

COMPOSICIÓN DE TOCOFEROLES EN SOJA BAJO ESTRÉS TÉRMICO E HÍDRICO DURANTE EL LLENADO DE GRANO: VARIACIÓN SEGÚN LA POSICIÓN EN EL CANOPEO

R.E.A. Veas*, V.V. Ergo, R. Asís, H.R. Lascano, D.P. Rondanini, C.S. Carrera.

*Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales-CIAP-INTA Córdoba, Camino 60 cuadras km 5.5, Córdoba, 5119. TE: (0351) 497 3636, veas.rodolfo@inta.gob.ar

Palabras clave: ***Glycine max***, calidad, nutraceuticos, déficit hídrico, altas temperaturas

INTRODUCCIÓN

La soja ***Glycine max (L.) Merr.*** representa aproximadamente 34% de la producción total de granos y 46% de la superficie agrícola sembrada en Argentina, convirtiéndose en el principal cultivo a nivel nacional (SIIA, 2018). Argentina es el tercer exportador mundial de granos y el principal de productos derivados como harina y aceite (Ac) (USDA, 2018), resaltando la importancia de la calidad de dicho grano para el país. El Ac de soja posee componentes con fuerte actividad antioxidante, como los tocoferoles, que inhiben la oxidación de lípidos removiendo los radicales libres en granos (Carrera *et al.*, 2014) y contribuyen al valor nutraceutico del grano porque pueden mejorar la funcionalidad del sistema inmunológico (Shintani *et al.*, 1998).

Las cuatro isoformas de tocoferoles presentes en el grano son: alfa, beta, gama, y delta tocoferol (α -, β -, γ -, y δ -toc, respectivamente), de los cuales α -toc es considerado la forma más importante de vitamina E para la salud humana ya que su actividad antioxidante es 10 veces mayor respecto al resto de tocoferoles (DellaPenna, 2005). Sin embargo, la proporción de α -toc en granos de soja varía entre 4 y 10% del total de tocoferoles (T-toc), correspondiéndole la mayor proporción de T-toc a γ -toc (60-66%), seguido de δ -toc (24-29%) y β -toc (1-3%) (Dwiyanti *et al.*, 2011). Se ha documentado variación genotípica, variación ambiental e interacción genotipo por ambiente en contenido y composición de tocoferoles (Whent *et al.*, 2009; Carrera *et al.*, 2014). La acumulación de estos antioxidantes ocurre paralelamente con el Ac durante el llenado de grano (LLG) (Almonor *et al.*, 1998); por ello, los factores de estrés ambiental durante este período podrían afectar tanto el contenido como la composición final de tocoferoles presentes en el grano.

Dentro del contexto del cambio climático mundial, en Argentina se espera un aumento de la frecuencia y severidad de olas de calor (Rusticucci *et al.*, 2016) y se ha proyectado mayor variación en las precipitaciones interanuales acompañada de eventos de sequía en distintas regiones del país (Penalba *et al.*, 2016). Estos factores de estrés abiótico afectan no solo el rendimiento de los cultivos sino también pueden modificar la calidad del grano. Además, algunos trabajos han evidenciado que la calidad del grano puede variar en función de la posición de la vaina dentro del canopeo (Bellaloui y Gillen 2010). Los objetivos del presente trabajo fueron: i) determinar el impacto del estrés térmico (ET), estrés hídrico (EH) y su interacción (ET×EH) en contenido y composición final de tocoferoles del grano de soja y analizar si existe variabilidad posicional dentro del canopeo; ii) establecer relaciones entre tocoferoles, Ac, peso de grano (PG) y variables ecofisiológicas en genotipos (G) de soja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un experimento en INTA Manfredi (31°49'S, 63°46'W) durante la campaña 2015/16 utilizando dos genotipos de soja no transgénicos contrastantes en proteína (Pr) en grano: Alim 5.09 (alta Pr) y Jocketta (baja Pr). El diseño experimental consistió en parcelas sub-subdivididas con dos repeticiones.

La parcela principal correspondió al nivel hídrico (NH): i) sin estrés: mediante riego por goteo y ii) EH: 25% de agua útil desde R5.5 según la escala de Fehr *et al.*, (1977) hasta madurez fisiológica (MF).

La sub-parcela correspondió a los genotipos y la sub-subparcela al nivel térmico (NT): i) sin estrés: temperatura ambiente y ii) ET: episodios de temperaturas mayores a 32°C durante 15 días a partir de R5.5 entre las 10 y 16 horas. Antes del comienzo de los tratamientos, las vainas que se encontraban en la misma edad fenológica (R5.5) se marcaron con pintura acrílica en el pedicelo y base (Egli y Bruening, 2002) estableciendo dos estratos (E) dentro del

canopeo: tercio superior (ES) y tercio inferior (EI). Se realizaron mediciones de temperatura del canopeo (TC) con termómetro infrarrojo cada 7 días durante la aplicación de tratamientos y tasa de fotosíntesis (Fot) con un analizador portátil Licor 6400XT durante el LLG. En las vainas marcadas previamente, se determinaron a cosecha el PG ajustando a la humedad base del cultivo (13,5%). La concentración de Ac se determinó mediante NIRs y los tocoferoles (expresados como $\mu\text{g/g}$ grano) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La concentración T-toc resultó de la sumatoria de: α -, β -, γ -, y δ -toc. Se realizó ANAVA con un nivel de significancia del 5%. Se empleó la prueba de DCG para evaluar diferencias entre tratamientos (Di Rienzo *et al.*, 2011). Además, se exploraron asociaciones entre variables ecofisiológicas (TC y Fot), PG, Ac y tocoferoles a través del análisis de componentes principales (ACP) (Johnson *et al.*, 2002).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Aunque el ANAVA indicó diferencias significativas ($p < 0,05$) de las interacciones NH×G para α y β -toc y, NH×G×E para γ -toc y T-toc, en general éstas representaron $\leq 19\%$ de la variabilidad de los mencionados tocoferoles (datos no mostrados). En Alim 5.09 el rango de T-toc fue de 111,2-193,4 $\mu\text{g/g}$ grano, mientras que, α -toc varió entre 8,1-76,8 $\mu\text{g/g}$ grano, β -toc 5,5-10,8 $\mu\text{g/g}$ grano, γ -toc 65,7-107,0 $\mu\text{g/g}$ grano y δ -toc 16,9-41,0 $\mu\text{g/g}$ grano. En el caso de Jocketta los valores de T-toc oscilaron entre 97,1-277,6 $\mu\text{g/g}$ grano y su composición de α -toc fue 3,3-22,4 $\mu\text{g/g}$ grano, β -toc 3,3-7,1 $\mu\text{g/g}$ grano, γ -toc 62,7-181,5 $\mu\text{g/g}$ grano y δ -toc 18,8-57,3 $\mu\text{g/g}$ grano (tabla 1). Se registraron diferencias significativas entre genotipos ($p < 0,05$). Alim 5.09 presentó los mayores valores de α y β -toc (284 % y 57%, respectivamente) en relación a Jocketta. Este último genotipo, exhibió un 17% más de γ -toc y un 39% más de δ -toc respecto a Alim 5.09.

Las parcelas regadas expuestas a episodios de ET no se diferenciaron significativamente del control ($p > 0,05$). Si bien trabajos previos han demostrado el efecto de la temperatura en tocoferoles, en este experimento, los episodios diarios de ET fueron breves (6h) posiblemente permitiendo procesos de recuperación (Ergo *et al.*, 18), además, la temperatura que sensa el grano (protegido por la vaina) podría ser menor a la del aire. A través de los genotipos las parcelas bajo déficit hídrico durante todo el LLG (independientemente del ET), exhibieron un incremento significativo del 159% en α -toc y una disminución del 39% en δ -toc respecto al control. Esta respuesta coincide con trabajos previos en los cuales el EH aumentó α -toc y redujo δ -toc (Carrañ-Panizzi *et al.*, 2007 y Britz *et al.*, 2008). En las parcelas bajo EH la TC aumentó 3 a 5°C respecto al control (30°C), indicando una limitación en la capacidad de refrigeración. Bajo tales condiciones la actividad enzimática implicada en el metabolismo de síntesis de tocoferoles podría ser afectada modificándose las proporciones de tocoferoles sin alterar el T-toc. El incremento de α -toc podría señalar un mecanismo de protección frente los procesos de peroxidación lipídica causados por las condiciones de estrés.

Trabajos previos observaron que el Ac, la Pr y los ácidos grasos variaron en función de la posición de los granos en el tallo principal (Huber *et al.*, 2016 y Veas *et al.*, 2018). No obstante, en el presente trabajo, la estratificación no produjo cambios significativos (Tabla 1) en los distintos tocoferoles por lo que su síntesis sería independiente de la posición que los granos ocupan dentro del canopeo.

En orden de establecer asociaciones entre los componentes de calidad del grano se realizó un ACP sin considerar la estratificación. El biplot explicó 98,5% de la variación total de los datos (Figura 1). La componente principal (CP) 1 separó los tratamientos regados de aquellos estresados hídricamente. La concentración de δ -toc, Ac, PG y Fot se correlacionaron positivamente entre sí y se orientaron hacia las parcelas regadas independientemente del ET, indicando la fuerte dependencia del PG y Ac de la Fot actual. En contraposición, α -toc y β -toc se asociaron positivamente entre sí y con TC, orientándose hacia la condición de EH. Esto podría indicar aumento de actividad antioxidante como mecanismo de protección lipídica. En

la CP 2, γ -toc y T-toc estuvieron correlacionados positivamente, resultado esperable ya que aproximadamente el 59% de los T-toc se compusieron de γ -toc (Tabla 1).

En general, ante condiciones de EH se observaron modificaciones en las proporciones de los tocoferoles, aumentando α -toc y disminuyendo β -toc, sin cambios significativos en T-toc. No se detectó variabilidad posicional en la composición de los distintos tocoferoles dentro del canopeo. La asociación positiva entre TC y α -toc bajo EH señalaría la relevancia de la temperatura en la síntesis de estos compuestos. Poder dilucidar el efecto de la temperatura en los procesos de síntesis y regulación de los tocoferoles, así como sus diferentes vías competidoras requiere mayor atención para comprender los mecanismos involucrados.

AGRADECIMIENTOS

La Dra. C.Vega (EEA INTA Manfredi) brindó asesoramiento técnico a campo y el Dr. D. Soldini (EEA INTA Marcos Juárez) facilitó los genotipos y el equipo NIRS; Este trabajo se realizó con fondos provistos por: beca INTA; CONICET, PICT Joven 2016-0519 y proyecto PNCYO-1127042 (INTA).

BIBLIOGRAFÍA

- 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*, 75(5), 591-596
- 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*, 1(03), 110.
- Britz, S. J., Kremer, D. F., & Kenworthy, W. J. (2008). Tocopherols in soybean seeds: genetic variation and environmental effects in field-grown crops. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(10), 931-936.
- Carrao-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.
- Carrera, C. S., Dardanelli, J. L., & Soldini, D. O. (2014). 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.
- DellaPenna, D. (2005). A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *Journal of plant physiology*, 162(7), 729-737.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, Y. C. (2011). InfoStat versión 2011. *Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*
- Dwiyanti, M. 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(1), 152.
- Egli, D. B., & Bruening, W. P. (2002). Flowering and fruit set dynamics at phloem-isolated nodes in soybean. *Field Crops Research*, 79(1), 9-19.
- Ergo, V. V., Lascano, R., Vega, C. R., 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, 1-11.
- Fehr, W. R., & Caviness, C. E. (1977). Stages of soybean development.
- Huber, S. 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.
- Johnson, R. A., & Wichern, D. W. (2002). *Applied multivariate statistical analysis* (Vol. 5, No. 8). Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.
- Penalba, O. C., & Rivera, J. A. (2016). Regional aspects of future precipitation and meteorological drought characteristics over Southern South America projected by a CMIP5 multi-model ensemble. *International Journal of Climatology*, 36(2), 974-986.
- Rusticucci, M., Kysely, 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*, 124(3-4), 679-689.
- Sistema de Integrado de Informaciones Agropecuarias (SIIA) (2016). Secretaría de Agroindustria de Argentina. Disponible en http://www.sii.gov.ar/sst_pcias/estima/estima.php
- Shintani, D., & DellaPenna, D. (1998). Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*, 282(5396), 2098-2100.
- United States Department of Agriculture (USDA). (2017). Disponible en <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/home>
- Whent, M., Hao, J., Slavin, M., Zhou, M., Song, J., Kenworthy, W., & Yu, L. (2009). Effect of genotype, environment, and their interaction on chemical composition and antioxidant properties of low-linolenic soybeans grown in Maryland. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(21), 10163-10174.
- Veas R., Ergo V., Maestri D., Rondanini D., Lascano R., Vega C., Carrera C. (2018). La composición del aceite de soja responde al estrés térmico e hídrico y a la posición de la vaina. [XXXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal - XVI Congreso Latinoamericano De Fisiología Vegetal](#)

Tabla 1. Concentración de alfa, beta, gama, delta tocoferol (α -, β -, γ -, y δ -toc, respectivamente) y tocoferoles totales ($\mu\text{g/g}$ grano) en dos genotipos no transgénicos de soja: Alim 5.09 y Jocketta correspondientes a dos estratos del canopeo: estrato superior e inferior sometidos a cuatro tratamientos (control, estrés térmico (ET), estrés hídrico (EH) y ET×EH) durante el año 2016; NH: nivel hídrico, G: genotipo, NT: nivel térmico, E: estrato.

Estrato superior		Estrato inferior									
Genotipo	Tratamiento	Tocoferoles $\mu\text{g/g}$ grano					Tocoferoles $\mu\text{g/g}$ grano				
		α	β	γ	δ	Total	α	β	γ	δ	Total
Alim 5.09	Control	8,1	6,9	65,7	30,6	111,2	24,1	7,5	93,0	34,3	158,9
	ET	21,1	8,6	96,4	38,7	164,7	20,5	6,8	96,7	34,5	158,6
	EH	50,8	8,8	84,9	23,5	170,7	49,3	7,6	76,4	25,5	151,7
	ET×EH	61,6	9,2	89,7	18,6	179,1	56,5	6,3	84,6	18,5	165,9
Jocketta	Control	4,1	3,5	65,5	32,6	103,9	9,9	4,9	117,6	42,9	186,1
	ET	3,9	4,3	84,9	52,5	145,7	8,1	6,1	181,5	37,5	277,6
	EH	15,4	5,3	114,3	28,1	163,1	18,9	6,2	95,6	32,4	155,3
	ET×EH	11,6	5,7	113,5	35,9	166,6	7,2	4,2	82,5	39,1	131,9
NH		**	ns	ns	**	ns	**	ns	ns	**	ns
G		**	**	**	*	ns	**	**	**	*	ns
NT		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
E		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NH*G		**	*	ns	ns	ns	**	*	ns	ns	ns
NH*E		ns	ns	**	ns	**	ns	ns	**	ns	**
G*E		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NH*G*E		ns	ns	**	ns	*	ns	ns	**	ns	*

*, **, significativo al $p < 0,05$ y $0,01$ respectivamente; ns: no significativo. Se muestran sólo las interacciones que resultaron significativas.

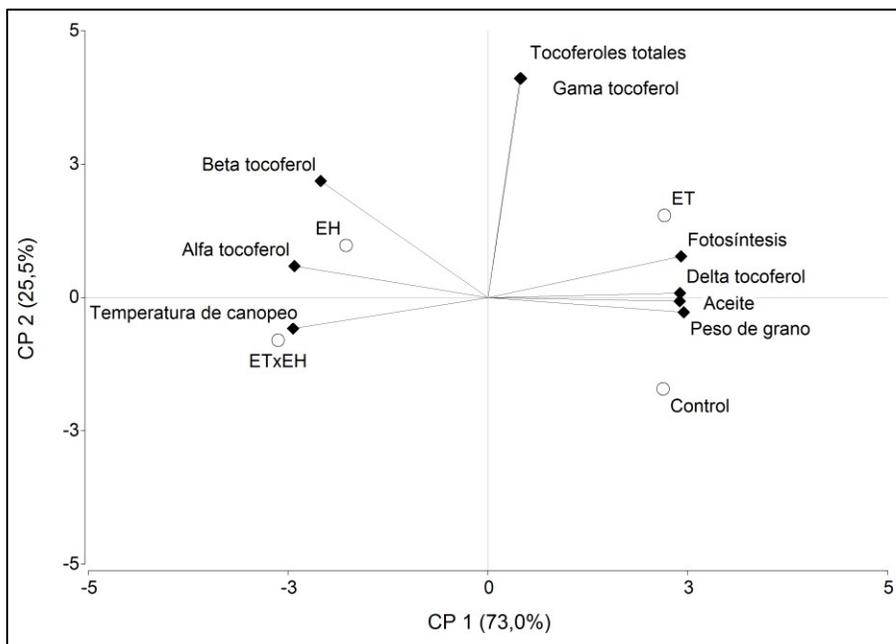


Figura 1. Biplot de los distintos tocoferoles, peso de grano, aceite y variables ecofisiológicas en dos genotipos no transgénicos de soja: Alim 5.09 y Jocketta bajo los tratamientos control, estrés térmico (ET), estrés hídrico (EH) y ET×EH durante 2016.