproximadamente 18-20 plantas m². Las plantas se mantuvieron libres de malezas y enfermedades durante el ciclo del cultivo.

3.1 Tratamientos y diseño experimental

Luego de la siembra, todas las macetas fueron regadas y llevadas al 80% del CHS. Entre la siembra y el comienzo de los tratamientos de estrés hídrico, las macetas se regaban diariamente en las primeras horas de la mañana reponiendo el agua perdida durante el día. Para ello, primero se registraba el peso de cada una de las macetas y de acuerdo al peso objetivo de CC de cada una de ellas se determinaba la cantidad de agua que debía reponerse cada día (Figura 5.2A y B).

Los tratamientos se impusieron al inicio del llenado de grano, estadio R5 (Fehr y Caviness, 1977). Para ello, la mitad de las macetas elegidas al azar se trasladaron a un cubículo contiguo dentro del mismo invernadero con el fin de establecer un régimen de temperatura diferencial entre ambos cubículos. Las macetas se agruparon bajo un diseño completamente aleatorizado en arreglo de parcelas dividida con seis repeticiones (cada maceta se consideró una unidad experimental). De esta manera, la parcela principal quedó constituida por el nivel térmico, mientras que la subparcela fue el nivel hídrico. Los niveles térmicos fueron: 1) plantas control expuestas a una temperatura media promedio diaria de 24 °C, máxima promedio de 30 °C y mínima promedio de 18 °C durante todo el ciclo y 2) plantas bajo estrés térmico, donde la temperatura objetivo fue superar los 32 °C durante 6 h alrededor del mediodía (de 10:00 a 16:00) desde el estadio R5 hasta el de R7. Para lograr el aumento de temperatura se colocaron dos calientadores en el cubículo. A fin de registrar la temperatura y la humedad relativa dentro de cada cubículo se utilizaron sensores digitales (DS1923L-F5, resolución: 0,5 °C, registradores de datos I-buttons, Digi-Key Co. Ltd.,

EE.UU.) que se dispusieron por encima de las plantas. Las mediciones se registraron cada media hora durante la imposición de los tratamientos. En cada cubículo se caracterizó el régimen térmico utilizando la misma metodología descrita en el capítulo 2. Los resultados de dicha caracterización se muestran en la Tabla 17. Los niveles hídricos consistieron en: 1) plantas control, donde las macetas se regaron diariamente con el objetivo de mantener el 80% del CHS durante todo el ciclo del cultivo y 2) plantas bajo estrés hídrico, donde el riego fue suspendido de manera gradual hasta alcanzar el 40% del CHS al inicio de los tratamientos, en el estadio R5, y se mantuvieron en dicha condición hasta el fin del ciclo del cultivo, estadio R7. De la combinación de los niveles térmico e hídrico se generaron cuatro tratamientos: plantas bajo riego sin estrés térmico (control), plantas bajo riego expuestas a episodios de estrés térmico (ET), plantas bajo estrés hídrico (EH) pero sin estrés térmico, plantas expuestas a la combinación de estrés térmico e hídrico (ET×EH). Los tratamientos se extendieron durante el llenado de grano, las mediciones y muestreos en las plantas se realizaron en cinco estadios fenológicos utilizando la escala propuesta por Fehr y Caviness (1977) para los estadios R5, R5.5, R6 (un grano verde llena la cavidad de la vaina, ubicada en uno de los cuatro nudos superiores del tallo principal) y R8. Para el estadio fenológico R6.5 (todas las cavidades de las vainas están completamente llenas con granos, en los cuatros nudos superiores del tallo principal), se utilizó la definición propuesta por Whiting et al. (1988). Cada estadio fenológico incluyó seis macetas por tratamiento, exceptuando al estadio R8 el que incluyó cuatro macetas por tratamiento.



Figura 5.3. Grupo de macetas de la situación control conteniendo plantas de soja del genotipo Alim5.09 en el estadio fenológico V1 (A), y maceta conteniendo planta de soja en el estadio fenológico V3 en la cual se muestra el procedimiento de pesada diario para el posterior cálculo de reposición de agua con el objetivo de mantener el 80% del contenido hídrico del sustrato.

Marcado de vainas y muestreo de granos

Antes de la imposición de los tratamientos, en cada una de las plantas se identificaron y marcaron vainas en el tallo principal de la misma edad fenológica, correspondientes al estadio R5. Para ello, seguimos la metodología descrita en el capítulo 2, pero sin diferenciar estratos. Se recolectaron las vainas marcadas de seis plantas por tratamiento durante los estadios R5, R5.5, R6 y R6.5 y de cuatro plantas por tratamiento en el estadio R8. Una fracción de los granos de dichas vainas fue utilizada para determinar la concentración de los distintos tocoferoles en grano y la otra fracción para la cuantificación de los niveles de transcritos de los genes MPBQ4, MPBQ2, TMT1, TMT2 y TMT3 (ver Tabla 6) implicados en la biosíntesis de tocoferoles. De cada muestra de vainas se separó una parte para determinar el peso seco de los granos siguiendo la metodología descrita en el capítulo 2. Del resto de las vainas, se separaron los granos y se dividieron en dos submuestras que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Ambas submuestras se almacenaron a -80 °C en ultrafreezer (Righi UF500-86LV, Argentina). La primera submuestra se utilizó para la extracción de ARN y la cuantificación de los niveles de transcritos de los genes mencionados mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-qPCR). La segunda submuestra de granos se utilizó para determinar la concentración de las distintas isoformas de tocoferoles mediante cromatografía HPLC.

Extracción de tocoferoles

Para la extracción de las distintas isoformas de tocoferoles (alfa, beta, gamma y delta) y total tocoferol en grano ($\mu\text{g g}^{-1}$ grano) se siguió la misma metodología descrita en el capítulo 3.

3.2 Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR

El ARN se extrajo de los granos cosechados en los estadios R5, R5.5, R6 y R6.5. Para ello, a partir de ~100 mg de grano molido, se realizó el aislamiento de ARN utilizando TRIzol, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina). El ADN genómico se eliminó mediante el tratamiento con DNasa I (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) y se incubó en un bloque térmico (Eppendorf Thermomixer, Alemania) durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo con solución EDTA 0.5 M durante 10 min a 65 °C en el bloque térmico (Eppendorf Thermomixer, Alemania). La concentración y calidad de ARN se midió usando un espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 3300, Estados Unidos). La calidad del ARN aislado se determinó midiendo la absorbancia a 260-280 nm y la integridad se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. El ADN complementario (ADNc) se sintetizó usando la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Promega, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del proveedor (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina). Para la reacción de qPCR se utilizó un volumen final de 15 μL : 2 μL de ADNc, 8 μL de SYBR Green Supermix (Bio Rad, Estados Unidos), 0,8 μL del cebador *forward*, 0,8 μL del cebador reverso y 3,4 μL de H₂O. La reacción

de qPCR se llevó a cabo utilizando un termociclador iQ5 (Bio Rad, Estados Unidos). El ciclado consistió en un paso inicial de desnaturalización de 3 min a 95 °C, luego 40 ciclos de 15 seg de desnaturalización a 95 °C, 30 seg de hibridación a 60 °C y 30 seg de extensión a 68 °C. Finalmente se realizó una curva de *melting* para cada gen analizado. De los cinco genes candidatos que codifican para la enzima MPBQ-MT, se seleccionaron dos que mostraron mayor expresión génica en grano basados en los datos de RNAseq disponibles en <https://www.soybase.org/soyseq/>. Las secuencias de los genes de interés MPBQ2, MPBQ4, TMT1, TMT2 y TMT3 se buscaron en la base de datos GenBank del NCBI (*National Center for Biotechnological Information*). Los cebadores, listados en la tabla 5.2, se diseñaron usando los programas *Primer 3* (Rozen y Skaletsky, 2000) y *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>). El gen de referencia usado fue actina. Los cambios de expresión génica (*Fold change*) se determinaron normalizando los niveles de transcripción de los genes de interés con respecto al gen de control interno (actina), seguido de la normalización con respecto a la expresión del gen correspondiente en el tratamiento control utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ propuesto por Livak y Schmittgen (2001). Los cambios de expresión se transformaron en \log_2 para normalizar los datos y se muestran como \log_2 -*fold change*. El análisis estadístico para determinar si los datos de dos grupos diferentes de tratamientos eran estadísticamente significativos se realizó utilizando la prueba *t* de *Student* no apareada de dos colas en Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2014).

Tabla 5.2. Cebadores diseñados a partir de los programas *Primer 3* y *Primer-Blast* y utilizados para RT-qPCR.

Identificación del gen	Nombre del gen	Secuencia del cebador (5'-3')
Glyma.10G030600	MPBQ4	Fw GCTGGCTGCTCTTGCAAGCTAT Rv CCTCTTAAGACTGCTGATGGACAG
Glyma.02G143700	MPBQ2	Fw CCAAAGTTTCATCAAATGTACGCGC Rv CCCCTCCCGCCCAAATTATC
Glyma.12G014200	TMT1	Fw CTGGAGGCAGAGTATAGCG Rv AAACTCCCAGGTCCCACCCAAT
Glyma.12G014300	TMT2	Fw GAAGCAAGTTTCCAACAGGTCG Rv CGCCAATCATAGGAGATATTGCATATG
Glyma.09G222800	TMT3	Fw CAGTGGACTTAAAACCATAAAGGGAGC Rv CCACATACTCTATATCATTACACGAG
Actina		Fw AACGACCTTAATCTTCATGCTGC Rv GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG

3.3 Mediciones fisiológicas

Durante el llenado de grano se realizaron mediciones de contenido relativo de agua, temperatura de canopeo y fotosíntesis en las seis plantas por tratamiento en los estadios R5, R5.5, R6 y R6.5. El contenido relativo de agua (CRA) se determinó siguiendo la metodología propuesta

por Hossain et al. (2014) con algunas modificaciones. Para ello, se cortó el folíolo central de la tercera hoja trifoliada totalmente expandida del tallo principal en cada una de las plantas. El peso fresco (PF) del foliolo se obtuvo inmediatamente después del corte. A continuación, el foliolo se sumergió en agua destilada para lo cual se usó una bolsa tipo Elisa y se llevó a cámara fría durante 24 horas. Luego, se extrajo el folíolo, se eliminó el agua de la superficie mediante papel absorbente y se pesó para obtener el peso turgente (PT). Finalmente, cada uno de los folíolos se secaron en una estufa de aire forzado a 60 °C durante 48 horas hasta alcanzar peso seco constante (PS). El CRA se estimó mediante la ecuación [5.2] propuesta por Turner (1986):

$$\text{CRA (\%)} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PT} - \text{PS}} \times 100 \quad \text{ecuación [5.2]}$$

Para la determinación de la temperatura del canopeo y fotosíntesis se siguió la metodología descrita en el capítulo 4.

4. Resultados

4.1 Caracterización del régimen térmico durante la imposición de los tratamientos de estrés

La temperatura máxima promedio del aire durante el llenado de grano (42 días; considerando las 6 hs diarias de estrés térmico) en los cubículos bajo ET y ET×EH superó a la del control y la EH en 11 °C, mientras que la temperatura media promedio del aire en ET y ET×EH superó a la del control y EH en 7 °C y la temperatura mínima promedio del aire fue 5 °C mayor en ET y ET×EH respecto a la del control y EH (Tabla 5.3). El IET estimado en las plantas fue 5,5 °C h⁻¹ mayor bajo ET y ET×EH en relación a las plantas control y EH. La humedad relativa en los tratamientos de ET (ET y ET×EH) fue levemente mayor (18%) comparado con los tratamientos control y EH. El DPV aumentó 1,4 kPa en los tratamientos de ET en comparación con los tratamientos sin ET. Este incremento podría estar relacionado con el aumento de la temperatura media promedio en los tratamientos bajo ET comparado con los tratamientos sin ET, de manera similar a lo mencionado previamente en los experimentos en condiciones de campo (ver Capítulo 2, Tabla 2.1).

Tabla 5.3. Promedio diario de la temperatura máxima (max), media y mínima (min) del aire (T), humedad relativa del aire, índice de estrés térmico (IET), déficit de presión de vapor (DPV) durante los tratamientos de estrés térmico (ET) de 6 horas. Las mediciones en el experimento se registraron cada media hora por encima de las plantas en cada cubículo del invernadero. El nivel térmico control incluye los tratamientos: control y EH, mientras que el ET, incluye el ET propiamente dicho y el ET×EH.

Tratamiento	T Max	T Media	T Min	Humedad Relativa	$\Sigma T \geq 32^{\circ}\text{C}$	Σ horas $\geq 32^{\circ}\text{C}$	IET*	DPV [§]
		($^{\circ}\text{C}$)		(%)	($^{\circ}\text{C}$)	(h)	($\frac{^{\circ}\text{C}}{\text{h}^{-1}}$)	(kPa)
Control y EH	30,9	27,5	22,2	55,1	15,7	14,0	1,1	1,5
ET y ET×EH [‡]	41,7	34,9	27,3	65,1	2380,3	361,0	6,6	2,9

* IET: relación entre la suma de temperaturas ($\Sigma T \geq 32^{\circ}\text{C}$) y la fracción de tiempo (Σ horas $\geq 32^{\circ}\text{C}$) por encima de 32°C .

§ DPV: calculado durante los episodios de estrés térmico según la metodología de Allen et al. (1998).

‡ ET×EH: interacción entre el estrés térmico e hídrico.

4.2 Evaluación de variables fisiológicas

Contenido relativo de agua

La Figura 5.4 muestra el contenido relativo de agua en hojas de plantas expuestas a los diferentes tratamientos a través del llenado de grano. En el estadio R5, hubo diferencias significativas en el CRA bajo la interacción NT×NH, se observaron disminuciones del 5, 20 y 43% en las plantas expuestas a los tratamientos de ET, ET×EH y EH, respectivamente con relación al control (84%). De la misma manera, en el estadio R5.5 hubo diferencias significativas en la interacción NT×NH, en este caso el ET no se diferenció del control, mientras que el CRA disminuyó un 32% y 22% en plantas bajo EH y ET×EH, ambos respecto al control (84%). En el estadio R6, el CRA fue significativamente afectado solo por el NH, disminuyendo un 20% en las plantas bajo EH y ET×EH con relación a las plantas bajo riego (control y ET) cuyo valor fue de 78%. Finalmente, en el estadio R6.5 y al igual que en el estadio anterior, el CRA fue afectado significativamente por el NH, disminuyendo un 13% en las plantas bajo déficit hídrico respecto de las plantas bajo riego (72% vs 83%, respectivamente).

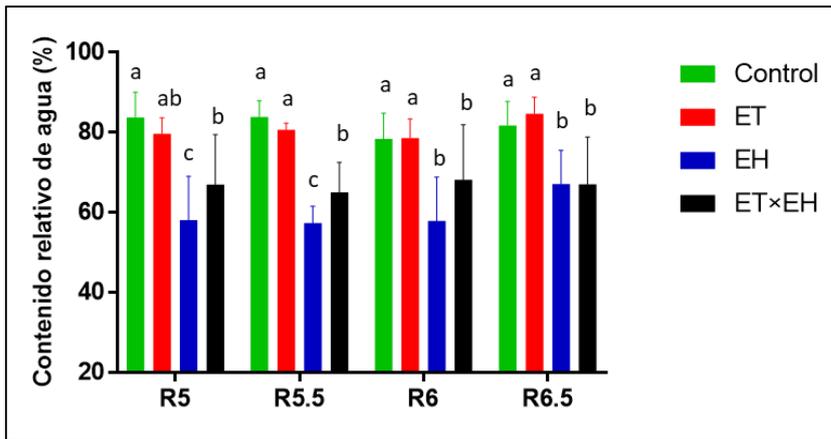


Figura 5.4. Contenido relativo de agua en hojas de soja de Alim5.09 expuesta a tratamientos que resultaron de la combinación de dos niveles térmicos (temperatura control y estrés térmico) y dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH en distintos estadios fenológicos durante el llenado de grano: R5, R5.5, R6 (según Fehr y Caviness, (1977)) y R6.5 (según Whiting et al. (1988)). Letras distintas muestran diferencias significativas entre las medias de los tratamientos en cada momento según la prueba de comparación de diferencia mínima significativa ($p < 0,05$).

Temperatura del canopeo

La temperatura del canopeo (TC) a través del llenado de grano se muestra en la Figura 5.5. En el estadio R5, la TC fue afectada significativamente por la interacción NT×NH, y se registraron aumentos promedio de 3,3 °C en las plantas bajo ET y EH con relación al control (29,3 °C), mientras que, en las plantas bajo ET×EH, la temperatura aumentó 10,1 °C respecto al control (29,3 °C). En el estadio R5.5, la TC también fue afectada significativamente por la interacción NT×NH, provocando incrementos de 2,5, 3,7 y 8,5 °C en las plantas bajo EH, ET y ET×EH, respectivamente respecto del control cuyo valor fue de 24,9 °C. Similarmente, en el estadio R6, la TC fue modificada significativamente por NT×NH, registrando aumentos de 3,5, 4,4 y 5,7 °C en las plantas bajo ET, EH y ET×EH, respectivamente con relación al tratamiento control, el cual presentó un valor promedio de 22,3 °C. Por último, en el estadio R6.5, la TC solo fue modificada significativamente por el factor nivel térmico, provocando un aumento promedio de 3,6 °C en las plantas bajo ET y ET×EH respecto de las plantas sin estrés térmico (control y EH) las que exhibieron un valor de ~27,0 °C.

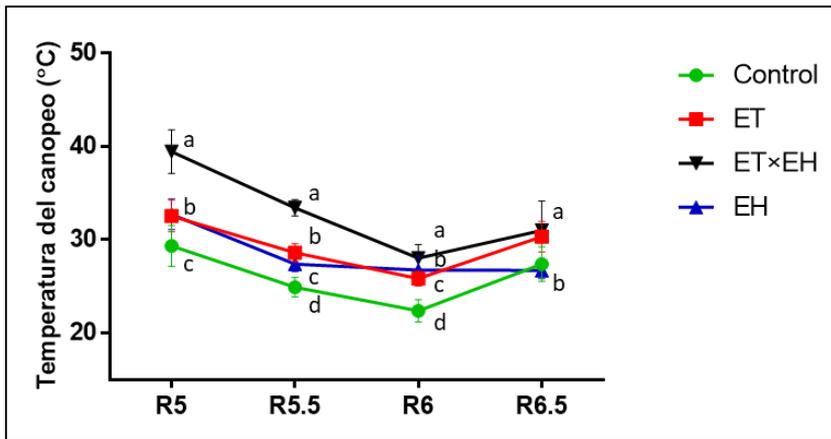


Figura 5.5. Temperatura del canopeo en hojas de soja de Alim5.09 expuesta a tratamientos que resultaron de la combinación de dos niveles térmicos (temperatura control y estrés térmico) y dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH en distintos estadios fenológicos durante el llenado de grano: R5, R5.5, R6 (según Fehr y Caviness, (1977)) y R6.5 (según Whiting et al. (1988)). Letras distintas muestran diferencias significativas entre las medias de los tratamientos en cada momento según la prueba de comparación de diferencia mínima significativa ($p < 0,05$).

Fotosíntesis

En la Figura 5.6 se muestra el progreso de la fotosíntesis a través del llenado de grano. Observamos que en el estadio R5, la fotosíntesis fue significativamente afectada solo por el NH ($p < 0,05$), cayendo en promedio un 61% en las plantas bajo EH y ET×EH respecto a las plantas regadas, control y ET ($29,4 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). En el estadio R5.5, la fotosíntesis también fue afectada por el NH ($p < 0,05$), reduciéndose un 80% en las plantas bajo EH y ET×EH con relación a las plantas regadas (control y ET) cuyo valor promedio fue $18,1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En el estadio R6, continuó la misma tendencia y la fotosíntesis se redujo ante condiciones de estrés hídrico, alcanzando reducciones del 84% en las plantas bajo EH y ET×EH respecto de las plantas bajo riego cuyo valor fue $16,4 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Finalmente, en el estadio R6.5, la fotosíntesis disminuyó significativamente en las plantas bajo EH y ET×EH, reduciéndose un 58% con relación a las plantas regadas ($13,6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) las que, y como era de esperar, también presentaron menor tasa fotosintética respecto al inicio de los tratamientos. En general, si bien la fotosíntesis fue disminuyendo conforme al avance del llenado de grano, la principal diferencia entre los tratamientos fue debida al nivel hídrico, dado que ni el nivel térmico ni la interacción NT×NH resultaron significativas en los distintos estadios fenológicos evaluados (datos no mostrados).

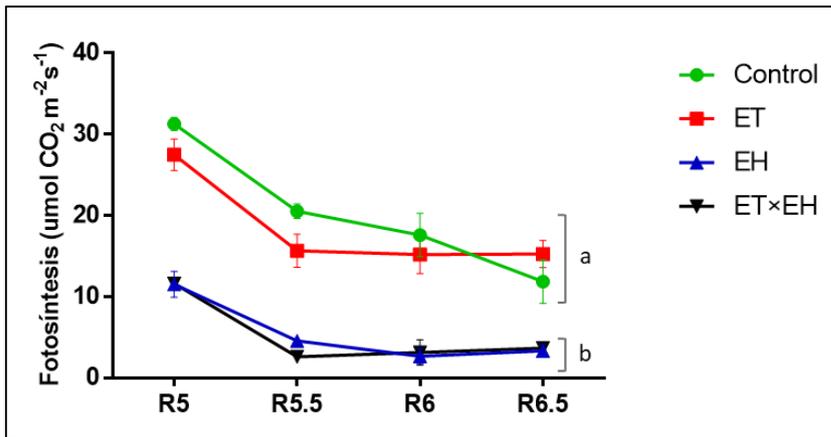


Figura 5.6. Tasa de fotosíntesis en hojas de soja de Alim5.09 expuesta a tratamientos que resultaron de la combinación de dos niveles térmicos (temperatura control y estrés térmico) y dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH en distintos estadios fenológicos durante el llenado de grano: R5, R5.5, R6 (según Fehr y Caviness, (1977)) y R6.5 (según Whiting et al. (1988)). Letras distintas muestran diferencias significativas entre las medias de los tratamientos en cada momento según la prueba de comparación de diferencia mínima significativa ($p < 0,05$).

4.3 Concentración de tocoferoles en distintos estadios fenológicos del llenado de granos

En la Tabla 5.4 se muestra el perfil de las distintas isoformas de tocoferoles a través del llenado de granos. En el estadio R5.5, las concentraciones de alfa toc y beta toc no fueron modificadas significativamente por los tratamientos de estrés, sin embargo, se observaron diferencias significativas en gamma toc y delta toc debido a la interacción NT×NH. De esta manera, en las plantas bajo ET la concentración de gamma toc se redujo un 27%, mientras que aumentó un 8 y 27% en los tratamientos de EH y ET×EH, respectivamente comparado con el control. Respecto a la concentración de delta toc, se observaron disminuciones del 10, 20 y 15% en los tratamientos de ET, EH y ET×EH respecto al control. Los cambios observados en gamma y delta toc no modificaron significativamente la concentración de tocoferoles totales.

En el estadio R6, se observaron diferencias significativas en alfa toc y delta toc debido a la interacción NT×NH, mientras que beta toc varió significativamente bajo los tratamientos NT y NH, y gamma toc varió significativamente sólo por efecto del NT (Tabla 5.4). La concentración de alfa toc se incrementó bajo los tres tratamientos de estrés comparados con el control. Estos incrementos alcanzaron el 78, 172 y 181% en las plantas bajo ET, EH y ET×EH respectivamente. Por el contrario, la concentración de delta toc disminuyó un 30, 19 y 34% en las plantas bajo ET, EH y ET×EH comparado con el control. Beta toc, independientemente del NH, registró aumentos del 33% en las plantas bajo ET (ET y ET×EH) respecto a aquellas sin ET (control y EH). Además,

a través del NT, se observaron aumentos del 59% en las plantas bajo déficit hídrico (EH y ET×EH) respecto de las plantas regadas (control y ET). La concentración de gamma toc, independientemente del NH, disminuyó 16 % en las plantas bajo ET comparado con las plantas sin ET. De manera similar, la concentración de tocoferoles totales solo fue afectada por el NT, disminuyendo un 17% en las plantas bajo ET en relación a las plantas sin ET.

En el estadio R6.5, las concentraciones de alfa toc, gamma toc y delta toc fueron afectados significativamente por la interacción NT×NH, mientras que beta toc solo fue afectado por el NH (Tabla 5.4). En esta última isoforma de tocoferol se observó que, a través del NT, las plantas bajo EH disminuyeron un 24% la concentración de beta toc comparado con las plantas bajo riego. La concentración de alfa toc, se incrementó 83, 53 y 66% en las plantas bajo ET, EH y ET×EH comparado con las plantas control. De manera opuesta, se observaron disminuciones significativas para gamma toc y delta toc en todos los tratamientos de estrés. Particularmente, gamma toc disminuyó un 21, 24 y 25% su concentración en las plantas bajo ET, EH y ET×EH. En el caso de delta toc, las reducciones alcanzaron el 32, 37 y 57% en las plantas bajo ET, EH y ET×EH. Por último, las variaciones en los isómeros de tocoferoles provocaron cambios en el total toc que fue significativamente afectado por la interacción NT×NH, indicando reducciones del 21, 27 y 36% en los tratamientos de ET, EH y ET×EH.

En R8, se observaron diferencias significativas en función del NT y NH en alfa toc y delta toc, mientras que beta toc varió significativamente solo debido al NH. La concentración de gamma toc no fue afectada significativamente por los tratamientos de estrés (Tabla 5.4), coincidentemente con lo observado previamente en el capítulo 3 (Tabla 3.5). En las plantas bajo estrés térmico, la concentración de alfa toc aumentó un 24%, mientras que delta toc disminuyó un 15%, ambos comparados con las plantas sin estrés térmico. La concentración de beta toc aumentó un 50% en las plantas bajo EH comparado con las plantas sin EH. Finalmente, observamos incrementos del 64% para alfa toc con reducciones del 8% para delta toc en las plantas bajo EH respecto de las plantas sin EH. Este último resultado coincidió con lo observado en el capítulo 3, donde se observaron aumentos de alfa toc y reducciones de delta toc en plantas bajo déficit hídrico. En general, a pesar de los cambios observados a nivel de isoformas individuales de tocoferoles en los distintos estadios fenológicos analizados, esto luego no impactó en el total toc a cosecha en ninguna condición de estrés, aun cuando en el estadio R6.5 si cambiaba. No obstante, es interesante destacar que, condiciones de déficit hídrico y/o estrés térmico aumentaron la proporción de alfa toc y disminuyeron delta toc alterando la composición de los tocoferoles totales.

Tabla 5.4. Concentración de alfa, beta, gamma, delta tocoferol y tocoferoles totales en granos de distintos estadios fenológicos durante el llenado de grano considerando dos niveles térmicos (temperatura control [TControl] y estrés térmico [ET]), dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]) y las interacciones entre los factores.

Estadio fenológico	Nivel térmico	Nivel hídrico	Tocoferoles $\mu\text{g g}^{-1}$ grano				
			Alfa	Beta	Gamma	Delta	Total
R5.5	Tcontrol	Riego	0,82	0,49	25,62	8,82	35,47
		EH	0,89	0,52	27,75	7,07	32,07
	ET	Riego	0,70	0,41	18,74	7,90	27,75
		EH	0,93	0,55	32,51	7,54	41,52
DMS (doble interacción)			0,30	0,17	4,76	0,75	12,35
Nivel de significancia							
Nivel térmico (NT)			ns	ns	ns	ns	ns
Nivel hídrico (NH)			ns	ns	**	**	ns
NT×NH			ns	ns	**	*	ns
R6	Tcontrol	Riego	1,25	0,97	30,86	26,68	59,76
		EH	3,51	1,86	31,97	21,67	59,00
	ET	Riego	2,23	1,58	28,58	18,77	51,16
		EH	3,40	2,19	23,99	17,69	47,27
DMS (doble interacción)			0,72	0,57	6,66	2,15	9,07
Nivel de significancia							
Nivel térmico (NT)			*	*	*	***	*
Nivel hídrico (NH)			***	**	ns	**	ns
NT×NH			*	ns	ns	*	ns
R6.5	Tcontrol	Riego	5,11	3,91	49,04	49,80	107,86
		EH	7,80	2,54	37,31	31,22	78,87
	ET	Riego	9,35	3,61	38,91	33,71	85,58
		EH	8,47	3,15	36,55	21,33	69,49
DMS (doble interacción)			1,95	0,79	2,72	2,08	5,34
Nivel de significancia							
Nivel térmico (NT)			**	ns	**	***	***
Nivel hídrico (NH)			ns	*	***	***	***
NT×NH			*	ns	**	**	**
R8	Tcontrol	Riego	15,55	4,77	118,91	65,30	204,50
		EH	31,82	8,31	121,96	57,70	219,80
	ET	Riego	24,55	6,13	110,20	56,90	214,60
		EH	34,08	8,01	125,05	54,20	221,30
DMS (doble interacción)			6,66	1,25	13,67	6,80	23,50
Nivel de significancia							
Nivel térmico (NT)			*	ns	ns	*	ns
Nivel hídrico (NH)			***	***	ns	*	ns
NT×NH			ns	ns	ns	ns	ns

ns, no significativo

***, **, *Significativos al $p \leq 0,001$, $0,01$ y $0,05$, respectivamente.

4.4 Análisis de genes relacionados a la biosíntesis de tocoferoles

Durante el llenado de grano, se realizó un análisis de expresión de diferentes genes de soja relacionados con la síntesis de tocoferoles, siendo MPBQ2 y MPBQ4 codificantes para la enzima MPBQ metiltransferasa y TMT1, TMT2 y TMT3 para la enzima gamma tocoferol metiltransferasa (Figura 5.2 y Tabla 5.2). La descripción de los resultados de esta sección referidos a los cambios de expresión génica (*fold change*) debidos a los tratamientos de estrés (ET, EH y ET×EH), se realizó comparando con la condición control. En general, observamos que los genes MPBQ2 y MPBQ4 incrementaron su expresión tempranamente durante llenado de grano (estadio R5.5) (Figura 5.7B) y luego disminuyeron sus niveles de transcritos (estadios R6 y R6.5) (Figura 5.7C y D). Durante el estadio R5.5, aunque se observaron aumentos en el nivel de expresión del gen MPBQ4 en todos los tratamientos, estos incrementos solo fueron significativos en el ET y EH. En los estadios R6 y R6.5, las disminuciones en los niveles de expresión de MPBQ4 no fueron significativas (Figura 5.8A). En relación a la expresión de MPBQ2 en el estadio R5.5, observamos la misma tendencia que en MPBQ4, es decir que aumentó significativamente en ET y EH. Por el contrario, en el estadio R6, la expresión de MPBB4 a pesar de disminuir en todos los tratamientos no resultó significativa. Hacia el final, en el estadio R6.5, la expresión de MPBQ4 disminuyó en todos los tratamientos de estrés siendo solo significativa en EH (Figura 5.8B).

Respecto de los genes involucrados en la transcripción de la enzima gamma tocoferol metiltransferasa, encontramos que la expresión de los genes TMT1, TMT2 y TMT3 estuvo incrementada a partir del estadio R5.5 (Figura 5.7B), pero luego se observó una modificación en la dinámica entre las diferentes isoformas en las condiciones evaluadas (Figura 5.7C y D). Durante el estadio R5, la mayoría de los genes evaluados prácticamente no mostraron diferencias significativas en su expresión respecto del control (Figura 5.8A, B, D y E), siendo la única excepción la isoforma TMT3 que disminuyó significativamente en granos provenientes de plantas expuestas en el tratamiento de ET×EH (Figura 5.8E). En el estadio R5.5, la expresión de TMT1 se incrementó bajo los tres tratamientos de estrés, siendo significativo en ET y EH. En el estadio R6, la expresión de TMT1 disminuyó en todos los tratamientos, aunque solo fue significativa en EH. En el estadio R6.5, se observaron drásticos y significativos incrementos de la expresión de TMT1 bajo todos los tratamientos de estrés (Figura 5.8C). Respecto a los cambios en niveles de transcripción de TMT2, en el estadio R5.5 se observó que, si bien aumentaron bajo todos los tratamientos de estrés, solo fue significativo para el EH. En el estadio R6, la expresión de TMT2 aumentó significativamente en todos los tratamientos de estrés. En el estadio R6.5, no se observaron cambios significativos en la expresión de TMT2 (Figura 5.8D). Para el gen TMT3, en el estadio R5.5, se observaron incrementos en su nivel de expresión bajo todos los tratamientos de estrés, siendo sólo significativa el EH. En el estadio R6, la expresión de TMT3 disminuyó significativamente en ET y no mostró diferencias significativas en el resto de los tratamientos.

Finalmente, en el estadio R6.5, la expresión de TM3 a pesar de disminuir en los tratamientos de estrés, no mostró diferencias significativas respecto al control (Figura 5.8E).

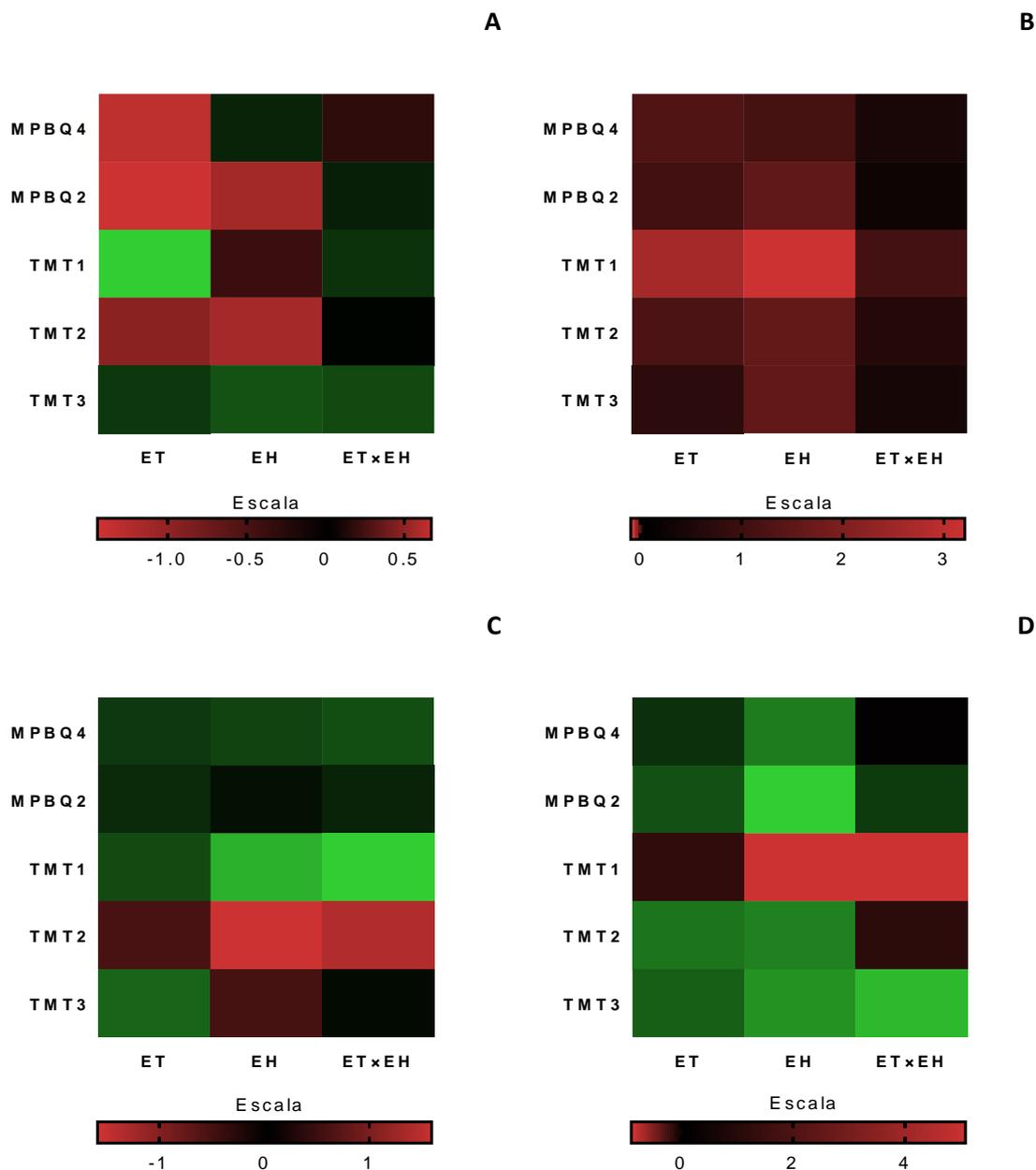


Figura 5.7. Gráfico *heatmap* de los cambios en los niveles de expresión génica de los genes MPBQ4, MPBQ2 codificantes para la enzima 2-metil-6-fitil-1,4-benzoquinona metil transferasa y los genes TMT1, TMT2 y TMT3 codificantes para la enzima gamma tocoferol metiltransferasa, en granos de soja de Alim5.09. Los tratamientos resultaron de la combinación de dos niveles térmicos (temperatura control y estrés térmico) y dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ETxEH en distintos estadios fenológicos durante el llenado de granos: R5 (A), R5.5 (B), R6 (C) (según Fehr y Caviness, (1977)) y R6.5 (D) (según Whiting et al. (1988)). Los genes que no cambian más que el valor umbral establecido en cero, referido al

control, aparecen en negro; mientras que los genes que aumentan y disminuyen respecto a dicho control varían en la intensidad de color rojo y verde, respectivamente.

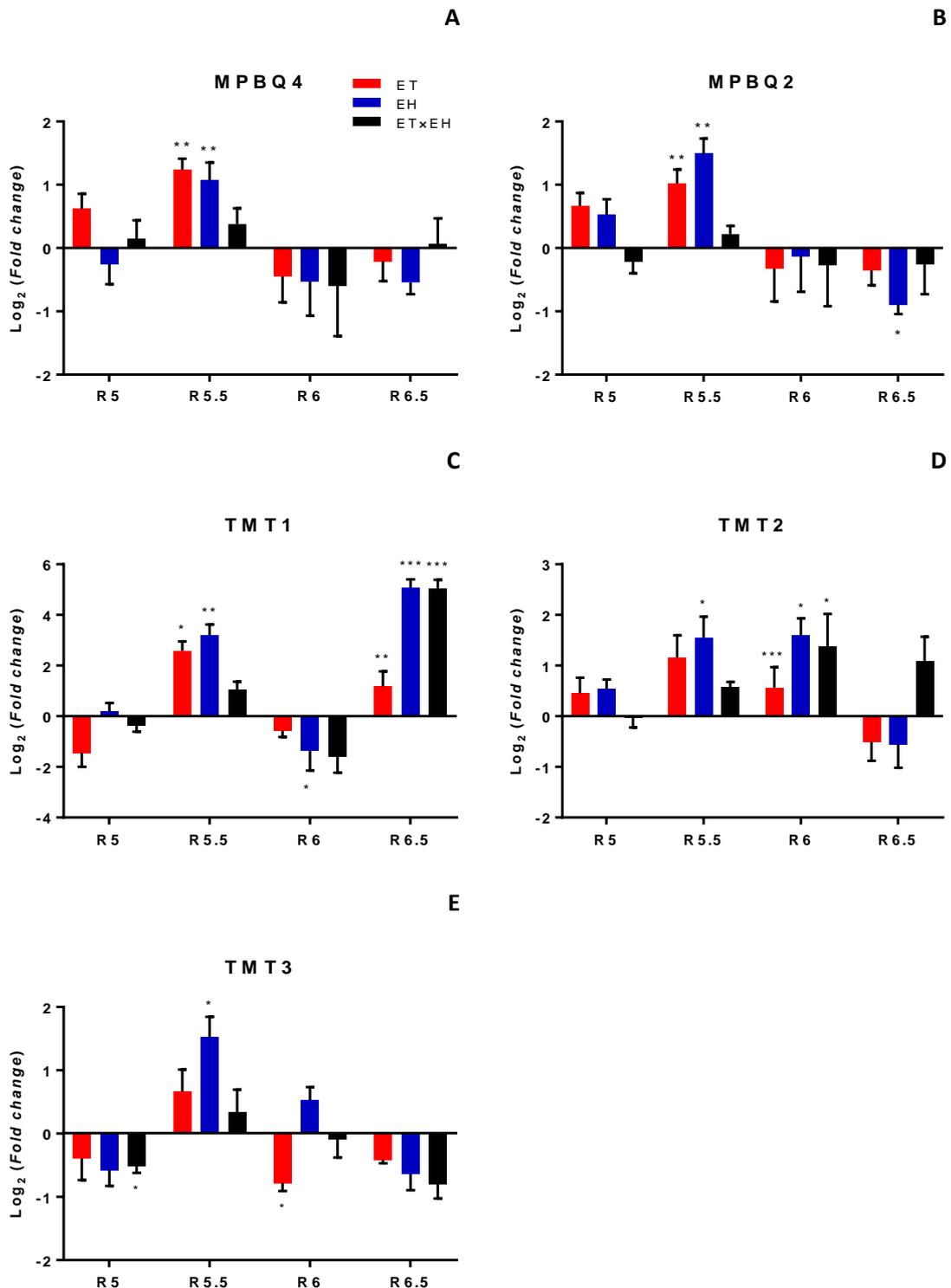


Figura 5.8. Cambios en los niveles de expresión génica de los genes MPBQ4 (A) y MPBQ2 (B) codificantes para la enzima 2-metil-6-fitol-1,4-benzoquinona metil transferasa y los genes TMT1 (C), TMT2 (D) y TMT3 (E) codificantes para la enzima gamma tocoferol metiltransferasa, en granos de soja de Alim5.09. Los tratamientos resultaron de la combinación de dos niveles

térmicos (temperatura control y estrés térmico) y dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH en distintos estadios fenológicos durante el llenado de grano: R5, R5.5, R6 (según Fehr y Caviness, (1977)) y R6.5 (según Whiting et al. (1988)). La cantidad de ARNm de los genes mencionados se cuantificó mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-qPCR). Los datos de expresión son medias \pm error estándar de un *pool* de granos de 6 plantas y los cambios \log_2 -fold change se muestran en comparación con el tratamiento control (línea de base, cero). Las diferencias estadísticamente significativas se indican mediante asteriscos (prueba t de *Student* de dos colas no apareadas; ***, **, *, significativos al $p \leq 0,001$, 0,01 y 0,05, respectivamente).

5. Discusión

Previamente, en el capítulo 3 de esta tesis se evaluó el impacto del estrés térmico, estrés hídrico y su interacción durante la etapa de llenado sobre las distintas isoformas de tocoferoles, en granos cosechados a madurez, de manera similar a la mayoría de los estudios documentados en la bibliografía (Britz et al., 2008; Britz y Kremer, 2002; Carrão-Panizzi y Erhan, 2007; Carrera et al., 2014). En este capítulo avanzamos determinando la dinámica de acumulación de la concentración de alfa, beta, delta, gamma tocoferol, así como de los tocoferoles totales a través de los tratamientos mencionados, y su posible relación con la expresión de cinco genes claves implicados en la biosíntesis de tocoferoles.

Los resultados mostraron que, si bien todas las isoformas de tocoferol se fueron sintetizando a través del llenado de grano, independientemente del tratamiento, delta tocoferol se incrementó mayormente entre los estadios R5.5 y R6; mientras que, alfa, beta y gamma tocoferol se incrementaron marcadamente entre los estadios R6.5 y R8 (Tabla 5.4). En condiciones potenciales a campo, Kumar et al. (2009) encontraron que el periodo de mayor acumulación de alfa, beta y gamma tocoferol ocurrió entre los estadios R7 y la madurez completa. Estos autores propusieron que este rápido incremento de los tocoferoles, que forman parte del complejo antioxidante, hacia el final del llenado de grano, podría ser una respuesta ante la acumulación de especies activas del oxígeno (EAO) que se producen debido al proceso de disecación del grano (Pammenter y Berjak, 1999). Es ampliamente conocido que las EAO son producidas también durante procesos metabólicos como la fotosíntesis y la respiración, y su formación puede ser acelerada bajo condiciones de sequía, alta intensidad lumínica y altas temperaturas (Falk y Munne, 2010). El desbalance entre la producción de los EAO y el sistema de defensa antioxidante conduce a estrés oxidativo alterando la función celular normal. Si bien en este experimento no medimos variables directamente relacionadas al estrés oxidativo, en los tratamientos bajo déficit hídrico observamos caídas significativas del contenido relativo de agua en hojas y de la tasa de fotosíntesis a través del llenado de grano (Figura 5.4 y 5.6), lo que podría estar implicando una condición de estrés oxidativo. Además, los tratamientos de EH y ET×EH incrementaron significativamente la temperatura del canopeo respecto al control (Figura 5.7). Estas respuestas coincidieron con lo observado en nuestros ensayos de campo, donde condiciones de déficit hídrico promovieron el cierre estomático, reducciones en la tasa de fotosíntesis y aumentos de la temperatura del canopeo y del estrés oxidativo (Ergo et al., 2021). Debido a que los tocoferoles son parte del sistema antioxidante no enzimático, podrían haber modificado su composición en respuesta a las condiciones de estrés mencionadas.

Distintos estudios centrados en el llenado de grano en soja han señalado un aumento en la producción final (a cosecha) de alfa tocoferol en respuesta a deficiencias hídricas (Britz y Kremer, 2002; Carrão-Panizzi y Erhan, 2007; Carrera et al., 2011), altas temperaturas (Almonor et al.,

1998; Britz y Kremer, 2002; Chennupati et al., 2012) e interacción entre ambos factores (Britz y Kremer, 2002). De manera interesante, en este capítulo además de confirmar resultados previos, observamos que alfa tocoferol aumentó en los tratamientos de ET, EH y ET×EH respecto al control, a través de todo el llenado de grano a partir del estadio R6 (Tabla 5.4). El incremento en los niveles alfa tocoferol observados en nuestro experimento podría relacionarse a su función en la eliminación de EAO que se generarían en mayor proporción bajo las distintas condiciones de estrés, interrumpiendo así la peroxidación lipídica, y estabilizando las membranas celulares. Esto se apoya en la alta efectividad de alfa tocoferol en la captura y eliminación de radicales libres (Fukuzawa et al., 1985; Semida et al., 2016). Por otro lado, el aumento en la concentración de alfa tocoferol en general fue acompañado de reducciones de la concentración de delta tocoferol y en algunos casos de gamma tocoferol, similar a lo observado en los experimentos a campo (Tabla 3.5, capítulo 3). Como ha sido sugerido en trabajos previos (Carrera et al., 2011; Sattler et al., 2003), dicha respuesta podría estar reflejando la competencia de delta y alfa tocoferol por MPBQ, el cual es un precursor común a partir del cual son sintetizadas ambas isoformas de tocoferol (Figura 5.2). Si bien las concentraciones de las distintas isoformas de tocoferol variaron a través del llenado de grano debido a los tratamientos de estrés, no se registraron cambios significativos en la concentración de los tocoferoles totales a cosecha (Tabla 5.4). Esto podría deberse a que los granos de plantas sometidas a tratamientos de estrés en el estadio R8 tampoco modificaron significativamente la concentración de gamma tocoferol, el cual representó el 57% de la concentración de tocoferoles totales, siendo la principal isoforma presente en el aceite de soja.

Numerosos estudios han establecido las bases genéticas y moleculares sobre la biosíntesis de tocoferoles en soja (Dwiyanti et al., 2011; Li et al., 2010; Liu et al., 2017; Park et al., 2019; Shaw y Rajcan, 2017). Además, el impacto de factores ambientales sobre estos compuestos antioxidantes ha sido abordado ampliamente (Carrão-Panizzi y Erhan, 2007; Carrera et al., 2011; Carrera et al., 2014; Carrera y Seguin, 2016; Chennupati et al., 2011). Sin embargo, un enfoque integrador que considere ambos aspectos, resulta menos frecuente en la bibliografía, aun cuando una respuesta molecular común de las plantas al estrés es la modificación de la expresión de genes. Por ello, intentamos determinar si los cambios en las distintas isoformas de los tocoferoles bajo condiciones de ET, EH y ET×EH durante el llenado de grano en soja están correlacionados con la expresión de los cinco genes claves implicados en la biosíntesis de estos. Los resultados mostraron que, en la etapa inicial del llenado de grano, estadio R5.5, los genes MPBQ2 y MPBQ4 que codifican para la enzima MPBQ-MT, incrementaron su expresión bajo todas las condiciones de estrés y luego, a partir del estadio R6, disminuyeron sus niveles de transcritos (Figura 5.5A y B). La enzima MPBQ-MT ocupa una posición central ya que direcciona el flujo metabólico de los tocoferoles hacia gamma y alfa tocoferol (Figura 5.2). De esta manera, el aumento en los niveles de expresión de los genes MPBQ2 y MPBQ4, podría estar involucrado en el aumento de

la concentración de gamma tocoferol y la reducción de delta tocoferol que observamos en el estadio R5.5 bajo condiciones de déficit hídrico (Tabla 5.4). En un estudio previo y utilizando transgénesis de *Arabidopsis thaliana* en soja, Van Eenennaam et al. (2003) encontraron que la sobreexpresión del gen VTE3 que regula a la enzima MPBQ-MT redujo la concentración de delta y beta tocoferol con un aumento proporcional de gamma y alfa tocoferol en granos. Sin embargo, este gen ha sido escasamente estudiado en respuesta a estrés abiótico (Ma et al., 2020). En hojas de lechuga (*Lactuca Sativa*) transgénica, la sobreexpresión de MPBQ-MT, denominada LsMT en el mismo estudio, provocó incrementos de alfa y gamma tocoferol, aumentando la capacidad antioxidante a nivel de planta ante condiciones de estrés por alta luminosidad (Tang et al., 2016). En los dos estudios mencionados, la enzima MPBQ-MT está regulada sólo por un gen, mientras que en soja está regulada por cinco genes (Figura 5.2) de los cuales nosotros sólo evaluamos dos (Figura 5.8). Por lo tanto, es posible que otros genes estén involucrados en los cambios que observamos de las distintas isoformas de tocoferoles a través del llenado de grano.

Continuando nuestro análisis, evaluamos los genes TMT1, TMT2 y TMT3, los cuales codifican para la enzima γ -TMT que interviene en el paso final de la conversión de gamma tocoferol en alfa tocoferol y delta tocoferol en beta tocoferol (Figura 5.2). Alfa tocoferol es considerado un potente antioxidante y suplemento nutricional por lo que ha recibido especial atención en distintos trabajos. Por ejemplo, en condiciones potenciales de crecimiento en soja, identificaron a la isoforma TMT3 como gen candidato responsable de la alta concentración de alfa tocoferol en hojas y granos, mediante el análisis genético de cultivares contrastantes en la concentración de alfa tocoferol (Dwiyanti et al., 2011, 2007). Si esta tendencia se mantiene bajo condiciones de estrés o es común a otros cultivares de soja todavía no es claro. Nuestros resultados indicaron que la expresión de los genes TMT1, TMT2 y TMT3 aumentó a través de los tratamientos de estrés a partir del estadio R5.5 (Figura 5.7B), aunque se observó una dinámica diferencial entre las distintas isoformas de TMT dependiendo del estadio fenológico analizado (Figura 5.8C, D y E). Por ejemplo, en el estadio R6, la expresión de TMT2 se incrementó significativamente en todos los tratamientos de estrés (Figura 5.8D y 5.7C), mientras que en el estadio R6.5 se destacó el marcado incremento en la expresión de TMT1 en todas las condiciones de estrés (Figura 5.8C y 5.7D). Estos resultados coincidieron parcialmente con los de Park et al. (2019), quienes investigaron los niveles de expresión de los genes TMT1, TMT2 y TMT3 en dos cultivares de soja que diferían en concentración de alfa tocoferol y expuestos a dos regímenes térmicos distintos, uno de 20 °C y otro de 30 °C desde floración hasta R6. Los autores encontraron que solo el gen TMT2 incrementó sus niveles de expresión en los granos de ambos cultivares cuando la temperatura fue de 30 °C, derivando en aumentos de alfa tocoferol. En nuestro estudio, la sobreexpresión de las distintas isoformas de los genes TMT a través de los tratamientos de ET, EH y ET×EH durante el llenado de grano coincidió con aumentos en la concentración de alfa

tocoferol en el grano ante las condiciones de estrés (Tabla 5.4), sugiriendo un mecanismo de regulación positiva. Por lo tanto, es posible proponer que el aumento de la concentración de alfa tocoferol bajo los tratamientos de estrés, estuvo relacionado con el incremento en los niveles de transcritos de las distintas isoformas de TMT. Cabe destacar que además de la regulación transcripcional que observamos en este estudio, además existen controles a nivel post-transcripcional y/o traduccional (Quadrana et al., 2013; Rimbach et al., 2010) que también podrían estar involucrados en la biosíntesis de las distintas isoformas de tocoferoles y resultaría interesante explorar a través de experimentos adicionales, utilizando por ejemplo: técnicas de secuenciación del ARN, análisis de microARN, evaluación de la síntesis de proteínas, entre otros.

Los resultados observados en este experimento en condiciones controladas, representan un avance dado que, hasta el momento, no se conocía el perfil de expresión de los genes TMT bajo condiciones de estrés individual y combinado durante el llenado de grano en soja. Se ha mencionado que la acumulación de altos niveles de alfa tocoferol en granos actúan como punto de control en la regulación de los niveles de EAO (Vinutha et al., 2017), que como es conocido aumentan ante condiciones de estrés abiótico (Falk y Munne, 2010; Foyer y Noctor, 2005). Previamente mencionamos que, aunque no evaluamos la producción de EAO, podríamos hipotetizar que las plantas bajo los tratamientos ET, EH y la interacción ET×EH incrementarían el nivel de estos compuestos debido al mayor estrés oxidativo evidenciado a través de reducciones en la tasa de fotosíntesis y aumentos de temperatura del canopeo (Figura 5.6 y 5.5). Finalmente, si tenemos en cuenta la diferencia estructural de proteína entre TMT1, TMT2 y TMT3 (Dwiyanti et al., 2007), sería posible pensar en un rol diferencial de las tres isoformas del gen TMT a través del llenado de grano, dado que por ejemplo en el estadio R6 se destacó el incremento en los niveles de TMT2 mientras que el estadio R6.5 aumentaron marcadamente los niveles de TMT3 en respuesta tanto al déficit hídrico como al estrés por altas temperaturas. Estudios complementarios podrían llevarse a cabo para corroborar esta hipótesis. Adicionalmente, sería conveniente incluir mediciones entre R6.5 y R7, teniendo en cuenta que en ese periodo se siguen acumulando los tocoferoles en el grano.

6. Conclusiones

Los resultados de este experimento mostraron que existe una dinámica temporal en la biosíntesis de tocoferoles, donde en los primeros estadios del llenado de grano, hubo un rápido incremento en la biosíntesis de delta tocoferol, mientras que en estadios más avanzados del llenado de grano se acumularon mayormente alfa, beta y gamma tocoferol. Esta tendencia fue transversal a todos los tratamientos. De manera interesante, alfa tocoferol respondió tempranamente a los tratamientos de ET, EH y ET×EH, incrementando su concentración a partir de R6 y durante todo el periodo de llenado de grano. Los aumentos en la concentración de alfa tocoferol fueron seguidos de disminuciones de la concentración de delta tocoferol y algunos casos

de gamma tocoferol. Adicionalmente, en las mismas plantas se observaron incrementos de la temperatura del canopeo, lo cual estuvo relacionado con reducciones en el contenido relativo de agua en las hojas y en la tasa de fotosíntesis. Estos cambios fisiológicos en las plantas podrían contribuir a explicar, al menos en parte, los resultados observados en términos de las concentraciones de tocoferoles. A pesar de las variaciones observadas en las distintas isoformas de tocoferol a través del llenado, éstas no modificaron significativamente la concentración total de tocoferoles en el grano. Esto sugiere que las plantas tienen una capacidad reguladora intrínseca para mantener un nivel general de tocoferoles en el grano, lo cual es interesante a la hora de seleccionar un cultivar.

El análisis de expresión génica reveló que ante condiciones de ET, EH y ET×EH, los genes MPBQ2 y MPBQ4 se sobreexpresaron tempranamente en el llenado de grano, mientras que TMT1, TMT2 y TMT3 se sobreexpresaron a partir de R5.5 y durante todo el periodo de llenado, observando un patrón diferencial de expresión entre las distintas isoformas del gen TMT dependiendo el estadio fenológico evaluado. A partir de los hallazgos de este estudio, es posible confirmar que el aumento de la concentración de alfa tocoferol ante condiciones de ET, EH y ET×EH depende, al menos en parte, del control de los niveles de expresión de los genes TMT que codifican para la enzima γ -TMT, la cual cataliza la metilación de gamma tocoferol y delta tocoferol para producir alfa tocoferol y beta tocoferol, respectivamente. Por último, el rol diferencial de las distintas isoformas del gen TMT en respuesta a los estreses podría ser objeto de estudio en futuras investigaciones. Esto permitiría evaluar la sobreexpresión selectiva de los genes TMT, en pos de mejorar la capacidad de las plantas para producir niveles elevados de alfa tocoferol bajo determinadas condiciones de estrés.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES, APORTES Y PERSPECTIVAS

1. Asociaciones entre variables relacionadas al peso de grano, calidad química del grano y funcionamiento de la fuente fotosintética: integración, conclusiones y aportes

En esta tesis, el objetivo general fue analizar el impacto de episodios de altas temperaturas y déficit hídrico sobre la dinámica de acumulación de los componentes industriales y la calidad final del grano de soja, la biosíntesis de tocoferoles, removilización aparente de reservas y el funcionamiento de la fuente fotosintética. Para lo cual, utilizando dos genotipos de soja no transgénica con concentración diferencial de proteína en grano sometidos a breves intervalos de altas temperaturas, déficit hídrico y su interacción durante el llenado en experimentos a campo, propusimos evaluar el impacto de los mencionados estreses sobre el peso de grano, la tasa de crecimiento y la duración del llenado de grano en vainas de la misma edad fenológica en diferentes posiciones del canopeo (objetivo específico 1); cuantificar los cambios en concentración y contenido de proteína, aceite y fracción residual en función de la tasa y duración del período de acumulación de los componentes mencionados (objetivo específico 2); determinar la composición del aceite correspondiente a vainas de la misma edad fenológica en diferentes posiciones del canopeo, evaluando el perfil de ácidos grasos y tocoferoles del grano (objetivo específico 3) y, establecer asociaciones entre la composición química del grano y variables ecofisiológicas relacionadas a la fuente de carbono y nitrógeno (objetivo específico 4). A partir de los resultados obtenidos del abordaje del objetivo específico 3, se identificó al genotipo de mayor concentración de alfa tocoferol en grano. Dicho genotipo (Alim5.09) fue utilizado en un nuevo experimento, pero en condiciones controladas, exponiéndolo a los mencionados tratamientos de estrés, es decir ET, EH, así como ET×EH, contando siempre con un control. En este tercer experimento, se planteó determinar si los cambios en las proporciones de las diferentes isoformas de tocoferoles estaban correlacionados con la expresión de cinco genes claves implicados en la biosíntesis de los mismos, considerando además aspectos fisiológicos del funcionamiento de las plantas.

A modo de integración, la Figura 6.1 representa los principales procesos y asociaciones entre las variables que se abordaron en esta tesis: determinación del peso de grano (capítulo 2), determinación de la calidad química del grano (capítulo 3), asociaciones entre la calidad química del grano y variables ecofisiológicas relacionadas a la fuente de carbono y nitrógeno (capítulo 4), expresión de genes asociados a la biosíntesis de tocoferoles (capítulo 5). El rendimiento en grano, independientemente del genotipo, disminuyó bajo EH y ET×EH. Estas caídas se explicaron por disminuciones tanto en el número como en el peso de grano. En este sentido, tanto a nivel de planta entera como de estratos del canopeo e independientemente del genotipo, el peso de grano disminuyó ante condiciones de EH y ET×EH. Estas disminuciones estuvieron fuertemente asociadas con la tasa de crecimiento del grano y no así con la duración del llenado de grano. De

manera interesante, observamos que los granos provenientes del estrato superior del canopeo, en general, fueron más pesados que aquellos provenientes del estrato inferior a través de los tratamientos de estrés (indicado en el esquema con un círculo negro dentro de la caja correspondiente a la variable peso de grano). Respecto a los genotipos, independientemente de los tratamientos, Alim5.09 presentó mayor peso de grano y menor número de grano, determinando una mayor relación fuente destino, es decir mayor disponibilidad de asimilados por grano) y, alcanzó valores SPAD más altos, sugiriendo mayor contenido de clorofila en hoja. Ambas variables contribuyeron a explicar la diferencia de peso de grano respecto a Jocketta (indicado en el esquema con una estrella dentro de la caja correspondiente a la variable peso de grano, la posición de la estrella por debajo o por arriba del nombre de la variable indica diferencias a favor de Alim5.09 y Jocketta, respectivamente). A través de los tratamientos y genotipos, el peso de grano estuvo asociado positivamente al contenido de agua máximo del grano y al peso de la vaina, ambas variables evidenciaron restricciones bajo condiciones de EH y ET×EH a la expansión e incorporación de asimilados, procesos propios de granos en crecimiento.

La fotosíntesis actual, así como la removilización de reservas (capítulo 4) determinan la cantidad de asimilados (principalmente carbono y nitrógeno) para la síntesis de los componentes químicos del grano, la cual es regulada además por la capacidad intrínseca del mismo para acumular biomasa. Condiciones de EH y ET×EH afectaron negativamente la fuente fotosintética, evidenciado por caídas en la $RFAI_{R5-R7}$ (asociado a reducciones en el IAF) y en fotosíntesis, conduciendo así a reducciones de los compuestos carbonados (i.e., asimilados). Adicionalmente, la relación R/RL aumentó, indicando cambios en el ambiente lumínico dentro del canopeo con mayor ingreso de luz roja a través del mismo. También se registraron caídas en el valor SPAD después de finalizado el tratamiento de ET, sugiriendo menor contenido de nitrógeno foliar. En términos de removilización, bajo EH y ET×EH, se registraron aumentos en la relación C/N_{hoja} , indicando procesos de removilización de nitrógeno desde las hojas, pero las reducciones en la relación C/N_{tallo} señalaron posibles restricciones en la removilización de nitrógeno desde este tejido. Estos resultados en conjunto con la menor partición de asimilados hacia el grano, evidenciada por caídas del IC, condujo a limitaciones en el suministro de compuestos carbonados y nitrogenados derivando en cambios en la calidad química del grano. Por ejemplo, condiciones de EH individual o combinado con ET provocaron una disminución en el contenido de proteína, aceite y fracción residual en los granos, principalmente debido a una reducción en la tasa de acumulación de estos componentes más que a una reducción en la duración de su acumulación. Además, se redujo la concentración de proteína y fracción residual, lo que estuvo asociado a una menor $RFAI_{R5-R7}$ y a una menor relación F/D. Si bien la concentración de aceite se mantuvo o registró un leve incremento, su composición cambió significativamente, aumentando la concentración del ácido oleico y disminuyendo la de los ácidos linoleico y linoléico, resultando en aumentos en la relación Ol/Ln. Por otro lado, a través

de los experimentos y tratamientos, el estrato superior del canopeo mostró mayor concentración de proteína y menor concentración de fracción residual comparado con el estrato inferior. Respecto al contenido de proteína, aceite y fracción residual no hubo consistencia de la respuesta al factor estrato entre los experimentos. Sin embargo, el estrato inferior exhibió mayor concentración de ácido linoleico y linolénico comparado con el estrato superior. Condiciones de EH individual o combinado con ET también modificaron la calidad del aceite en términos de la concentración de los tocoferoles, observándose aumentos de la concentración de alfa tocoferol y disminuciones de la de delta tocoferol, aunque sin cambios significativos en la concentración de tocoferoles totales. Los aumentos en la concentración de ácido oleico, así como la disminución de la concentración de delta tocoferol estuvieron asociados a incrementos de la temperatura del canopeo. El aumento de la temperatura del canopeo reflejaría limitaciones en la refrigeración de las hojas, lo que junto a las caídas observadas en la tasa de fotosíntesis restringiría la síntesis de asimilados esencial para la biosíntesis del aceite y sus distintos componentes. La composición química del grano también estuvo influenciada por el factor genotípico, observándose que el genotipo Alim5.09, de mayor peso de grano, alcanzó un mayor contenido de proteína, aceite y fracción residual, así como una mayor concentración de proteína, alfa y beta tocoferol en comparación con Jocketta. Este último genotipo, se caracterizó por presentar mayor concentración de aceite, fracción residual, gamma y delta tocoferol. De forma interesante los perfiles químicos de los genotipos se mantuvieron consistentes a través de los tratamientos y experimentos.

Del análisis de la composición de tocoferoles abordado en el capítulo 3 emergió que el genotipo Alim5.09 fue el de mayor concentración de alfa tocoferol. Por lo tanto, realizamos un experimento en invernadero para evaluar la dinámica de acumulación de los tocoferoles y su relación con la expresión de cinco genes claves en la biosíntesis de estos bajo cuatro condiciones: control, ET, EH y ET×EH. A través de los tratamientos, la biosíntesis de tocoferoles presentó una dinámica temporal a lo largo del llenado de grano, caracterizada por una mayor acumulación de delta tocoferol en los estadios R5.5 y R6, mientras que alfa, beta y gamma tocoferol se acumularon mayormente entre los estadios R7 y R8. Analizando la expresión génica, observamos que ante condiciones de ET, EH y ET×EH, los genes MPBQ2 y MPBQ4 (que codifican para la enzima MPBQ-MT, la cual cataliza la conversión de 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinona en 2,3-dimetil-6-fetil-1,4-benzoquinona) se sobreexpresaron tempranamente en el llenado de grano (R5.5), mientras que los genes TMT1, TMT2 y TMT3 se sobreexpresaron a partir de R5.5 y durante todo el periodo de llenado. De esta manera, el aumento en la concentración de alfa tocoferol, bajo condiciones EH y ET×EH, se asoció con el incremento en los niveles de expresión de los genes TMT, que codifican para la enzima γ -TMT, la cual cataliza la metilación de gamma tocoferol y delta tocoferol para producir alfa tocoferol y beta tocoferol, respectivamente. Adicionalmente, en las mismas plantas en las que se observaron los cambios en la expresión génica y concentración de distintas isoformas de tocoferol,

se observaron cambios a nivel fisiológico relacionados con incrementos de la temperatura del canopy a su vez asociada a reducciones observadas en el contenido relativo de agua de las hojas y de la fotosíntesis, lo que podría estar explicando al menos en parte, los resultados observados.

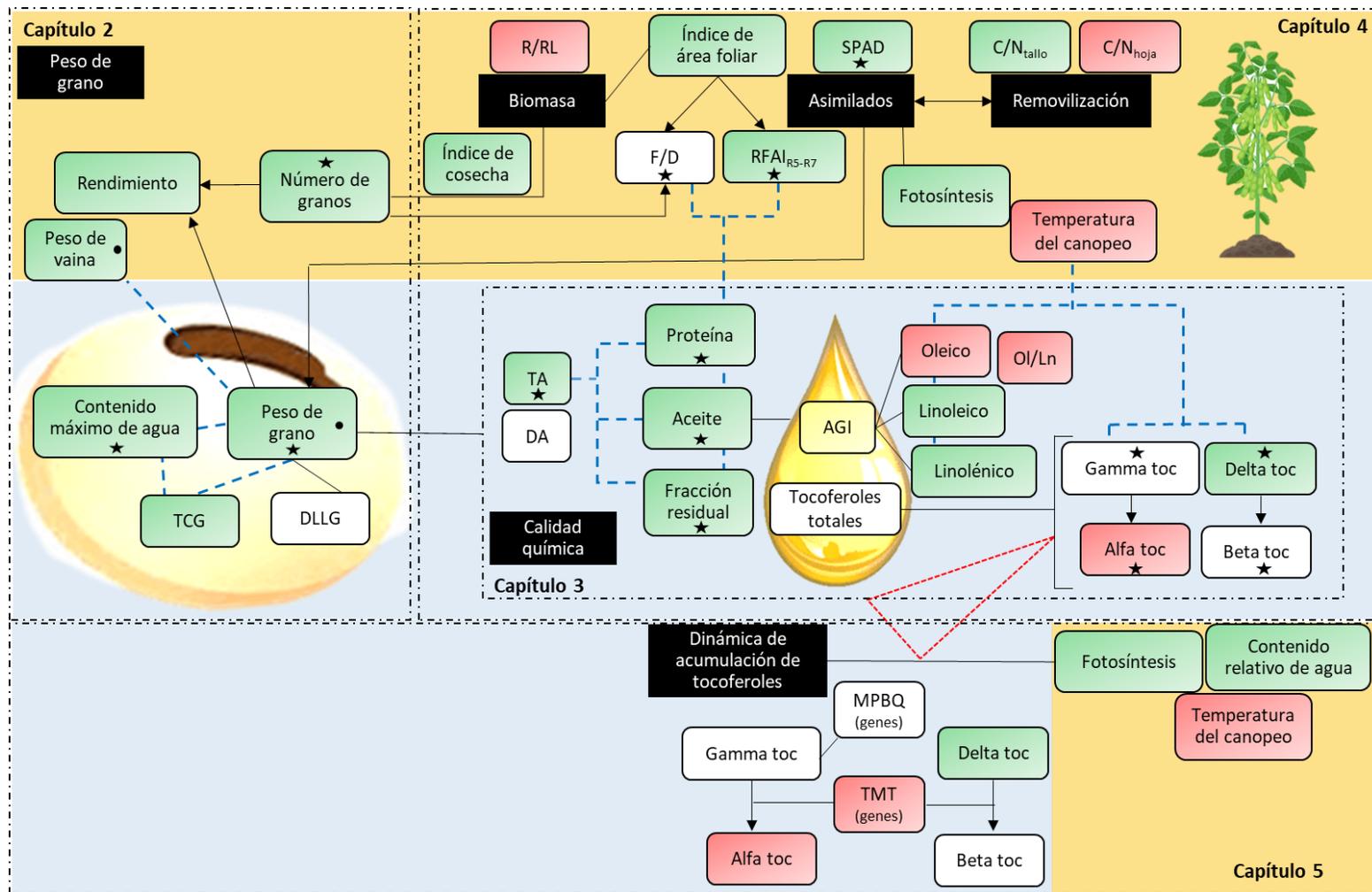


Figura 6.1. Esquema general de los principales procesos y asociaciones entre las variables que se abordaron en esta tesis: determinación del peso de grano (capítulo 2), determinación de la calidad química del grano (capítulo 3), asociaciones entre la calidad química del grano y variables ecofisiológicas relacionadas

a la fuente de carbono y nitrógeno (capítulo 4), expresión de genes asociados a la biosíntesis de tocoferoles (capítulo 5), a través de genotipos (Alim5.09 y Jocketta) y de tratamientos durante el llenado de grano, que resultaron de la combinación de dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico) y dos niveles térmicos (temperatura ambiente y estrés térmico): control (riego a temperatura ambiente), estrés térmico (riego bajo ET), estrés hídrico (EH a temperatura ambiente) y ET×EH. Las respuestas de las variables estudiadas ante tratamientos de EH (EH y ET×EH) se representan en las figuras blancas (sin cambios), rojas (aumento) y verdes (disminución) respecto a los tratamientos sin EH (control y ET). Las estrellas por debajo o por arriba del nombre de la variable indican diferencias a favor de Alim5.09 y Jocketta, respectivamente. Los puntos hacia la derecha del nombre de la variable indican diferencias a favor del estrato superior respecto al estrato inferior del canopeo de plantas. Las líneas azules discontinuas indican asociaciones significativas entre las variables. El triángulo rojo formado por líneas discontinuas indica la dinámica de tocoferoles analizada en el genotipo Alim5.09 en un experimento en invernadero. El color celeste de fondo indica variables medidas en los granos, mientras que el color naranja indica variables medidas a nivel de planta/cultivo.

Tasa de crecimiento del grano (TCG); duración del llenado de grano (DLLG); relación rojo-rojo-lejano (R/RL); clorofila foliar (valor SPAD); relación carbono nitrógeno en tallo (C/N_{tallo}); relación carbono nitrógeno en hoja (C/N_{hoja}); relación fuente destino (F/D); radiación fotosintéticamente activa interceptada acumulada durante el llenado de grano ($RFAI_{R5-R7}$); contenido de proteína; contenido de aceite (Ac); contenido de fracción residual (Res); tasa de acumulación (TA); duración de acumulación (DA); ácidos grasos insaturados (AGI); relación oleico linolénico (Ol/Ln); concentración de gamma tocoferol (Gamma toc); concentración de delta tocoferol (Delta toc); concentración de alfa tocoferol (Alfa toc); concentración de beta tocoferol (Beta toc); genes que codifican para la enzima gamma tocoferol metiltransferasa (TMT); genes que codifican para la enzima 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinona metil transferasa (MPBQ). Proteína, aceite y fracción residual están expresados como contenido. El ácido oleico, linoleico y linolénico están expresados como concentración.

2. Contraste de hipótesis

En genotipos de soja con concentración diferencial de proteína en grano, expuestos a breves períodos de altas temperaturas y déficit hídrico durante el llenado:

1. *El peso de grano correspondiente a vainas de la misma edad fenológica de diferentes posiciones del canopeo se ve afectado negativamente por cada estrés individual, provocando la interacción de estreses efectos aditivos.* Esta hipótesis fue parcialmente aceptada, debido a que el peso de grano si bien disminuyó ante condiciones de EH y ET×EH, no lo hizo en respuesta al ET individual. Además, no se observaron efectos aditivos de la interacción ET×EH sobre el peso de grano (Tabla 2.5, capítulo 2).

1.2. *El impacto negativo en el peso de grano se debe principalmente a un acortamiento de la duración del llenado más que una reducción de la tasa de crecimiento del grano.* Esta hipótesis fue rechazada, debido a que las disminuciones en el peso de grano se relacionaron principalmente con reducciones en la tasa de crecimiento de los granos y no así con la duración de llenado de los mismos (Tabla 2.5, capítulo 2).

2.1. *La interacción de ambos estreses provoca una reducción mayor del contenido de proteína, aceite, fracción residual, tocoferoles y una menor insaturación del aceite del grano respecto a los estreses individuales.* Esta hipótesis fue rechazada debido a que los componentes químicos del grano disminuyeron en similar magnitud ante el EH individual y ET×EH. Por ejemplo, a través de los experimentos y genotipos, el EH individual provocó reducciones del contenido de proteína, aceite y fracción residual que alcanzaron el 20, 14 y 16%, respectivamente; es decir similares a las reducciones observadas en respuesta a la interacción de ET y EH (21, 18, y 16%, respectivamente). Los tocoferoles totales no fueron significativamente afectados por los estreses, mientras que las isoformas que lo conforman disminuyeron similarmente ante EH y ET×EH. Si bien se generó una menor insaturación del aceite con aumentos del ácido oleico y disminuciones de los ácidos linoleico y linoléico, estos cambios fueron similares en términos de magnitud ante condiciones de EH y ET×EH (Tabla 3.4 y 3.5, capítulo 3).

2.2. *Tanto la tasa como la duración de la acumulación de proteína, aceite y fracción residual se modifican, variando de forma independiente la respuesta de cada uno de los mencionados componentes químicos, favoreciendo la deposición de proteína en detrimento de los demás compuestos.* Esta hipótesis fue parcialmente aceptada. Por un lado, la tasa y la duración de la acumulación de proteína, aceite y fracción residual variaron de forma independiente. Esto fue observado en el Exp I, en el cual en parcelas bajo déficit hídrico la reducción en el contenido de proteína se asoció a la reducción en la tasa de acumulación, mientras que la disminución en el contenido de aceite se asoció principalmente a un acortamiento en la duración de acumulación (Tabla 3.3, capítulo 3). Sin embargo, contrariamente a lo propuesto en la segunda parte de la hipótesis, la acumulación de proteína no se mantuvo ante condiciones

de déficit hídrico, y su disminución estuvo asociada a una caída del 17% promedio de su tasa de acumulación a través de los experimentos (Tabla 3.3, capítulo 3).

3. *La composición química del grano de soja se modifica de forma diferencial según la posición que ocupan las vainas coetáneas dentro del canopeo, mejorando los parámetros de calidad en el estrato superior.* Esta hipótesis fue parcialmente aceptada. El estrato superior del canopeo, a través de los experimentos y tratamientos, mostró una mayor concentración de proteína y menor concentración de fracción residual comparado con el estrato inferior, el cual que exhibió mayor concentración de ácido linoleico y linolénico comparado con el estrato superior. Sin embargo, no se detectó variabilidad posicional en la composición de los tocoferoles totales, dado que las distintas isoformas de tocoferoles no variaron dentro del canopeo (Tabla 3.3, 3.4 y 3.5, capítulo 3).

4. *El estrés térmico e hídrico afectan la fuente fotosintética y la removilización de reservas, disminuyendo el suministro de asimilados hacia los granos, lo que provoca mayores reducciones en los componentes químicos que dependen de la fotosíntesis actual. Esta respuesta es exacerbada en el genotipo de soja de alta concentración de proteína en grano.* Esta hipótesis fue parcialmente aceptada, dado que el EH, independientemente del ET y del genotipo, afectó tanto a la fuente fotosintética (evidenciado en reducciones de variables como IAF, RFAI_{R5-R7}, fotosíntesis y valor SPAD) como así también la removilización de reservas (evidenciado en caídas en la relación C/N_{tallo}) y partición de asimilados (menor IC) (Tabla 4.1, capítulo 4). Sin embargo, el ET individual no afectó la fuente fotosintética ni la removilización de reservas. El impacto negativo del EH sobre las variables antes mencionadas condujo a limitaciones en el suministro de asimilados hacia los granos en crecimiento. No obstante, la reducción del contenido de aceite, fue similar e incluso levemente menor en términos de magnitud a la reducción del contenido de proteína (17% vs 21%). Finalmente, teniendo en cuenta los dos experimentos, el contenido de aceite en el genotipo de mayor concentración de proteína en grano (Alim5.09) fue más afectado que en el genotipo de menor concentración de proteína (Jocketta) bajo condiciones de EH, independientemente del ET (23% vs 11%).

5. *Los genes que codifican para las enzimas 2-metil-6-fítill-1,4-benzoquinona y gamma tocoferol metil transferasa se sobreexpresan en condiciones de estrés, promoviendo el incremento de la concentración de alfa tocoferol y la disminución de gamma y delta tocoferol, impactando negativamente en la concentración de los tocoferoles totales.* Esta hipótesis fue parcialmente aceptada. Los genes MPBQ2 y MPBQ4 (MPBQ) que codifican para la enzima 2-metil-6-fítill-1,4-benzoquinona se sobreexpresaron en el estadio R5.5, mientras que los genes TMT1, TMT2 y TMT3 (TMT) que codifican para la enzima gamma tocoferol metil transferasa se sobreexpresaron a partir de R5.5 y durante todo el periodo de llenado (Figura 5.7 y 5.8). El aumento en los niveles de expresión de los mencionados genes promovió el incremento de la concentración de alfa tocoferol y la disminución de delta tocoferol, aunque sin cambios significativos en la concentración de los tocoferoles totales (Tabla 5.4).

3. Perspectivas

La calidad nutricional de los granos de cultivos agrícolas es clave para la seguridad alimentaria y la salud humana. En el caso del grano de soja, la cantidad de compuestos carbonados y nitrogenados, como la proteína y el aceite y su composición (i.e., ácidos grasos insaturados y tocoferoles), influyen en el valor nutricional de los alimentos obtenidos a partir de los granos cosechados. Por ende, entender la regulación ambiental y genotípica en la generación de la calidad final de granos resulta fundamental. En esta tesis evaluamos a nivel de planta entera y de estratos dentro del canopeo, cómo atributos de calidad del grano de soja relacionados no solo a los componentes mayores del grano (proteína, aceite y fracción residual) sino también a aquellos asociados particularmente a la calidad del aceite obtenido (ácidos grasos insaturados y tocoferoles), respondieron a condiciones de ET, EH y ET×EH durante el llenado de grano.

Uno de los hallazgos más interesantes de esta tesis fue que, a través de los tratamientos de estrés, el estrato superior del canopeo mostró no solo mayor peso de grano sino también mayor concentración de proteína, lo cual se asoció a la mayor tasa de acumulación de este componente. Aquí se plantea como interrogante qué mecanismos estarían modulando esta respuesta. En virtud de ello, un estudio futuro se podría enfocar en la caracterización del perfil de aminoácidos a través del canopeo, los cuales forman parte de la proteína, dado que existen evidencias de que la asparagina libre (aminoácido importante en el transporte y almacenamiento de nitrógeno en las plantas) aumenta en el estrato superior del canopeo, en el cual la concentración de proteína es mayor (Huber et al., 2016). Si pudiéramos identificar aminoácidos específicos que se correlacionan con mayor acumulación de proteína en un estrato que aporta a la gran parte de la generación del rendimiento (estrato medio y superior), podrían ser potencialmente utilizados como marcadores fisiológicos en planes de mejora genética en pos de aumentar la proteína en los granos.

Adicionalmente, encontramos variabilidad en la composición del aceite a través de los estratos del canopeo, aumentando la insaturación del mismo en el estrato inferior (más ácidos linoleico y linolénico) respecto del estrato superior. Los estreses podrían estar promoviendo cambios en el ambiente lumínico de las plantas, el cual se ha sugerido que estaría involucrado en la regulación de las diferencias en la composición del aceite. Una futura línea de investigación podría centrarse en el estudio del rol de la calidad de la luz (relación rojo-rojo-lejano) en la síntesis de ácidos grasos insaturados, con un enfoque específico en la actividad de la enzima citosólica omega-6-desaturasa que interviene en la conversión del ácido oleico en ácido linoleico. La caracterización detallada de la disponibilidad y calidad de luz a diferentes niveles del canopeo a través de mediciones como la cuantificación precisa de la intensidad lumínica y la composición espectral, permitiría relacionar la variación en la calidad de la luz con los cambios en la síntesis de ácidos grasos en los granos de soja.

El estudio de la dinámica de acumulación de tocoferoles y su relación con la expresión de genes claves implicados en su síntesis en respuesta al ET, EH y ET×EH abre nuevos interrogantes. Por un lado, sería interesante dilucidar si el aumento de la concentración de alfa tocoferol bajo las condiciones de estrés, los cuales se asociaron a incrementos en los niveles de expresión de los genes TMT en el genotipo Alim5.09 son extrapolables a otros genotipos. Considerando esto, sería interesante incorporar y comparar genotipos con concentraciones diferenciales de alfa tocoferol bajo las distintas condiciones de estrés abordadas en esta tesis, de forma tal de evaluar si la variabilidad observada en los niveles de expresión de los genes TMT es consistentemente atribuible al factor genotípico, es decir es del tipo genotipo-específico. Esto podría conducir a la identificación de marcadores genéticos asociados con la acumulación de alfa tocoferol bajo estrés, lo que permitiría una selección más precisa y eficiente de genotipos con esta característica deseable en términos nutracéuticos. Por otro lado, observamos que los genes MPBQ2 y MPBQ4 se sobreexpresaron solo en el estadio R5.5, estos genes codifican para la enzima MPBQ-MT que interviene indirectamente en la síntesis de alfa tocoferol (brindando precursores de gamma tocoferol), mientras que los genes TMT que codifican para la enzima gamma tocoferol metil transferasa, la cual está directamente involucrada en la conversión de gamma en alfa tocoferol, se sobreexpresaron durante todo el llenado de grano. Teniendo en cuenta esto, evaluar si existe un rol diferencial de los genes TMT1, TMT2 y TMT3 ante distintas condiciones de estrés abiótico sería interesante. Para profundizar en ello, se podría investigar la localización subcelular de las proteínas codificadas por TMT1, TMT2 y TMT3 utilizando marcadores fluorescentes y microscopía. Adicionalmente, explorar los mecanismos de regulación a nivel post-transcripcional y traduccional en la biosíntesis de tocoferoles, como se ha sugerido en estudios anteriores. El alfa tocoferol, es la isoforma con mayor actividad biológica como vitamina E en los seres humanos y reconocida por proporcionar beneficios de salud significativos para los consumidores. De esta manera, la mejora de la concentración de alfa tocoferol en los granos de soja tiene el potencial de enriquecer su valor nutricional. Avanzar en los análisis mencionados permitía complementar nuestros resultados y comprender, además, cómo estos genes contribuyen a la adaptación y posterior tolerancia de las plantas a diferentes tipos de estrés, y cómo podrían ser aprovechados en estrategias de mejora de cultivos resistentes al estrés abiótico.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, N., McDonald Jr, M., & Henderlong, P. (1989). The influence of seed position, planting and harvesting dates on soybean seed quality. *Seed Science and Technology*, 17(1), 143–152.
- Adams, C. A., Broman, T. H., & Rinne, R. W. (1982). Use of [3,4-14C]Glucose to Assess in vivo Competition for Phosphoenolpyruvate Between Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Pyruvate Kinase in Developing Soybean Seeds. *Plant and Cell Physiology*, 23(6), 959–965. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.PCP.A076449>
- Ainsworth, E. A., & Ort, D. R. (2010). How Do We Improve Crop Production in a Warming World? *Plant Physiology*, 154(2), 526–530. <https://doi.org/10.1104/PP.110.161349>
- Allen, R. G., Pereira, L. S., Raes, D., Smith, M., & Ab, W. (1998). Fao,1998. *Crop Evapotranspiration - Guidelines for Computing Crop Water Requirements - FAO Irrigation and Drainage Paper 56*.
- Almeida, J., Quadrana, L., Asís, R., Setta, N., De Godoy, F., Bermúdez, L., Otaiza, S. N., Corrêa Da Silva, J. V., Fernie, A. R., Carrari, F., & Rossi, M. (2011). Genetic dissection of vitamin e biosynthesis in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3781–3798. <https://doi.org/10.1093/jxb/err055>
- Almonor, G. O., Fenner, G. P., & Wilson, R. F. (1998). Temperature effects on tocopherol composition in soybeans with genetically improved oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1998 75:5, 75(5), 591–596. <https://doi.org/10.1007/S11746-998-0070-3>
- Andriani, J., Andrade, F., Suero, E., Dardanelli, J., Andriani, J., Andrade, F., Suero, E., & Dardanelli, J. (1991). *Water deficits during reproductive growth of soybeans . I . Their effects on dry matter accumulation , seed yield and its components of soybeans . Agronomie*, 11(9), 737-746.
- Aramburu Merlos, F., Monzon, J. P., Mercau, J. L., Taboada, M., Andrade, F. H., Hall, A. J., Jobbagy, E., Cassman, K. G., & Grassini, P. (2015). Potential for crop production increase in Argentina through closure of existing yield gaps. *Field Crops Research*, 184, 145–154. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2015.10.001>
- Artlip, T. S., Madison, J. T., & Setter, T. L. (1995). Water deficit in developing endosperm of maize: cell division and nuclear DNA endoreduplication. *Plant, Cell & Environment*, 18(9), 1034–1040. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1995.tb00614.x>
- Baldocchi, D. D., Verma, S. B., & Rosenberg, N. J. (1983). *Agricultural Meteorology*, 28 (1983) 321-337. 28(6883), 321–337.
- Barnabás, B., Jäger, K., & Fehér, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell and Environment*, 31(1), 11–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01727.x>
- Barros, V. R., Boninsegna, J. A., Camilloni, I. A., Chidiak, M., Magrín, G. O., & Rusticucci, M. (2015). Climate change in Argentina: Trends, projections, impacts and adaptation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 6(2), 151–169. <https://doi.org/10.1002/wcc.316>

- Bellaloui, N., & Gillen, A. M. (2010). Soybean seed protein, oil, fatty acids, N, and S partitioning as affected by node position and cultivar differences. *Agricultural Sciences*, *01*(03), 110–118. <https://doi.org/10.4236/as.2010.13014>
- Bellaloui, N., & Mengistu, A. (2008). Seed composition is influenced by irrigation regimes and cultivar differences in soybean. *Irrigation Science*, *26*(3), 261–268. <https://doi.org/10.1007/s00271-007-0091-y>
- Bellaloui, N., Reddy, K. N., & Mengistu, A. (2014). Drought and Heat Stress Effects on Soybean Fatty Acid Composition and Oil Stability. In *Processing and Impact on Active Components in Food*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00045-7>
- Bennett, J. O., Krishnan, A. H., Wiebold, W. J., & Krishnan, H. B. (2003). Positional Effect on Protein and Oil Content and Composition of Soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(23), 6882–6886. <https://doi.org/10.1021/jf0343711>
- Bergmüller, E., Porfirova, S., & Dörmann, P. (2003). Characterization of an Arabidopsis mutant deficient in γ -tocopherol methyltransferase. *Plant Molecular Biology*, *52*(6), 1181–1190. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000004307.62398.91>
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2013). Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3rd edition. In *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd Edition* (Vol. 9781461446). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>
- Bianculli, M. L., Aguirrezábal, L. A. N., Pereyra Irujo, G. A., & Echarte, M. M. (2016). Contribution of incident solar radiation on leaves and pods to soybean seed weight and composition. *European Journal of Agronomy*, *77*. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.03.002>
- Bielenberg, D. G., Miller, J. D., & Berg, V. S. (2003). Paraheliotropism in two Phaseolus species: Combined effects of photon flux density and pulvinus temperature, and consequences for leaf gas exchange. *Environmental and Experimental Botany*, *49*(2), 95–105. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00062-X](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00062-X)
- Blum, A. (1996). Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In *Drought Tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis*. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1299-6_8
- Blum, A. (1998). Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. *Euphytica*. <https://doi.org/10.1023/a:1018303922482>
- Board, J. E., & Tan Qiang. (1995). Assimilatory capacity effects on soybean yield components and pod number. *Crop Science*. <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500030035x>
- Borrás, L., Slafer, G. A., & Otegui, M. E. (2004). Seed dry weight response to source-sink manipulations in wheat, maize and soybean: A quantitative reappraisal. *Field Crops Research*, *86*(2–3), 131–146. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2003.08.002>
- Bosaz, L. B., Gerde, J. A., Borrás, L., Cipriotti, P. A., Ascheri, L., Campos, M., Gallo, S., & Rotundo,

- J. L. (2019). Management and environmental factors explaining soybean seed protein variability in central Argentina. *Field Crops Research*, 240. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.05.007>
- Boydak, E., Alpaslan, M., Hayta, M., Gerçek, S., & Simsek, M. (2002). Seed composition of soybeans grown in the Harran Region of Turkey as affected by row spacing and irrigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4718–4720. <https://doi.org/10.1021/jf0255331>
- Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218(4571), 443–448. <https://doi.org/10.1126/science.218.4571.443>
- Bramley, P. M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F. J., Manios, Y., Roxborough, H., ... & Wagner, K. H. (2009). Vitamin E: A critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 913–938. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8322.2009.00684.x>
- Brevedan, R. E., & Egli, D. B. (2003a). Short Periods of water stress during seed filling, leaf senescence, and \nyield of soybean. *Crop Sci.*, 43, 2083-2088.
- Brevedan, R. E., & Egli, D. B. (2003b). Short periods of water wtress during weed filling, leaf senescence, and yield of soybean. *Crop Science*, 43(6), 2083–2088. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.2083>
- Britz, S. J., & Cavins, J. F. (1993). Spectral quality during pod development modulates soybean seed fatty acid desaturation. *Plant, Cell & Environment*, 16(6), 719–725. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00491.x>
- Britz, S. J., & Kremer, D. F. (2002). Warm temperatures or drought during seed maturation increase free α -tocopherol in seeds of soybean (*Glycine Max* [L.] Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6058–6063. <https://doi.org/10.1021/jf0200016>
- Britz, S. J., Kremer, D. F., & Kenworthy, W. J. (2008). Tocopherols in soybean seeds: Genetic variation and environmental effects in field-grown crops. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(10), 931–936. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1286-y>
- Brouwer, C., Manual, M. H.-T., & 1986, U. (1986). Irrigation water management: irrigation water needs. *Training Manual*, 3, 1–5. <https://www.academia.edu/download/7341272/manual3.pdf>
- Cafaro, N., Menza, L., Pablo, J., Specht, J. E., Lindquist, J. L., Arkebauer, T. J., Graef, G., Grassini, P., Nacional, C., Científicas, D. I., Agrarias, F. D. C., Nacional, U., Integrada, U., & Glycine, L. (2019). Field Crops Research Nitrogen limitation in high-yield soybean: Seed yield , N accumulation , and N-use efficiency. *Field Crops Research*, 237(April), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.04.009>
- Carlson, J.B. and Lersten, N. R. (1987). Reproductive morphology. *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, In: Wilcox, J.R. (ed.) , 2nd edn. *Agronomy Monograph 16, Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA*, 95 – 134.
- Carpenter, A. P. (1979). Determination of tocopherols in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 56(7), 668–671. <https://doi.org/10.1007/BF02660070>
- Carrão-Panizzi, M. C., & Erhan, S. Z. (2007). Environmental and Genetic Variation of Soybean

- Tocopherol Content Under Brazilian Growing Conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(10), 921–928. <https://doi.org/10.1007/S11746-007-1128-3>
- Carrera, C., Martínez, M. J., Dardanelli, J., & Balzarini, M. (2009). Water deficit effect on the relationship between temperature during the seed fill period and soybean seed oil and protein concentrations. *Crop Science*, 49(3), 990–998. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.06.0361>
- Carrera, C., Martínez, M. J., Dardanelli, J., & Balzarini, M. (2011). Environmental variation and correlation of seed components in nontransgenic soybeans: Protein, oil, unsaturated fatty acids, tocopherols, and isoflavones. *Crop Science*, 51(2), 800–809. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.06.0314>
- Carrera, C.S., Carrão Panizzi, M.C., Gontijo Mandarino, J.M., Leite, R.S., Ergo, V.V., Andrade F., Parola R., Lascano R.H., Vega C.R.C. Relationship between soybean industrial-nutritional quality and the assimilate source under heat and water stress during seed filling. VII Congresso Brasileiro de Soja - Mercosoja 2015. Florianópolis, Brasil.
- Carrera, Constanza S., & Dardanelli, J. L. (2017). Water Deficit Modulates the Relationship between Temperature and Unsaturated Fatty Acid Profile in Soybean Seed Oil. *Crop Science*, 57(6), 3179–3189. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI2017.04.0214>
- Carrera, Constanza S., Dardanelli, J. L., & Soldini, D. O. (2014a). Chemical compounds related to nutraceutical and industrial qualities of non-transgenic soybean genotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(7), 1463–1469. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6451>
- Carrera, Constanza S., Dardanelli, J. L., & Soldini, D. O. (2014b). Genotypic and environmental variation in seed nutraceutical and industrial composition of non-transgenic soybean (*Glycine max*) genotypes. *Crop and Pasture Science*, 65(12), 1311–1322. <https://doi.org/10.1071/CP14114>
- Carrera, Constanza S., Rosas, M. B., Gontijo Mandarino, J. M., Leite, R. S., Raspa, F., Fava, F., Dardanelli, J., & Andrade, F. (2022). Partial and total defoliation during the filling period affected grain industrial and nutraceutical quality in soybean. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(10), 4109–4120. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11760>
- Carrera, Constanza S., & Seguin, P. (2016a). Factors Affecting Tocopherol Concentrations in Soybean Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(50), 9465–9474. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03902>
- Carrera, Constanza S., & Seguin, P. (2016b). Factors Affecting Tocopherol Concentrations in Soybean Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(50), 9465–9474. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03902>
- Carrera, Constanza S., Solís, S. M., Ferrucci, M. S., Vega, C. C. R., Galati, B. G., Ergo, V., Andrade, F. H., & Lascano, R. H. (2021). Leaf structure and ultrastructure changes induced by heat stress and drought during seed filling in field-grown soybean and their relationship with grain yield. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 93(3), 1–27. <https://doi.org/10.1590/0001-37652021xxxx>

- Carrera, Constanza S, Salvagiotti, F., & Ciampitti, I. A. (2021). *Benchmarking Nutraceutical Soybean Composition Relative to Protein and Oil*. 8(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.663434>
- Carrera, Constanza Soledad, Reynoso, C. M., Funes, G. J., Martinez, M. J., Dardanelli, J., & Resnik, S. L. (2011). Amino acid composition of soybean seeds as affected by climatic variables. *Pesq. Agropec. Bras.*, 46(12), 1579–1587. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011001200001>
- Carreras, M. E., Fuentes, E., & Guzman, C. A. (1989). Chemotaxonomy of seed lipids of Cucurbitaceae grown in Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*, 17(4), 287–291. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-1978\(89\)90004-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-1978(89)90004-5)
- Casali, L., Herrera, J. M., & Rubio, G. (2021). Modeling maize and soybean responses to climatic change and soil degradation in a region of South America. *Agronomy Journal*, 113(2), 1381–1393. <https://doi.org/10.1002/agj2.20585>
- Cassel, D. K., & Nielsen, D. R. (1986). Field capacity and available water capacity. *Methods of Soil Analysis, Part 1: Physical and Mineralogical Methods*, 5, 901–926. <https://doi.org/10.2136/SSSABOOKSER5.1.2ED.C36>
- Chakrabarti, B., Singh, S. D., Kumar, V., Harit, R. C., & Misra, S. (2013). Growth and yield response of wheat and chickpea crops under high temperature. *Indian Journal of Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1007/s40502-013-0002-6>
- Cheesbrough, T. M. (1989). Changes in the Enzymes for Fatty Acid Synthesis and Desaturation during Acclimation of Developing Soybean Seeds to Altered Growth Temperature. *Plant Physiology*, 90(2), 760–764. <https://doi.org/10.1104/PP.90.2.760>
- Chen, D. F., Zhang, M., Wang, Y. Q., & Chen, X. W. (2012). Expression of γ -tocopherol methyltransferase gene from *Brassica napus* increased α -tocopherol content in soybean seed. *Biologia Plantarum*, 56(1), 131–134. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0028-z>
- Chennupati, P., Seguin, P., Chamoun, R., & Jabaji, S. (2012). Effects of high-temperature stress on soybean isoflavone concentration and expression of key genes involved in isoflavone synthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(51), 12421–12427. <https://doi.org/10.1021/jf3036319>
- Chennupati, P., Seguin, P., & Liu, W. (2011). Effects of high temperature stress at different development stages on soybean isoflavone and tocopherol concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13081–13088. <https://doi.org/10.1021/jf2037714>
- Ciampitti, I. (2017). Soybean Growth and Development. Disponible en <https://www.bookstore.ksre.ksu.edu/pubs/MF3339.pdf>
- Collins, F. I., & Cartter, J. L. (1956). Variability in Chemical Composition of Seed From Different Portions of the Soybean Plant1. *Agronomy Journal*, 48(5), 216–219. <https://doi.org/10.2134/AGRONJ1956.00021962004800050006X>
- Dardanelli, J. L., Balzarini, M., Martínez, M. J., Cuniberti, M., Resnik, S., Ramunda, S. F., Herrero, R.,

- & Baigorri, H. (2006). Soybean maturity groups, environments, and their interaction define mega-environments for seed composition in Argentina. *Crop Science*, *46*(5), 1939–1947. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.12-0480>
- De Souza, P. I., Egli, D. B., & Bruening, W. P. (1997). Water stress during seed filling and leaf senescence in soybean. *Agronomy Journal*, *89*(5), 807–812. <https://doi.org/10.2134/agronj1997.00021962008900050015x>
- Di Mauro, G., Borrás, L., Rugeroni, P., & Rotundo, J. L. (2019). Exploring soybean management options for environments with contrasting water availability. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *205*(3), 274–282. <https://doi.org/10.1111/jac.12321>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2014). *InfoStat*. Grupo Infoestat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dias, A. S., & Lidon, F. C. (2009). Evaluation of grain filling rate and duration in bread and durum wheat, under heat stress after anthesis. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *195*(2), 137–147. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2008.00347.x>
- Dias, M. C., Correia, S., Serôdio, J., Silva, A. M. S., Freitas, H., & Santos, C. (2018). Chlorophyll fluorescence and oxidative stress endpoints to discriminate olive cultivars tolerance to drought and heat episodes. *Scientia Horticulturae*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.007>
- Djanaguiraman, M., Prasad, P. V. V., Boyle, D. L., & Schapaugh, W. T. (2011). High-temperature stress and soybean leaves: Leaf anatomy and photosynthesis. *Crop Science*, *51*(5), 2125–2131. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.10.0571>
- Dolde, D., Vlahakis, C., & Hazebroek, J. (1999). Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition, and temperature during development. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *76*(3), 349–355. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0242-9>
- Dornbos, D. L., & Mullen, R. E. (1992). Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adjustments by drought and temperature. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *69*(3), 228–231. <https://doi.org/10.1007/BF02635891>
- Dornbos Jr., D. L., & Mullen, R. E. (1991). Influence of stress during soybean seed fill on seed weight, germination, and seedling growth rate. *Canadian Journal of Plant Science*, *71*, 373–383. <https://doi.org/10.4141/cjps91-052>
- Dwiyanti, Maria S., Yamada, T., Sato, M., Abe, J., & Kitamura, K. (2011). Genetic variation of γ -tocopherol methyltransferase gene contributes to elevated α -tocopherol content in soybean seeds. *BMC Plant Biology*, *11*. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-152>
- Dwiyanti, Maria Stefanie, Ujiie, A., Thuy, L. T. B., Yamada, T., & Kitamura, K. (2007). Genetic analysis of high α -tocopherol content in soybean seeds. *Breeding Science*, *57*(1), 23–28. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.57.23>
- Echarte, M. M., Alberdi, I., & Aguirrezábal, L. A. N. (2012). Post-flowering assimilate availability regulates oil fatty acid composition in sunflower grains. *Crop Science*, *52*(2), 818–829.

- <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.09.0477>
- Egli, D. B. (1981). Species differences in seed growth characteristics. *Field Crops Research*. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(81\)90049-6](https://doi.org/10.1016/0378-4290(81)90049-6)
- Egli, D. B. (1997). Cultivar maturity and response of soybean to shade stress during seed filling. *Field Crops Research*. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00005-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00005-1)
- Egli, D. B. (1998). Seed Biology and the Yield of Grain Crops. By D. B. Egli. Wallingford, UK: CAB INTERNATIONAL (1998), pp. 178. In *Experimental Agriculture*. <https://doi.org/10.1017/s0014479799273115>
- Egli, D. B. (2006). The role of seed in the determination of yield of grain crops. In *Australian Journal of Agricultural Research*. <https://doi.org/10.1071/AR06133>
- Egli, D. B. (2017). Seed growth and development. In *Seed biology and yield of grain crops*. <https://doi.org/10.1079/9781780647708.0018>
- Egli, D. B., & Bruening, W. P. (2004). Water stress, photosynthesis, seed sucrose levels and seed growth in soybean. *Journal of Agricultural Science*, 142(1), 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0021859604004095>
- Egli, D. B., & Bruening, W. P. (2007). Nitrogen accumulation and redistribution in soybean genotypes with variation in seed protein concentration. *Plant and Soil*, 301(1–2), 165–172. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9434-y>
- Egli, D. B., Duncan, W. G., & Crafts-Brandner, S. J. (1987). Effect of Physical Restraint on Seed Growth in Soybean1. *Crop Science*, 27(2), 289. <https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183x002700020034x>
- Egli, D. B., Leggett, J. E., & Wood, J. M. (1978). Influence of soybean seed size and position on the rate and duration of filling. *Agronomy Journal*, 70(1), 127–130. <https://doi.org/10.2134/agronj1978.00021962007000010029x>
- Egli, D. B., Ramseur, E. L., Zhen-Wen, Y., & Sullivan, C. H. (1989). Source-sink alterations affect the number of cells in soybean cotyledons. *Crop Science*. <https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900030039x>
- Egli, D. B., TeKrony, D. M., Heitholt, J. J., & Rupe, J. (2005). Air temperature during seed filling and soybean seed germination and vigor. *Crop Science*, 45(4), 1329–1335. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0029>
- Egli, D. B., & Wardlaw, I. F. (1980). Temperature Response of Seed Growth Characteristics of Soybeans. *Agronomy Journal*, 72(3), 560–564. <https://doi.org/10.2134/agronj1980.00021962007200030036x>
- Elli, E. F., Ciampitti, I. A., Castellano, M. J., Purcell, L. C., Naeve, S., Grassini, P., La Menza, N. C., Moro Rosso, L., de Borja Reis, A. F., Kovács, P., & Archontoulis, S. V. (2022). Climate Change and Management Impacts on Soybean N Fixation, Soil N Mineralization, N₂O Emissions, and Seed Yield. *Frontiers in Plant Science*, 13(April), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.849896>

- Ergo, V. V., Lascano, R., Vega, C. R. C., Parola, R., & Carrera, C. S. (2018). Heat and water stressed field-grown soybean: A multivariate study on the relationship between physiological-biochemical traits and yield. *Environmental and Experimental Botany*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.023>
- Ergo, V. V., Veas, R. E., Vega, C. R. C., Lascano, R., & Carrera, C. S. (2021). Leaf photosynthesis and senescence in heated and droughted field-grown soybean with contrasting seed protein concentration. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166(June), 437–447. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.008>
- Escalante, E. E., & Wilcox, J. R. (1993). Variation in seed protein among nodes of determinate and indeterminate soybean near-isolines. *Crop Science*, 33(6), 1166–1168. <https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300060012x>
- Escalante, Eduardo E., & Wilcox, J. R. (1993). Variation in Seed Protein among Nodes of Normal- and High-Protein Soybean Genotypes. *Crop Science*, 33(6), 1164–1166. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI1993.0011183X003300060011X>
- Evans, J. R. (1989). Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia*, 78(1), 9–19.
- Falk, J., & Munne, S. (2010). *Tocochromanol functions in plants : antioxidation and beyond*. 61(6), 1549–1566. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq030>
- Fehr, W. R., Caviness, C. E., & Vorst, J. J. (1977). Response of Indeterminate and Determinate Soybean Cultivars to Defoliation and Half-plant Cut-off1. *Crop Science*, 17(6), 913. <https://doi.org/10.2135/cropsci1977.0011183X001700060024x>
- Fehr, Walter R., & Caviness, C. E. (1977). Stages of Soybean Development. In *Special report*.
- Ferris, R., Wheeler, T. R., Ellis, R. H., & Hadley, P. (1999). Seed yield after environmental stress in soybean grown under elevated CO₂. *Crop Science*. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X003900030018x>
- Foroud, N., Mundel, H.-H., Saindon, G., & Entz, T. (1993). Effect of level and timing of moisture stress on soybean yield, protein, and oil responses. *Field Crops Research*, 31(3), 195–209. http://www.sciencedirect.com/science?_ob=GatewayURL&_origin=ScienceSearch&_method=citationSearch&_piikey=037842909390062R&_version=1&_returnURL=&md5=d340307c7992ae35223f2797702b9fb9
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28(8), 1056–1071. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x>
- Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155(1), 93–100. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166181>
- Frankel, E. N. (1989). The antioxidant and nutritional effects of tocopherols, ascorbic acid and beta-

- carotene in relation to processing of edible oils. *Bibliotheca Nutritio et Dieta*, 43, 297–312. <https://doi.org/10.1159/000416714>
- Frederick, J. R., Woolley, J. T., Hesketh, J. D., & Peters, D. B. (1991). Seed yield and agronomic traits of old and modern soybean cultivars under irrigation and soil water-deficit. *Field Crops Research*, 27(1–2), 71–82. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(91\)90023-O](https://doi.org/10.1016/0378-4290(91)90023-O)
- Fryer, M. J. (1992). The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α -tocopherol). *Plant, Cell & Environment*, 15(4), 381–392. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1992.tb00988.x>
- Fukuzawa, K., Takase, S., & Tsukatani, H. (1985). The effect of concentration on the antioxidant effectiveness of α -tocopherol in lipid peroxidation induced by superoxide free radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 240(1), 117–120.
- Fukuzawa, K., Tokumura, A., Ouchi, S., & Tsukatani, H. (1982). Antioxidant activities of tocopherols on Fe²⁺-ascorbate-induced lipid peroxidation in lecithin liposomes. *Lipids*, 17(7), 511–513.
- Gabriel, K. R. (1971). The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika*, 58(3), 453–467. <https://doi.org/10.1093/BIOMET/58.3.453>
- Gallardo, K., Thompson, R., & Burstin, J. (2008). Reserve accumulation in legume seeds. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(10), 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.017>
- Gallo, K. P., & Daughtry, C. S. T. (1986). Techniques for Measuring Intercepted and Absorbed Photosynthetically Active Radiation in Corn Canopies 1. *Agronomy Journal*, 78(4), 752–756. <https://doi.org/10.2134/agronj1986.00021962007800040039x>
- Gálvez-Valdivieso, G., Cardeñosa, R., Vera, J. M., Pineda, M., & Aguilar, M. (2011). γ -Tocopherol methyltransferase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Functional characterization and expression analysis. *Physiologia Plantarum*, 143(4), 316–328. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01507.x>
- Gao, J., Hao, X., Thelen, K. D., & Robertson, G. P. (2009). Agronomic management system and precipitation effects on soybean oil and fatty acid profiles. *Crop Science*, 49(3), 1049–1057. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.08.0497>
- Gbikpi, P. J., & Crookston, R. K. (1981). Effect of Flowering Date on Accumulation of Dry Matter and Protein in Soybean Seeds¹. *Crop Science*. <https://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183x002100050003x>
- Ghassemi-Golezani, K., & Lotfi, R. (2013). Influence of Water Stress and Pod Position on Oil and Protein Accumulation in Soybean Grains. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(9), 2341–2345.
- Gibson, L. R., & Mullen, R. E. (1996). Soybean seed quality reductions by high day and night temperature. *Crop Science*, 36(6), 1615–1619. <https://doi.org/10.2135/cropsci1996.0011183X003600060034x>
- Gifford, R. M., Thorne, J. H., Hitz, W. D., & Giaquinta, R. T. (1984). Crop productivity and photoassimilate partitioning. *Science*, 225(4664), 801–808.

<https://doi.org/10.1126/science.225.4664.801>

- González Belo, R., Nolasco, S., Mateo, C., & Izquierdo, N. (2017). Dynamics of oil and tocopherol accumulation in sunflower grains and its impact on final oil quality. *European Journal of Agronomy*, 89(August), 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2017.06.003>
- Gosse, G., Varlet-Grancher, C., Bonhomme, R., Chartier, M., Allirand, J.-M., & Lemaire, G. (1986). Maximum dry matter production and solar radiation intercepted by a canopy. *Agronomie*, 6(1), 47–56. https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:46045016
- Goulart, H. M. D., van der Wiel, K., Folberth, C., Boere, E., & van den Hurk, B. (2023). Increase of Simultaneous Soybean Failures Due To Climate Change. *Earth's Future*, 11(4), 1–14. <https://doi.org/10.1029/2022EF003106>
- Graef, G., Lavallee, B. J., Tenopir, P., Tat, M., Schweiger, B., Kinney, A. J., Van Gerpen, J. H., & Clemente, T. E. (2009). A high-oleic-acid and low-palmitic-acid soybean: Agronomic performance and evaluation as a feedstock for biodiesel. *Plant Biotechnology Journal*, 7(5), 411–421. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00408.x>
- Grusak, M., biology, D. D.-A. review of plant, & 1999, undefined. (1999). Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annualreviews.Org*, 50, 133–161. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.133>
- Guiamét, J. J., Tyystjärvi, E., Tyystjärvi, T., John, I., Kairavuo, M., Pichersky, E., & Noodén, L. D. (2002). Photoinhibition and loss of photosystem II reaction centre proteins during senescence of soybean leaves. Enhancement of photoinhibition by the “stay-green” mutation *cytG*. *Physiologia Plantarum*, 115(3), 468–478. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150317.x>
- Gunes, A., Cicek, N., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Guneri, E., & Guzelordu, T. (2006). Genotypic response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars to drought stress implemented at pre- and post-anthesis stages and its relations with nutrient uptake and efficiency. *Plant, Soil and Environment*, 52(8), 368–376. <https://doi.org/10.17221/3454-pse>
- Gunstone, F. D., Harwood, J. L., & Harwood, J. L. (2007). Occurrence And Characterisation Of Oils And Fats. *The Lipid Handbook with CD-ROM*, 51–156. <https://doi.org/10.1201/9781420009675-6>
- Hampton, J. G., Kahre, L., Van Gastel, A. J. G., Boyce, K. G., Leist, N., Wu, S., Loubser, W., & Van Der Burg, W. J. (1996). Quality seed-from production to evaluation. In *Seed Science and Technology*.
- Hass, C. G., Tang, S., Leonard, S., Traber, M. G., Miller, J. F., & Knapp, S. J. (2006). Three non-allelic epistatically interacting methyltransferase mutations produce novel tocopherol (vitamin E) profiles in sunflower. *Springer*, 113(5), 767–782. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0320-4>
- Hayati, R., Egli, D. B., & Crafts-Brandner, S. J. (1996). Independence of nitrogen supply and seed growth in soybean: studies using an in vitro culture system. *Journal of Experimental Botany*, 47(1), 33–40. <https://doi.org/10.1093/JXB/47.1.33>

- Helms, T. C., & Orf, J. H. (1998). Protein, Oil, and Yield of Soybean Lines Selected for Increased Protein. *Crop Science*, 38(3), 707–711. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI1998.0011183X003800030015X>
- Hernández-Sebastià, C., Marsolais, F., Saravitz, C., Israel, D., Dewey, R. E., & Huber, S. C. (2005). Free amino acid profiles suggest a possible role for asparagine in the control of storage-product accumulation in developing seeds of low- and high-protein soybean lines. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1951–1963. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri191>
- Hiebsch, C. K., Kanemasu, E. T., Nickell, C. D., & Nrcrau, E. T. (1976). EXCHANGE , WATER USE , AND WATER-USE EFFICIENCY There were no significant differences in. 458(1478), 455–458.
- Hirata, M., Ishii, R., Kumura, A., & Murata, Y. (1983). Photoinhibition of Photosynthesis in Soybean Leaves: II. Leaf orientation-adjusting movement as a possible avoiding mechanism of photoinhibition. *Japanese Journal of Crop Science*, 52(3), 319–322.
- Holden, M. J., Norman, H. A., & Britz, S. J. (1994). Spectral quality during pod development affects omega-6 desaturase activity in soybean seed endoplasmic reticulum. *Physiologia Plantarum*, 91(2), 346–351. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb00443.x>
- Hoppe, P. P., & Krennrich, G. (2000). Bioavailability and potency of natural-source and all-racemic -tocopherol in the human: a dispute. *European Journal of Nutrition*, 39(5), 183. <https://search.proquest.com/openview/8603625062e3c93f1023107eb8a1abdc/1?pq-origsite=gscholar&cbl=34175>
- Hossain, M. M., Liu, X., Qi, X., Lam, H. M., & Zhang, J. (2014). Differences between soybean genotypes in physiological response to sequential soil drying and rewetting. *Crop Journal*, 2(6), 366–380. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2014.08.001>
- Huber, S C, Rogers, H., & Israel, D. W. (1984). Effects of CO2 enrichment on photosynthesis and photosynthate partitioning in soybean (*Glycine max*) leaves. *Physiologia Plantarum*, 62(1), 95–101.
- Huber, Steven C., Li, K., Nelson, R., Ulanov, A., DeMuro, C. M., & Baxter, I. (2016). Canopy position has a profound effect on soybean seed composition. *PeerJ*, 4, e2452. <https://doi.org/10.7717/peerj.2452>
- Hunter, S. C., & Cahoon, E. B. (2007). Enhancing vitamin E in oilseeds: Unraveling tocopherol and tocotrienol biosynthesis. *Lipids*, 42(2), 97–108. <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3028-6>
- Hymowitz, T., Collins, F. I., Panczner, J., & Walker, W. M. (1972). Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. *Agronomy Journal*, 64, 613–616. <https://doi.org/10.2134/agronj1972.00021962006400050019x>
- Illipronti, R. A., Lommen, W. J. M., Langerak, C. J., & Struik, P. C. (2000). Time of pod set and seed position on the plant contribute to variation in quality of seeds within soybean seed lots. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 48(2), 165–180. [https://doi.org/10.1016/S1573-5214\(00\)80012-3](https://doi.org/10.1016/S1573-5214(00)80012-3)

- Inamullah, & Isoda, A. (2005). Adaptive responses of soybean and cotton to water stress II. Changes in CO₂ assimilation rate, chlorophyll fluorescence and photochemical reflectance index in relation to leaf temperature. *Plant Production Science*, 8(2), 131–138. <https://doi.org/10.1626/pp.8.131>
- IPCC, I. P. on C. C. (2018). IPCC Special Report 2018 - Chapter 3 - Impacts of 1.5°C of Global Warming on Natural and Human Systems. *IPCC SPECIAL REPORT Global Warming of 1.5 °C*.
- IPCC, 2023: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 1-34, doi: 10.59327/IPCC/AR6-9789291691647.001
- Izquierdo, N., Aguirrezábal, L., Andrade, F., & Pereyra, V. (2002). Night temperature affects fatty acid composition in sunflower oil depending on the hybrid and the phenological stage. *Field Crops Research*, 77(2–3), 115–126. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(02\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(02)00060-6)
- Izquierdo, N. G., Aguirrezábal, L. A. N., Andrade, F. H., Geroudet, C., Valentinuz, O., & Pereyra Iraola, M. (2009a). Intercepted solar radiation affects oil fatty acid composition in crop species. *Field Crops Research*, 114(1), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.07.007>
- Izquierdo, N. G., Aguirrezábal, L. A. N., Andrade, F. H., Geroudet, C., Valentinuz, O., & Pereyra Iraola, M. (2009b). Intercepted solar radiation affects oil fatty acid composition in crop species. *Field Crops Research*, 114(1), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.07.007>
- Izquierdo, N. G., Nolasco, S., Mateo, C., Santos, D., & Aguirrezbal, L. A. N. (2011). Relationship between oil tocopherol concentration and oil weight per grain in several crop species. *Crop and Pasture Science*, 62(12), 1088–1097. <https://doi.org/10.1071/CP11313>
- Jackson, R. D., Idso, S. B., Reginato, R. J., & Pinter Jr, P. J. (1981). Canopy temperature as a crop water stress indicator. *Water Resources Research*, 17(4), 1133–1138.
- Jenner, C., Ugalde, T., & Aspinall, D. (1991). The Physiology of Starch and Protein Deposition in the Endosperm of Wheat. *Functional Plant Biology*, 18(3), 211–226. <https://doi.org/10.1071/PP9910211>
- Johnson, I. R., Thornley, J. H. M., Frantz, J. M., & Bugbee, B. (2010). A model of canopy photosynthesis incorporating protein distribution through the canopy and its acclimation to light, temperature and CO₂. *Annals of Botany*, 106(5), 735–749.
- Jolliffe, I. T., & Cadima, J. (2016). Principal component analysis: A review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2065). <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>
- Jumrani, K., & Singh, V. (2018). Impact of combined stress of high temperature and water deficit on growth and seed yield of soybean. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(1), 37–50. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0480-5>
- Jung, M., & Min, D. B. (1990). Effects of α -, γ -, and δ -tocopherols on oxidative stability of soybean

- oil. *Journal of Food Science*, 55(5), 1464–1465.
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L. Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671–701. <https://doi.org/10.1007/BF02522884>
- Karr-Lilienthal, L. K., Grieshop, C. M., Merchen, N. R., Mahan, D. C., & Fahey, G. C. (2004). Chemical composition and protein quality comparisons of soybeans and soybean meals from five leading soybean-producing countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6193–6199. <https://doi.org/10.1021/jf049795+>
- Kaur, J., Sandhu, S. S., & Sharma, S. (2021). Yield response of wheat grown under periodic heat stress imposed by using mini heat tents. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 207(2), 285–303. <https://doi.org/10.1111/jac.12474>
- Keigley, P. J., & Mullen, R. E. (1986). Changes in Soybean Seed Quality from High Temperature during Seed Fill and Maturation1. *Crop Science*. <https://doi.org/10.2135/cropsci1986.0011183x002600060028x>
- Kim, J., Slafer, G. A., & Savin, R. (2021). Are portable polyethylene tents reliable for imposing heat treatments in field-grown wheat? *Field Crops Research*, 271(January). <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108206>
- Knizia, D., Yuan, J., Lakhssassi, N., El Baze, A., Cullen, M., Vuong, T., Mazouz, H., Nguyen, H. T., Kassem, M. A., & Meksem, K. (2022). QTL and Candidate Genes for Seed Tocopherol Content in ‘Forrest’ by ‘Williams 82’ Recombinant Inbred Line (RIL) Population of Soybean. *Plants*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/plants11091258>
- Koch, M., Lemke, R., Heise, K. P., & Mock, H. P. (2003). Characterization of γ -tocopherol methyltransferases from *Capsicum annuum* L and *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*, 270(1), 84–92. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03364.x>
- Konda, A. R., Nazarenus, T. J., Nguyen, H., Yang, J., Gelli, M., Swenson, S., Shipp, J. M., Schmidt, M. A., Cahoon, R. E., Ciftci, O. N., Zhang, C., Clemente, T. E., & Cahoon, E. B. (2020). Metabolic engineering of soybean seeds for enhanced vitamin E tocopherol content and effects on oil antioxidant properties in polyunsaturated fatty acid-rich germplasm. *Metabolic Engineering*, 57, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.10.005>
- Kono, N., Ohto, U., Hiramatsu, T., Urabe, M., Uchida, Y., Satow, Y., & Arai, H. (2013). Impaired α -TTP-PIP₂ interaction underlies familial vitamin E deficiency. *Science*, 340(6136), 1106–1110. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1233508/SUPPL_FILE/KONO.SM.PDF
- Kumar, V., Rani, A., Dixit, A. K., Bhatnagar, D., & Chauhan, G. S. (2009). Relative changes in tocopherols, isoflavones, total phenolic content, and antioxidative activity in soybean seeds at different reproductive stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2705–2710. <https://doi.org/10.1021/jf803122a>
- Kumar, V., Rani, A., Solanki, S., & Hussain, S. M. (2006). Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. *Journal of Food*

- Composition and Analysis*, 19(2–3), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.06.005>
- Kumudini, S. (2002). Trials and tribulations: A review of the role of assimilate supply in soybean genetic yield improvement. *Field Crops Research*. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(02\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(02)00027-8)
- Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., Neter, J., Li, W., McGraw-Hill, wa, Burr Ridge, B., Dubuque, I., Madison, I., & New York San Francisco St Louis Bangkok Bogota Caracas Kuala Lumpur Lisbon London Madrid Mexico City Milan Montreal New Delhi Santiago Seoul Singapore Sydney Taipei Toronto, W. (2005). *Applied linear statistical models*. <https://thuvienso.hoasen.edu.vn/handle/123456789/9564>
- Lawlor, D. W. (1995). The effects of water deficit on photosynthesis. *Environment and Plant Metabolism*, 129–160.
- Leffel, R. C., Cregan, P. B., Bolgiano, A. P., & Thibau, D. J. (1992). Nitrogen Metabolism of Normal and High-Seed-Protein Soybean. *Crop Science*, 32(3), 747–750. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI1992.0011183X003200030034X>
- Leport, L., Turner, N. C., Davies, S. L., & Siddique, K. H. M. (2006). Variation in pod production and abortion among chickpea cultivars under terminal drought. *European Journal of Agronomy*, 24(3), 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2005.08.005>
- Li, H., Liu, H., Han, Y., Wu, X., Teng, W., Liu, G., & Li, W. (2010). Identification of QTL underlying vitamin E contents in soybean seed among multiple environments. *Theoretical and Applied Genetics*, 120, 1405–1413.
- Li, R., Wen, T., Tang, Y., & Xia, C. (2014). Effect of shading on photosynthetic and chlorophyll fluorescence characteristics of soybean. *Acta Prataculturae Sinica*, 23(6), 198. <http://cyxb.magtech.com.cn/EN/10.11686/cyxb20140624>
- Liener, I. E. (1994). Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(1), 31–67. <https://doi.org/10.1080/10408399409527649>
- Liu, H., Cao, G., Wu, D., Jiang, Z., Han, Y., & Li, W. (2017). Quantitative trait loci underlying soybean seed tocopherol content with main additive, epistatic and QTL × environment effects. *Plant Breeding*, 136(6), 924–938. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pbr.12534>
- Liu, T. D., & Song, F. B. (2012). Maize photosynthesis and microclimate within the canopies at grain-filling stage in response to narrow-wide row planting patterns. *Photosynthetica*, 50(2), 215–222. <https://doi.org/10.1007/s11099-012-0011-0>
- Lobell, D. B., Schlenker, W., & Costa-Roberts, J. (2011). Climate trends and global crop production since 1980. *Science*, 333(6042), 616–620. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1204531/SUPPL_FILE/LOBELL.SOM.REVISED2.PDF
- Loomis, R. S., & Connor, D. J. (1992). *Crop ecology: productivity and management in agricultural systems*. 538.
- Lopez, F. B., Chauhan, Y. S., & Johansen, C. (1997). Effects of timing of drought stress on leaf area

- development and canopy light interception of short-duration pigeonpea. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 178(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.1997.tb00344.x>
- Ma, J., Qiu, D., & Pang, Y. (2020). *Diverse roles of tocopherols in response to abiotic and biotic stresses and strategies for genetic biofortification in plants.*
- Maddonni, G. A., & Otegui, M. E. (1996). Leaf area, light interception, and crop development in maize. *Field Crops Research*, 48(1), 81–87. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(96\)00035-4](https://doi.org/10.1016/0378-4290(96)00035-4)
- Maestri, D., & Guzmán, C. (1993). Chemical composition of tobacco seeds (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61(2), 227–230. <https://doi.org/10.1007/BF02660305>
- Maestri, D. M., Labuckas, D. O., Meriles, J. M., Lamarque, A. L., Zygadlo, J. A., & Guzmán, C. A. (1998). Seed composition of soybean cultivars evaluated in different environmental regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(4), 494–498. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199808\)77:4<494::AID-JSFA69>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199808)77:4<494::AID-JSFA69>3.0.CO;2-B)
- Martre, P. (2003). Modeling Grain Nitrogen Accumulation and Protein Composition to Understand the Sink/Source Regulations of Nitrogen Remobilization for Wheat. *Plant Physiology*, 133(4), 1959–1967. <https://doi.org/10.1104/pp.103.030585>
- Meckel, L., Egli, D. B., Phillips, R. E., Radcliffe, D., & Leggett, J. E. (1984). Effect of Moisture Stress on Seed Growth in Soybeans 1. *Agronomy Journal*. <https://doi.org/10.2134/agronj1984.00021962007600040033x>
- Medic, J., Atkinson, C., & Hurburgh, C. R. (2014). Current knowledge in soybean composition. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(3), 363–384. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2407-9>
- Mercau, J. L., Dardanelli, J. L., Collino, D. J., Andriani, J. M., Irigoyen, A., & Satorre, E. H. (2007). Predicting on-farm soybean yields in the pampas using CROPGRO-soybean. *Field Crops Research*, 100(2–3), 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.07.006>
- Messina, M. J. (1999). Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3 SUPPL.). <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.3.439s>
- Miceli, F., Crafts-Brandner, S. J., & Egli, D. B. (1995). Physical restriction of pod growth alters development of soybean plants. *Crop Science*. <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500040027x>
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002>
- Molino, J. (2011). Estrés térmico por alta temperatura en soja (*Glycine max* (L.) Merr.): análisis de la dinámica de producción y fijación de vainas y su efecto sobre la determinación del rendimiento. *Tesis de Maestría de La Universidad de Buenos Aires.*
- Monteith, J. L. (1972). Solar Radiation and Productivity in Tropical Ecosystems. *The Journal of Applied Ecology*, 9(3), 747. <https://doi.org/10.2307/2401901>

- Monteith, J. L., & Moss, C. J. (1977). Climate and the efficiency of crop production in Britain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 281(980), 277–294. <https://doi.org/10.1098/rstb.1977.0140>
- Moro Rosso, L. H., de Borja Reis, A. F., & Ciampitti, I. A. (2021). Vertical Canopy Profile and the Impact of Branches on Soybean Seed Composition. *Frontiers in Plant Science*, 12(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.725767>
- Munier-Jolain, N., Biarnès, V., Chaillet, I., Lecoeur, J., Jeuffroy, M.-H., Carrouée, B., Crozat, Y., Guilioni, L., Lejeune, I., Tivoli, B., Jeuffroy, M.-H., Lecoeur, J., & Roche, R. (2010). The seed number. In *Physiology of the Pea Crop*. <https://doi.org/10.1201/b10504-7>
- Munier-Jolain, N., Biarnès, V., Chaillet, I., Lecoeur, J., Jeuffroy, M. H., Carrouée, B., Crozat, Y., Guilioni, L., Lejeune, I., & Tivoli, B. (2010). Physiology of the pea crop. In *Physiology of the Pea Crop*. <https://doi.org/10.1201/b10504>
- Munier-Jolain, N. G., & Ney, B. (1998). Seed growth rate in grain legumes II. Seed growth rate depends on cotyledon cell number. *Journal of Experimental Botany*, 49(329), 1971–1976. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.329.1971>
- Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2002). The Function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(1), 31–57. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044179>
- Nakagawa, A. C. S., Itoyama, H., Ariyoshi, Y., Ario, N., Tomita, Y., Kondo, Y., Iwaya-Inoue, M., & Ishibashi, Y. (2018). Drought stress during soybean seed filling affects storage compounds through regulation of lipid and protein metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(6), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2683-y>
- Neiff, N., Trachsel, S., Valentinuz, O. R., Balbi, C. N., & Andrade, F. H. (2016). High temperatures around flowering in maize: Effects on photosynthesis and grain yield in three genotypes. *Crop Science*. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.12.0755>
- Nico, M. (2016). Mecanismos asociados a la producción de granos en soja frente a cambios en el fotoperíodo en post-floración. *Tesis de Doctorado de La Universidad de Buenos Aires*.
- Nolasco, S. M., Aguirrezábal, L. A. N., & Crapiste, G. H. (2004). Tocopherol oil concentration in field-grown sunflower is accounted for by oil weight per seed. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(11), 1045–1051. <https://doi.org/10.1007/s11746-004-1020-6>
- Ochatt, S. J. (2015). Agroecological impact of an in vitro biotechnology approach of embryo development and seed filling in legumes. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2), 535–552. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0276-8>
- Oliva, M. L., Shannon, J. G., Sleper, D. A., Ellersieck, M. R., Cardinal, A. J., Paris, R. L., & Lee, J. D. (2006). Stability of fatty acid profile in soybean genotypes with modified seed oil composition. *Crop Science*, 46(5), 2069–2075. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI2005.12.0474>
- Ortez, O. A., Tamagno, S., Salvagiotti, F., Prasad, P. V. V., & Ciampitti, I. A. (2019). Soybean nitrogen sources and demand during the seed-filling period. *Agronomy Journal*, 111(4), 1779–1787.

<https://doi.org/10.2134/agronj2018.10.0656>

- Ortiz, A. C., De Smet, I., Sozzani, R., & Locke, A. M. (2022). Field-grown soybean shows genotypic variation in physiological and seed composition responses to heat stress during seed development. *Environmental and Experimental Botany*, *195*(August 2021), 104768. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104768>
- Pammenter, N. W., & Berjak, P. (1999). A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research*, *9*(1), 13–37.
- Panthee, D. R., Pantalone, V. R., West, D. R., Saxton, A. M., & Sams, C. E. (2005). Quantitative trait loci for seed protein and oil concentration, and seed size in soybean. *Crop Science*, *45*(5), 2015–2022.
- Park, C., Dwiyantri, M. S., Nagano, A. J., Liu, B., Yamada, T., & Abe, J. (2019). *Identification of quantitative trait loci for increased α -tocopherol biosynthesis in wild soybean using a high-density genetic map*. 1–15.
- Penalba, O. C., & Rivera, J. A. (2016). Precipitation response to El Niño/La Niña events in Southern South America - Emphasis in regional drought occurrences. *Advances in Geosciences*. <https://doi.org/10.5194/adgeo-42-1-2016>
- Pinker, R. T., & Laszlo, I. (1992). Global distribution of photosynthetically active radiation as observed from satellites. *Journal of Climate*, *5*(1), 56–65. <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
- Piper, E. L., & Boote, K. I. (1999). Temperature and cultivar effects on soybean seed oil and protein concentrations. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *76*(10), 1233–1241. <http://www.springerlink.com/index/W802454344002042.pdf>
- Pittock, Barrie and Arthington, Angela and Booth, Trevor and Cowell, Peter and Hennessy, Kevin and Howden, Mark and Hughes, Lesley and Jones, Roger and Lake, Sam and Lyne, V. and others. (2003). *Climate change: an Australian guide to the science and potential impacts*. Australian Greenhouse Office. <https://researchers.mq.edu.au/en/publications/climate-change-an-australian-guide-to-the-science-and-potential-i>
- Poeta, F. B., Rotundo, J. L., Borrás, L., & Westgate, M. E. (2014). Seed water concentration and accumulation of protein and oil in soybean seeds. *Crop Science*, *54*(6), 2752–2759. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.03.0204>
- Poeta, F., Borrás, L., & Rotundo, J. L. (2016). Variation in seed protein concentration and seed size affects soybean crop growth and development. *Crop Science*, *56*(6), 3196–3208. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.01.0025>
- Prasad, P. V. V., Bheemanahalli, R., & Jagadish, S. V. K. (2017). Field crops and the fear of heat stress—Opportunities, challenges and future directions. *Field Crops Research*, *200*, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.09.024>
- Prasad, P. V. V., Staggenborg, S. A., Ristic, Z., Ahuja, L. R., Reddy, V. R., Saseendran, S. A., & Yu,

- Q. (2008). *Impacts of Drought and/or Heat Stress on Physiological, Developmental, Growth, and Yield Processes of Crop Plants*. 301–356. <https://doi.org/10.2134/advagricsystmodel1.c11>
- Prasad, P. V. V., Pisipati, S. R., Momc, I., & Ristic, Z. (2011). Independent and Combined Effects of High Temperature and Drought Stress During Grain Filling on Plant Yield and Chloroplast EF-Tu Expression in Spring Wheat. *Journal of Agronomy & Crop Science*, *197*, 430–441. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2011.00477.x>
- Quadrana, L., Almeida, J., Otaiza, S. N., Duffy, T., Corrêa da Silva, J. V, de Godoy, F., Asís, R., Bermúdez, L., Fernie, A. R., & Carrari, F. (2013). Transcriptional regulation of tocopherol biosynthesis in tomato. *Plant Molecular Biology*, *81*, 309–325.
- Rattalino Edreira, J. I., & Otegui, M. E. (2012). Heat stress in temperate and tropical maize hybrids: Differences in crop growth, biomass partitioning and reserves use. *Field Crops Research*, *130*, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.02.009>
- Rimbach, G., Moehring, J., Huebbe, P., & Lodge, J. K. (2010). Gene-regulatory activity of α -tocopherol. *Molecules*, *15*(3), 1746–1761. <https://doi.org/10.3390/molecules15031746>
- Ritchie, J. T. (1981). Soil water availability. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/BF02180061>
- Ritchie, S. W., Nguyen, H. T., & Holaday, A. S. (1990). Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*, *30*(1), 105–111.
- Rondanini, D., Savin, R., & Hall, A. J. (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 Research*, *83*(1), 79–90. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(03\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(03)00064-9)
- Rose, I. A. (1988). Effects of Moisture Stress on the Oil and Protein-Components of Soybean Seeds. *Australian Journal of Agricultural Research*, *39*(2), 163–170. <https://doi.org/10.1071/AR9880163>
- Rotundo, J. L., Borrás, L., & Westgate, M. E. (2011). Linking assimilate supply and seed developmental processes that determine soybean seed composition. *European Journal of Agronomy*, *35*(3), 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2011.05.002>
- Rotundo, J. L., Borrás, L., Westgate, M. E., & Orf, J. H. (2009). Relationship between assimilate supply per seed during seed filling and soybean seed composition. *Field Crops Research*, *112*(1), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.02.004>
- Rotundo, J. L. J. L., & Westgate, M. E. (2009). Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. *Field Crops Research*, *110*(2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.07.012>
- Rotundo, J. L., & Westgate, M. E. (2009). Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. *Field Crops Research*, *110*(2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.07.012>
- Rotundo, J. L., & Westgate, M. E. (2010a). Rate and duration of seed component accumulation in water-stressed soybean. *Crop Science*. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.05.0240>
- Rotundo, J. L., & Westgate, M. E. (2010b). Rate and duration of seed component accumulation in water-stressed soybean. *Crop Science*, *50*(2), 676–684.

<https://doi.org/10.2135/cropsci2009.05.0240>

- Rusticucci, M., Kyselý, J., Almeida, G., & Lhotka, O. (2016). Long-term variability of heat waves in Argentina and recurrence probability of the severe 2008 heat wave in Buenos Aires. *Theoretical and Applied Climatology*. <https://doi.org/10.1007/s00704-015-1445-7>
- Saenz, E., Borrás, L., Panelo, J. S., Poeta, F. B., & Rotundo, J. L. (2022). Yield trade-off and the role of parental selection based on seed size when breeding for soybean seed protein. *Plant Breeding*. <https://doi.org/10.1111/PBR.13062>
- Saini, H. S., & Westgate, M. E. (1999). Reproductive Development in Grain Crops during Drought. *Advances in Agronomy*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60843-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60843-3)
- Sala, R. G., Westgate, M. E., & Andrade, F. H. (2007). Source/sink ratio and the relationship between maximum water content, maximum volume, and final dry weight of maize kernels. *Field Crops Research*, 101(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.09.004>
- Salado-Navarro, L. R., Hinson, K., & Sinclair, T. R. (1985). Nitrogen Partitioning and Dry Matter Allocation in Soybeans with Different Seed Protein Concentration1. *Crop Science*, 25(3), 451–455. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI1985.0011183X002500030006X>
- Sale, P. W. G., & Campbell, L. C. (1980). Patterns of mineral nutrient accumulation in soybean seed. *Field Crops Research*, 3(C), 157–163. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(80\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0378-4290(80)90021-0)
- Samarah, N. H. (2005). Effects of drought stress on growth and yield of barley. *Agronomy for Sustainable Development*, 25(1), 145–149.
- Sattler, S. E., Cahoon, E. B., Coughlan, S. J., & DellaPenna, D. (2003). Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiology*, 132(4), 2184–2195. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024257>
- Sattler, S. E., Gilliland, L. U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M., & DellaPenna, D. (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell*, 16(6), 1419–1432. <https://doi.org/10.1105/tpc.021360>
- Sayago, S., Ovando, G., & Bocco, M. (2017). Landsat images and crop model for evaluating water stress of rainfed soybean. *Remote Sensing of Environment*, 198, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2017.05.008>
- Schonfeld, M. A., Johnson, R. C., Carver, B. F., & Mornhinweg, D. W. (1988). Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Science*, 28(3), 526–531.
- Schwerz, F., Caron, B. O., Elli, E. F., Stolzle, J. R., Medeiros, S. L. P., Sgarbossa, J., & Rockenbach, A. P. (2019). Microclimatic conditions in the canopy strata and its relations with the soybean yield. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(3), 1–16. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180066>
- Seguin, P., Tremblay, G., Pageau, D., & Liu, W. (2010). Soybean tocopherol concentrations are affected by crop management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5495–5501. <https://doi.org/10.1021/jf100455f>

- Seguin, P., Turcotte, P., Tremblay, G., Pageau, D., & Liu, W. (2009). Tocopherols Concentration and Stability in Early Maturing Soybean Genotypes. *Agronomy Journal*, *101*(5), 1153–1159. <https://doi.org/10.2134/AGRONJ2009.0140>
- Sehgal, A., Sita, K., Kumar, J., Kumar, S., Singh, S., Siddique, K. H. M., & Nayyar, H. (2017). Effects of Drought, Heat and Their Interaction on the Growth, Yield and Photosynthetic Function of Lentil (*Lens culinaris Medikus*) Genotypes Varying in Heat and Drought Sensitivity. *Frontiers in Plant Science*, *8*(October). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01776>
- Sehgal, A., Sita, K., Siddique, K. H. M., Kumar, R., Bhogireddy, S., Varshney, R. K., HanumanthaRao, B., Nair, R. M., Prasad, P. V. V., & Nayyar, H. (2018). Drought or/and heat-stress effects on seed filling in food crops: Impacts on functional biochemistry, seed yields, and nutritional quality. *Frontiers in Plant Science*, *871*(November), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01705>
- Semida, W. M., Abd El-Mageed, T. A., Howladar, S. M., & Rady, M. M. (2016). Foliar-applied α -tocopherol enhances salt-tolerance in onion plants by improving antioxidant defence system. *Australian Journal of Crop Science*, *10*(7), 1030–1039. <https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.07.p7712>
- Serraj, R., Sinclair, T. R., & Purcell, L. C. (1999). Symbiotic N₂ fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany*, *50*(331), 143–155. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.331.143>
- Serraj, Rachid. (2003). Effects of drought stress on legume symbiotic nitrogen fixation: Physiological mechanisms. In *Indian Journal of Experimental Biology* (Vol. 41, Issue 10, pp. 1136–1141).
- Sharma, S., Kaur, A., Bansal, A., & Gill, B. S. (2013). Positional effects on soybean seed composition during storage. *Journal of Food Science and Technology*, *50*(2), 353–359. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0341-0>
- Shaw, E. J., & Rajcan, I. (2017). Molecular mapping of soybean seed tocopherols in the cross ‘OAC Bayfield’×‘OAC Shire.’ *Plant Breeding*, *136*(1), 83–93.
- Sherwin, E. R. (1976). Antioxidants for vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, *53*(6Part2), 430–436. <https://doi.org/10.1007/BF02605739>
- Shibles, R. M., Sundberg, D. N., & Naeve, S. L. (1994). Physiological Constraints Limiting Seed Protein in Normal and High Seed Protein Soybean Genotypes. *Agronomy Abstract*, 151.
- Shintani, D., & DellaPenna, D. (1998). Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science (New York, N.Y.)*, *282*(5396), 2098–2100. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.282.5396.2098>
- Siddique, K. H. M., Loss, S. P., Regan, K. L., & Jettner, R. L. (1999). Adaptation and seed yield of cool season grain legumes in Mediterranean environments of south-western Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, *50*(3), 375–388. <https://doi.org/10.1071/A98096>
- Siebers, M. H., Yendrek, C. R., Drag, D., Locke, A. M., Rios Acosta, L., Leakey, A. D. B., Ainsworth, E. A., Bernacchi, C. J., & Ort, D. R. (2015). Heat waves imposed during early pod development in soybean (*Glycine max*) cause significant yield loss despite a rapid recovery from oxidative

- stress. *Global Change Biology*, 21(8), 3114–3125. <https://doi.org/10.1111/gcb.12935>
- Sinclair, T. R., & Wit, C. T. de. (1975). Photosynthate and Nitrogen Requirements for Seed Production by Various Crops. *Science*, 189(4202), 565–567. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.189.4202.565>
- Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S. N., & Bawa, A. S. (2008). *Functional and Edible Uses of Soy Protein Products*. 7.
- Sistema de Información Simplificado Agrícola (SISA) (2021). https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/if_sisa_final_soja_2020_2021.pdf
- Sita, K., Sehgal, A., Bhandari, K., Kumar, J., Kumar, S., Singh, S., Siddique, K. H. M., & Nayyar, H. (2018). Impact of heat stress during seed filling on seed quality and seed yield in lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(13), 5134–5141. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9054>
- Smiciklas, K. D., Mullen, R. E., Carlson, R. E., & Knapp, A. D. (1992). (1992) *Soybean Seed Quality Response to Drought Stress and Pod Position (AJ)*. 166–170.
- Smith, A. J., Rinne, R. W., & Seif, R. D. (1989). Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Pyruvate Kinase Involvement in Protein and Oil Biosynthesis during Soybean Seed Development. *Crop Science*, 29(2), 349–353. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI1989.0011183X002900020024X>
- Specht, J. E., Chase, K., Macrander, M., Graef, G. L., Chung, J., Markwell, J. P., Germann, M., Orf, J. H., & Lark, K. G. (2001). Soybean Response to Water: A QTL Analysis of Drought Tolerance. *Crop Science*, 41(2), 493–509. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI2001.412493X>
- Speek, A. J., Schrijver, J., & Schreurs, W. H. P. (1985). Vitamin E Composition of Some Seed Oils as Determined by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. *Journal of Food Science*, 50(1), 121–124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13291.x>
- Stephens, N. G., Parsons, A., & Schofield, P. M. (1996). Randomised controlled trials of Vitamin E in patients with coronary disease. *CHAOS (Cambridge Heart Antioxidant Study) Lancet*, 347, 781–786.
- Stone, PJ and Savin, R. and others. (1999). Grain quality and its physiological determinants. *Wheat: Ecology and Physiology of Yield Determination*, 85–120.
- Tagliapietra, E. L., Streck, N. A., Da Rocha, T. S. M., Richter, G. L., Da Silva, M. R., Cera, J. C., Guedes, J. V. C., & Junior Zanon, A. (2018). Optimum leaf area index to reach soybean yield potential in subtropical environment. *Agronomy Journal*, 110(3), 932–938. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.09.0523>
- Tang, G.-Q., Novitzky, W. P., Griffin, H. C., Huber, S. C., & Dewey, R. E. (2005). Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. *The Plant Journal*, 44(3), 433–446. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2005.02535.X>
- Tang, Y., Fu, X., Shen, Q., & Tang, K. (2016). Roles of MPBQ-MT in promoting α -T-tocopherol production and photosynthesis under high light in lettuce. *PLoS ONE*, 11(2), 1–14.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148490>

- Tardieu, F. (2013). Plant response to environmental conditions: Assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. *Frontiers in Physiology*, 4 FEB(February 2013). <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00017>
- Thomas, J M G, Boote, K. J., Allen, L. H., Gallo-Meagher, M., & Davis, J. M. (2003). Seed Physiology & Metabolism Elevated Temperature and Carbon Dioxide Effects on Soybean Seed Composition and Transcript Abundance. *Crop Science*, 43, 1548–1557. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1548>
- Thomas, Jean M G, Boote, K. J., Pan, D., & Allen, L. H. (2010). *Elevated temperature delays onset of reproductive growth and reduces seed growth rate of soybean*. 1(1), 19–32.
- Thrane, M., Paulsen, P. V., Orcutt, M. W., & Krieger, T. M. (2017). Soy Protein: Impacts, Production, and Applications. *Sustainable Protein Sources*, 23–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00002-0>
- Thuzar, M., Puteh, a B., Abdullah, N. a P., Lassim, M. B. M., & Jusoff, K. (2010). The Effects of Temperature Stress on the Quality and Yield of Soya Bean [(Glycine max L.) Merrill.]. *Journal of Agricultural Science*, 2(1), 172–179. <https://doi.org/10.5539/jas.v2n1p172>
- Triboi, E., & Triboi-Blondel, A. M. (2002). Productivity and grain or seed composition: A new approach to an old problem - Invited paper. *European Journal of Agronomy*, 16(3), 163–186. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(01\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(01)00146-0)
- Turner, N. C., Wright, G. C., & Siddique, K. H. M. (2001). Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments. In *Advances in Agronomy*.
- USDA. (2023). *Oilseeds: World Markets and Trade* (Issue May).
- Valenzuela, A and Nieto, S and Garrido, A. (1999). Long chain polyunsaturated fatty acids: When and why is necessary the supplementation with these fatty acids. *Aceites y Grasas*, 9, 294--299.
- Van Eenennaam, A. L., Lincoln, K., Durrett, T. P., Valentin, H. E., Shewmaker, C. K., Thorne, G. M., Jiang, J., Baszis, S. R., Levering, C. K., Aasen, E. D., Hao, M., Stein, J. C., Norris, S. R., & Last, R. L. (2003). Engineering Vitamin E Content : From Arabidopsis Mutant to Soy Oil We report the identification and biotechnological utility of a plant gene encoding the tocopherol (vitamin E) biosynthetic enzyme. *The Plant Cell*, 15(December), 3007–3019. <https://doi.org/10.1105/tpc.015875.2>
- Velasco, L., Pérez-Vich, B., & Fernández-Martínez, J. M. (2005). Identification and genetic characterization of a safflower mutant with a modified tocopherol profile. *Plant Breeding*, 124(5), 459–463. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0523.2005.01150.X>
- Vinutha, T., Bansal, N., Kumari, K., Prashat, R. G., Sreevathsa, R., Krishnan, V., Kumari, S., Dahuja, A., Lal, S. K., Sachdev, A., & Praveen, S. (2017). Comparative Analysis of Tocopherol Biosynthesis Genes and Its Transcriptional Regulation in Soybean Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(50), 11054–11064. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03448>

- Vinutha, T., Maheswari, C., Bansal, N., Prashat, G. R., Krishnan, V., Kumari, S., Dahuja, A., Sachdev, A., & Rai, R. D. (2015). Expression analysis of γ -tocopherol methyl transferase genes and α -tocopherol content in developing seeds of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, *52*(3–4), 267–273.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, *61*(3), 199–223. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2007.05.011>
- Wang, T. (2008). Minor Constituents and Phytochemicals of Soybeans. *Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, 297–329. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-64-6.50013-5>
- Warner, K. (2003). Effects of antioxidants in frying oils. *Chemistry of Frying Oils*. AOCS, Champaign, 210–227.
- Weber, H., Borisjuk, L., & Wobus, U. (2005). Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Annual Review of Plant Biology*, *56*(1), 253–279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144201>
- Westgate, M. E., & Grant, D. T. (1989). Effect of Water Deficits on Seed Development in Soybean. *Plant Physiology*, *91*(7), 975–979.
- Whiting, K. R., Crookston, R. K. ., & Brun, W. A. (1988). An indicator of the R6. 5 stage of development for indeterminate soybean. *Crop Science*, *28*(5), 866–867.
- Wilcox, J. R., & Cavins, J. F. (1995). Backcrossing high seed protein to a soybean cultivar. *Crop Science*, *35*(4), 1036–1041.
- Wilcox, J., & Shibles, R. (2001). Interrelationships among Seed Quality Attributes n Soybean. *Crop Science*, *41*, 11–14. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.41111x>
- Willms, J. R., Salon, C., & Layzell, D. B. (1999). Evidence for Light-Stimulated Fatty Acid Synthesis in Soybean Fruit. *Plant Physiology*, *120*(4), 1117–1128. <https://doi.org/10.1104/PP.120.4.1117>
- Wilson, R. F. (2004). Seed composition. *Soybeans: Improvement, Production, and Uses, soybeansimprove*, 621–677. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr16.3ed.c13>
- Wolf, R. B., Cavins, J. F., Kleiman, R., & Black, L. T. (1982). Effect of Temperature on Soybean Seed Constituents - Oil, Protein, Moisture, Fatty-Acids, Amino-Acids and Sugars. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *59*(5), 230–232.
- Wyss, C. S., Czyzewicz, J. R., & Below, F. E. (1991). Source-Sink Control of Grain Composition in Maize Strains Divergently Selected for Protein Concentration. *Crop Science*, *31*(3), 761–766. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI1991.0011183X003100030045X>
- Yamagata, M., Kouchi, H., & Yoneyama, T. (1987). Partitioning and Utilization of Photosynthate Produced at Different Growth Stages after Anthesis in Soybean (*Glycine max* L. Merr.): Analysis by Long-term ¹³C-Labeling Experiments. *Journal of Experimental Botany*, *38*(8), 1247–1259. <https://doi.org/10.1093/JXB/38.8.1247>

- Yang, F., Feng, L., Liu, Q., Wu, X., Fan, Y., Raza, M. A., Cheng, Y., Chen, J., Wang, X., Yong, T., Liu, W., Liu, J., Du, J., Shu, K., & Yang, W. (2018). Effect of interactions between light intensity and red-to- far-red ratio on the photosynthesis of soybean leaves under shade condition. *Environmental and Experimental Botany*, *150*, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.03.008>
- Yang, J., & Zhang, J. (2006). Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytologist*, *169*(2), 223–236. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2005.01597.X>
- Yazdi-Samadi, B., Rinne, R. W., & Seif, R. D. (1977). Components of Developing Soybean Seeds: Oil, Protein, Sugars, Starch, Organic Acids, and Amino Acids¹. *Agronomy Journal*, *69*(3), 481. <https://doi.org/10.2134/agronj1977.00021962006900030037x>
- Yokota, A., Kawasaki, S., Iwano, M., Nakamura, C., Miyake, C., & Akashi, K. (2002). Citrulline and DRIP-1 Protein (ArgE Homologue) in Drought Tolerance of Wild Watermelon. *Annals of Botany*, *89*(7), 825–832. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCF074>
- Yoshida, H., Takagi, S., Ienaga, H., & Tsuchiya, C. (1998). Regional distribution of tocopherols and fatty acids within soybean seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society* *1998* *75*:7, 75(7), 767–774. <https://doi.org/10.1007/S11746-998-0224-3>
- Zeiger, C., Egli, D. B., Leggett, J. E., & Reicosky, D. A. (1982). Cultivar Differences in N Redistribution in Soybeans 1. *Agronomy Journal*. <https://doi.org/10.2134/agronj1982.00021962007400020027x>
- Zhang, J., He, N., Liu, C., Xu, L., Chen, Z., Li, Y., Wang, R., Yu, G., Sun, W., Xiao, C., Chen, H. Y. H., & Reich, P. B. (2020). Variation and evolution of C:N ratio among different organs enable plants to adapt to N-limited environments. *Global Change Biology*, *26*(4), 2534–2543. <https://doi.org/10.1111/gcb.14973>
- Zhou, R., Yu, X., Ottosen, C. O., Rosenqvist, E., Zhao, L., Wang, Y., Yu, W., Zhao, T., & Wu, Z. (2017). Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. *BMC Plant Biology*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0974-x>

ANEXO

Tabla S1. Correlación de Pearson para el contenido de proteína, aceite, fracción residual y sus parámetros (tasa de acumulación [TA] y duración de acumulación [DA]), relación fuente destino (F/D), contenido máximo de agua (CMA), peso de vaina (PV) y tasa de crecimiento del grano (TCG) considerando dos niveles hídricos (riego y estrés hídrico [EH]), dos genotipos (Alim5.09 y Jocketta), dos niveles térmicos (temperatura ambiente [TAmb] y estrés térmico [ET]) y las interacciones entre los factores en el experimento I y II.

	Proteína			Aceite			Fracción residual		
	Contenido	TA	DA	Contenido	TA	DA	Contenido	TA	DA
F/D	0,59***	0,54**	0,07ns	0,53**	0,45*	0,26ns	0,53**	0,38*	-0,02ns
CMA	-	0,75***	-	-	0,58***	-	-	0,38**	-
PV	-	0,62***	-	-	0,32**	-	-	0,45***	-
TCG	-	0,81***	-	-	0,69***	-	-	0,48***	-

ns, no significativo

***, **, *Significativos al $p \leq 0,001$, 0,01 y 0,05, respectivamente