



---

# **CARACTERIZACIÓN MORFO-FISIOLÓGICA DE GENOTIPOS DE *GLYCINE MAX* SEGÚN SU TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO**

**Tesinista: Costamagna, Carla Antonella**

Directora: Guzzo, María Carla

Codirectora: Monteoliva, Mariela Inés

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA (UNC)

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Lugar de Trabajo:

Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales

“Ing. Agr. Victorio S. Trippi” – Unidad de Estudios Agropecuarios (IFRGV-UDEA)

Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP)

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

Carrera de Ciencias Biológicas

Marzo 2022



# **CARACTERIZACIÓN MORFO-FISIOLÓGICA DE GENOTIPOS DE *GLYCINE MAX* SEGÚN SU TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO**

Tribunal Examinador

Nombre y Apellido: ..... Firma: .....

Nombre y Apellido: ..... Firma: .....

Nombre y Apellido: ..... Firma: .....

Calificación: .....

Fecha: .....

## Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	5
<b>Resumen</b> .....	6
<b>1. Introducción</b> .....	7
1.1. Hipótesis y objetivos.....	11
<b>2. Materiales y metodos</b> .....	12
2.1. Material vegetal .....	12
2.2. Sistema experimental.....	12
2.3. Parámetros morfológicos: Área de foliolo individual y biomasa aérea y radical	14
2.4. Parámetros fisiológicos: Contenido relativo de agua, verdor y Eficiencia Cuántica del Fotosistema II (PSII y Fv/Fm) .....	14
2.5. Parámetros Bioquímicos: prolina, clorofila a, FRAP, MDA. ....	15
2.6. Cálculos y análisis de datos.....	16
<b>3. Resultados</b> .....	17
3.1. Contenido relativo de agua (CRA) .....	17
3.2. Variaciones en el ajuste osmótico: cambios en contenido de prolina.....	18
3.3. Variaciones en pigmentos fotosintéticos:cambios en contenido de clorofila a	19
3.4. Índice de tolerancia al estrés (ITE).....	20
3.5. Rasgos morfológicos: área foliar y biomasa .....	22
3.6. Verdor .....	24
3.7. Temperatura foliar .....	24
3.8. Rasgos bioquímicos: FRAP, MDA.....	25
3.9. Eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Fv/Fm).....	26
<b>4. Discusión</b> .....	27
<b>5. Conclusión</b> .....	30
<b>Bibliografía</b> .....	31

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional de Córdoba por permitir mi formación académica, a todos los docentes que me transmitieron tanto amor por la carrera que elegí, y a los miembros del tribunal de la tesina por su buena predisposición y sus aportes.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), al Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) y particularmente al Instituto de Fisiología Vegetal y Recursos Genéticos “Ing. Agr. Victorio Segundo Trippi” por recibirme en su ámbito y permitir el uso del equipamiento necesario para el desarrollo del presente trabajo y a todo el personal que de una u otra forma colaboró en este proyecto.

A mi directora Carla, por creer en mí y motivarme continuamente, por el inmenso tiempo dedicado y por sus enseñanzas, que me ayudaron a crecer tanto en lo académico como en lo personal.

A mi codirectora Mariela, por abrirme las puertas de su grupo de trabajo y laboratorio, por sus valiosos aportes y su predisposición para trabajar en este proyecto.

A Pao, siempre dispuesta a enseñarme y ayudarme, explicándome técnicas de laboratorio.

A Gise, mi gran compañera de trabajo, por estar siempre dispuesta a ayudarme y aprender juntas con las mejores intenciones para avanzar.

A Paz y Sofi mujeres fuertes y hermosas que conocí gracias a esta carrera. Por motivarme y estar a mi lado en cada paso.

A Cami y Mica, por su cariño incondicional desde siempre, por acompañarme a la distancia.

A mi familia, lo más valioso que tengo, todo lo que soy hoy es gracias a ellos.

## Resumen

La sequía es el principal factor limitante de la productividad, estabilidad del rendimiento, calidad y cantidad de proteínas y aceites en soja (*Glycine max* L.) La caracterización de genotipos resistentes a la sequía es necesaria y requiere el estudio de diversos parámetros. El objetivo de este trabajo fue clasificar materiales de soja según su tolerancia al déficit hídrico y caracterizar los mecanismos subyacentes. Se evaluaron características fisiológicas y bioquímicas en 24 genotipos de soja en etapa vegetativa, observando su respuesta ante el estrés por sequía. En una primera instancia, se analizaron el contenido relativo de agua (CRA), contenido de prolina y clorofila a, y luego se seleccionaron 5 materiales que fueron analizados en mayor profundidad. Para clasificar los materiales, se calculó un Índice de Tolerancia al Estrés (ITE) para complementar el estudio. En esos materiales se determinó el área foliar, biomasa aérea y radical, verdor, temperatura foliar, capacidad antioxidante total no enzimática (FRAP), daño oxidativo de membranas (MDA) y eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm).

Según los resultados obtenidos, los genotipos más tolerantes a la sequía fueron el PI548510, LAE11139204, LAE11139203, PI48393, y PI339871A. En contraste, los genotipos Champaquí 5.7, Alim 3.44, Himeshirazu fueron los más sensibles. Se destacó la línea PI548510, por su mayor contenido de CRA, prolina y clorofilas en sequía. Mientras, el genotipo PI339871A mostró alto CRA y clorofilas y baja peroxidación de lípidos (MDA), lo que indicaría una reducción del daño oxidativo de membrana como posible mecanismo de tolerancia para ser estudiado en más profundidad. Estos resultados proporcionan la base para futuras investigaciones en estudios de tolerancia a la sequía en genotipos de soja.

**Palabras clave:** soja, déficit hídrico, sequía, prolina, clorofilas, estrés.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de soja (*Glycine max* L.) es un cultivo de gran importancia económica y social en todo el mundo ("FAOSTAT" 2016). Es la oleaginosa más cultivada y el cuarto cultivo de grano más producido después del maíz, trigo y arroz. Actualmente se producen un promedio de 176,6 millones de toneladas de soja al año sobre una superficie de 75,5 millones de ha (Ramadan *et al.*, 2013). El 80% de ese volumen se produce en Estados Unidos, Argentina y Brasil, lo que explica que América sea el continente con mayor producción a nivel mundial (Garcés *et al.*, 2014). El rendimiento de esta especie ha aumentado significativamente debido a la Revolución Verde como resultado de la inversión en infraestructura, el desarrollo del mercado, y los avances en el mejoramiento genético y el manejo agrícola (Pingali, 2012). Los granos de soja son una de las principales fuentes de proteínas para la nutrición humana y animal, así como una fuente de aceite vegetal importante para la producción de biodiesel (Pimentel *et al.*, 2008). La soja contiene entre un 18% y un 20% de aceite, mientras otros cultivos como la canola y el girasol tienen alrededor de 40% (Berglund *et al.*, 2007).

La soja cultivada es una especie de la familia Fabácea (leguminosas), nativa del este del continente asiático, probablemente originaria del centro y norte de China. Es una planta herbácea anual, de ciclo primavero-estival, cuyo ciclo vegetativo oscila de tres a siete meses. Las hojas, tallos y vainas son pubescentes. Tiene un tallo rígido y erecto, adquiere alturas variables, de 0,4 a 1,5 metros, según las variedades y condiciones de cultivo. Sus hojas son alternas, compuestas y trifoliadas excepto las basales, que son simples. El sistema radicular posee una raíz principal que puede alcanzar hasta un metro de profundidad, aunque lo normal es que no supere los 40-50 cm. Ganó gran importancia en los últimos años debido a su fácil cultivo, bajo requerimiento de nitrógeno y alta relación costo-beneficio (<https://www.sinavimo.gob.ar/cultivo/glycine-max>).

En Argentina, la región sojera se extiende desde la latitud 23° a la 39° Sur, lo que representa un amplio rango de condiciones ambientales como precipitaciones, radiación solar y temperatura (Carrera *et al.*, 2009). El cultivo se realiza mayoritariamente bajo secano (agua proveniente de napas y lluvias, sin riego suplementario), por lo que la falta de humedad debido a la escasez de lluvias y riego deficiente frecuentemente provoca estrés por sequía.

La sequía es una de las principales causas naturales de daño agrícola, ambiental y socioeconómico (Coronel, 2013). Según la organización meteorológica mundial, se define a la sequía como un “periodo sostenido y prolongado de deficiencia de precipitación” (WMO, 1986). En el contexto del cambio climático, se espera que la escasez de agua se vuelva una problemática cada vez más severa (Wang *et al.*, 2005), con sequías más intensas y frecuentes. Actualmente, en el norte de Argentina, Chile, Colombia y Venezuela se reportaron déficit de precipitaciones y condiciones de sequía en febrero y marzo del año 2020 (Ciencia de la NASA, 2020).

Las plantas experimentan estrés por sequía cuando el suministro de agua se vuelve deficiente en las raíces o cuando la tasa de transpiración en las hojas resulta ser alta. Estas dos condiciones coexisten regularmente en zonas áridas y semiáridas (Anjum *et al.*, 2011). En la planta, la sequía genera un déficit hídrico, que se corresponde con una reducción en el contenido en agua de los tejidos o células, resultando inferior al óptimo (Taiz y Zeiger, 2006). La respuesta de las plantas al estrés por sequía es un rasgo complejo que involucra múltiples mecanismos (Cushman *et al.*, 2000). Entre los procesos vitales alterados se encuentran una reducción de la tasa fotosintética y del crecimiento aéreo, inducción del crecimiento radical, la acumulación de compuestos osmocompatibles, la generación de estrés oxidativo y la activación de la respuesta antioxidante, entre otros.

El sistema radical es el primer órgano en detectar y señalar al resto de la planta el déficit hídrico en el suelo. Una de las respuestas más comunes es la estimulación del crecimiento radical (Potters *et al.*, 2007). Además, la inducción de la síntesis de la hormona vegetal llamada ácido abscísico (ABA), señala el cierre estomático en la parte aérea (Pirasteh-Anosheh *et al.*, 2016). Estas respuestas permiten acceder a capas más profundas del suelo en busca de su hidratación y restringir la pérdida de agua por evaporación, pero también conducen a la reducción de la fotosíntesis y del crecimiento aéreo. En conjunto, tanto el cierre estomático como la reducción del área foliar conducen a la capacidad fotosintética total y del rendimiento (Pirasteh-Anosheh *et al.*, 2016). La disminución de biomasa aérea no solamente reduce la pérdida de agua por transpiración, sino que también impacta negativamente en la capacidad de fijación de carbono, lo cual causa la reducción del rendimiento producto de la sequía. Por otra parte, el cierre estomático, al evitar la evaporación de agua, conduce a un incremento de la temperatura foliar (el cambio de estado del agua de líquido a gaseoso requiere un alto gasto de energía que contribuye a la refrigeración de los tejidos foliares) (Islam *et al.*, 2018), que puede

ser detectada fácilmente, a diferencia de otros procesos mencionados que requieren equipamiento de mayor complejidad y costo.

A nivel bioquímico, el estrés por déficit hídrico usualmente causa reducción en la concentración de pigmentos fotosintéticos como clorofilas y carotenoides (Havaux, 1998, revisado por Monteoliva *et al.*, 2021). Las clorofilas son moléculas complejas encargadas de la absorción, transferencia y conversión fotoquímica de la energía lumínica que sustentan la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2008). La disminución que usualmente ocurre a causa del estrés, puede ser consecuencia de la fotooxidación de los pigmentos (daño oxidativo) así como de la estimulación de su degradación mediante un proceso de senescencia inducida por el estrés. Dado que las clorofilas son uno de los mayores componentes del cloroplasto, su contenido relativo tiene una relación positiva con la tasa de fotosíntesis (Jaleel *et al.*, 2009) y el rendimiento (Liang *et al.*, 2010). Algunos reportes indican que es posible encontrar genotipos tolerantes que preservan las clorofilas de la degradación durante el estrés por sequía (Avramova *et al.*, 2015; Monteoliva *et al.*, 2021).

Además de monitorear la regulación de la apertura estomática y la partición de biomasa aérea y radical, otra respuesta que ocurre especialmente ante estrés moderado y a mediano plazo, es la acumulación de osmolitos compatibles en los tejidos vegetales. Los osmolitos compatibles son compuestos orgánicos, de bajo peso molecular, que permiten el ajuste osmótico, es decir, la reducción del potencial osmótico sin reducción del volumen celular y facilitan la toma de agua de la planta (Cushman, 2001). Existen numerosos compuestos osmóticamente activos como azúcares y aminoácidos (por ejemplo, sacarosa y prolina, respectivamente). Los azúcares proporcionan sustrato para el crecimiento en condiciones normales y se utilizan para la síntesis de reguladores osmóticos (Saxena *et al.*, 2013). El aminoácido prolina en cambio, tiene funciones protectoras como la estabilización de proteínas, membranas y estructuras subcelulares, ajuste del potencial redox y reducción de la acidez celular (Hare *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 2015; Forlani *et al.*, 2019). Además, la degradación de prolina después del estrés puede mantener suficientes agentes reductores y energía para la síntesis de adenosina trifosfato (ATP) para que las plantas se recuperen y reviertan los daños inducidos por este (Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2005). La acumulación de prolina está asociada con la capacidad de la soja para tolerar la sequía (Akitha Devi *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2020), convirtiendo a este aminoácido en un marcador de estrés relevante para la clasificación de genotipos (Signorelli *et al.*, 2017).

Por último, la sequía desencadena un estrés secundario en los tejidos llamado estrés oxidativo, cuando las oxidaciones superan la capacidad del sistema antioxidante de los tejidos vegetales (Monteoliva *et al.*, 2018). El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la generación de ROS y la neutralización de estas por parte de los sistemas antioxidantes (Halliwell *et al.*, 2006). Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son subproductos de la respiración celular, generadas como consecuencia de una reducción incompleta del O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O. Las ROS usualmente poseen uno o más electrones desapareados, lo cual los hace extremadamente reactivos y altamente tóxicos para el organismo. Se generan fundamentalmente en las mitocondrias, los cloroplastos y el citoplasma (Mittler, 2002; Del Río *et al.*, 2016). El daño oxidativo puede incidir de manera negativa en procesos celulares tales como la respiración, cuando afecta las membranas mitocondriales, y la fotosíntesis, cuando afecta las membranas tilacoidales de los cloroplastos (Mahouachi *et al.*, 2005). Cuando sufren un estrés ambiental, se activa el sistema de defensa antioxidante de la planta reduciendo el daño oxidativo (Fan *et al.*, 2017). El estado redox de los tejidos vegetales se puede caracterizar mediante la cuantificación de la capacidad antioxidante no enzimática a través del poder reductor del hierro (FRAP), y el daño de membranas se puede cuantificar mediante la detección de un lípido de membranas peroxidados (Malondialdehído o MDA) (Bai *et al.*, 2010), entre otros métodos disponibles.

A grandes rasgos, la forma en que cada uno de esos metabolismos es alterado en respuesta al estrés por sequía depende del genotipo, la duración del estrés y la etapa del desarrollo de la planta (Çakir, 2004; Monteoliva *et al.*, 2021). Esa diversidad de respuestas posibilita clasificar los genotipos según su grado de tolerancia y seleccionar aquellos más promisorios para utilizar como parentales en programas de mejoramiento. El INTA cuenta con un banco de germoplasma de soja (Estación Experimental Marcos Juárez y Estación Experimental Agropecuaria Paraná), parcialmente caracterizado para diversas respuestas de interés agropecuario, como calidad de grano y contenido de aceite. Dada la creciente importancia de desarrollar cultivares tolerantes a la sequía, el grupo de Estrés Hídrico del IFRGV-UDEA (INTA) desarrolló y validó un sistema experimental para la caracterización de estos materiales según su tolerancia a la sequía, utilizando dos cultivares comerciales (A 5009 RG y ADM 50048) con características contrastantes de tolerancia, como testigos (tolerante y sensible, respectivamente; Guzzo *et al.*, 2021). Este sistema experimental permite la clasificación de los materiales en etapas tempranas del

desarrollo lo cual reduce los tiempos necesarios para las evaluaciones a campo. En este proyecto, se utilizó este sistema experimental ya validado para clasificar 24 materiales del Banco de germoplasma y profundizar en la caracterización de algunos de ellos. Los materiales identificados como más tolerantes serán insumos del programa de mejoramiento de INTA.

## **1.1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis**

Los materiales de soja del Banco de germoplasma de INTA presentan variabilidad y diversos mecanismos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de tolerancia al estrés por déficit hídrico.

### **Objetivo general**

Clasificar materiales de soja del Banco de germoplasma del INTA según su tolerancia al déficit hídrico y caracterizar los mecanismos subyacentes.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar la variabilidad en la tolerancia a la sequía en 24 materiales de soja del banco de germoplasma de INTA, según 3 marcadores previamente establecidos por el grupo de trabajo (contenido relativo de agua, prolina y clorofila).
2. Caracterizar las respuestas morfológicas de los materiales seleccionados como potencialmente tolerantes, sometidos a estrés por sequía.
3. Caracterizar las respuestas fisiológicas y bioquímicas de los materiales seleccionados como potencialmente tolerantes, bajo estrés por sequía.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

Los genotipos de soja (*Glycine max* L.) A 5009 RG (NA 5009) y ADM 50048 (DM 50048), caracterizados previamente por el grupo de trabajo (Guzzo *et al.*, 2021) fueron utilizados como testigos tolerante y sensible a la sequía, respectivamente. Los 24 materiales de este proyecto fueron provistos por el banco de germoplasma de la Estación Experimental Agropecuaria Marcos Juárez (INTA) y Estación Experimental Agropecuaria Paraná (Tabla 1), de los cuales el Banco de Germoplasma no posee información sobre la tolerancia a la sequía en estos genotipos.

En el presente trabajo, las plantas se analizaron dentro del estadio vegetativo (V3) cuando el tercer nudo se encuentra desarrollado y la segunda hoja trifoliada expandida, según la escala de estadios fenológicos para soja, desarrollada por Fehr y Caviness (1977). Esta escala describe la morfología del cultivo independientemente del genotipo y de otras condiciones variables (como el sitio, fecha de siembra y densidad).

**Tabla 1.** Materiales de soja analizados en este trabajo.

	GENOTIPO
1.	A 5009 RG
2.	ADM 50048
3.	A4613
4.	Alim 3,44
5.	Alim 5.9
6.	Champaquí 5.7
7.	Himeshirazu
8.	Jackson
9.	JO 101
10.	LAE11137176
11.	LAE111390207
12.	LAE11139199
13.	LAE11139203
14.	LAE11139204
15.	LAE11140211
16.	Munasca
17.	PI339871A
18.	PI404166
19.	PI408251
20.	PI416937
21.	PI438489B
22.	PI48393
23.	PI548510
24.	PI548558

### 2.2. Sistema experimental

Los experimentos se realizaron en el invernadero del IFRGV-UDEA en condiciones semi-controladas: temperatura mínima de 18 °C y máxima 30 °C, y luz suplementaria con un fotoperiodo de 16:8 hs (luz: oscuridad).

*Sustrato.* Para el crecimiento de las plantas se utilizó tierra: arena en proporción de volumen 1:1, el suelo es una mezcla de mantillo no estandarizada. Fue secado a 105 °C

durante 24 hs. El sustrato seco fue pesado (peso seco), regado a saturación y pesado luego de 24 hs (considerada “capacidad de campo”, o CC) y con ello se obtuvo el volumen máximo de agua o contenido hídrico del suelo (100 % de la CC). Luego, una vez suspendido el riego, se pesó diariamente cada maceta para monitorear el contenido hídrico porcentual respecto de la CC.

*Siembra.* Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (5% v/v) durante 5 min y enjuagadas 5 veces con agua destilada. Fueron incubadas en una cámara húmeda sobre papel de filtro estéril a 25 °C en oscuridad por 3-5 días. Una vez emergida la radícula con un crecimiento de 2 cm de longitud, fueron trasplantadas a macetas.

*Estrés por sequía.* El estrés se inició por suspensión del riego, cuando las plantas comenzaron a expandir la segunda hoja trifoliada (más de 2 cm de longitud, día 0). En el día 0, las macetas se regaron hasta la saturación y al día siguiente se pesaron para calcular la capacidad máxima de retención de agua del suelo. A partir de ese momento, se fue reduciendo el riego para acompañar la disminución progresiva del contenido de agua hasta llegar al 30% en el día 7, en todas las macetas sometidas a sequía de todos los genotipos y se mantuvo en ese nivel de humedad durante una semana. La disminución del contenido hídrico del suelo fue monitoreada diariamente por gravimetría (pesando las macetas en una balanza) para que la velocidad de reducción del agua en el sustrato sea similar en todos los genotipos. Un set similar de plantas de cada genotipo fue mantenido con riego a capacidad de campo durante todo el ensayo como “control en riego”.

Cada genotipo fue evaluado en 3 ensayos independientes. En cada uno de los ensayos y para cada genotipo, se evaluaron n=10 plantas por tratamiento: 10 controles en riego y 10 en sequía para cada genotipo.

*Colección de muestras.* Para todos los análisis fisiológicos, morfológicos y bioquímicos, se utilizó el foliolo central de la segunda hoja trifoliada, una vez que el sustrato alcanzó el 30 % de la capacidad de campo o luego de 7 días. Para las determinaciones bioquímicas, se cortó el foliolo central completo y se congeló en nitrógeno líquido y se preservó a -80 °C, hasta el momento de realizar las determinaciones. Para las determinaciones, se colectaron muestras de 9 plantas diferentes, agrupándose de a 3 y, de cada uno de esos 3 grupos de hojas, se analizaron por triplicado para cada parámetro. Este procedimiento fue repetido en 3 ensayos independientes.



**Fig. 1.** Fotografía del invernadero donde se llevaron a cabo los ensayos, puede observarse plantas de soja en condiciones semicontroladas.

### **2.3. Parámetros morfológicos:**

*Superficie foliar individual.* La superficie foliar se calculó a partir de la medición del ancho y largo de la hoja, con la fórmula del óvalo ( $R1 \cdot R2 \cdot 3,14$ ). Este parámetro fue medido a los 7 días, cuando alcanzaron el 30% del contenido hídrico del suelo.

*Biomasa fresca y seca.* Al finalizar el ensayo, se realizó la cosecha de la biomasa total, tanto aérea como radical. En el caso de las raíces, luego de ser removidas de la maceta, se lavaron con agua de grifo y se secaron con papel absorbente, antes de obtener el peso fresco. El peso fresco total (PF) de cada planta se midió en el momento de la recolección. Luego, las muestras fueron secadas a en estufa a 65 °C durante 72 h y se pesaron para determinar el peso seco (PS).

### **2.4. Parámetros fisiológicos:**

*Contenido relativo de agua (CRA).* Las hojas se cortaron y pesaron cerca del mediodía obteniendo el peso fresco (PF), luego fueron incubadas en una cámara oscura y húmeda a 4 °C durante 18 h, obteniendo el peso saturado (PSat), y finalmente se secaron a 65 °C hasta peso constante donde se determinó el peso seco (PS) (Barr *et al.*, 1962). Se aplicó la siguiente fórmula:

$$CRA = \frac{PF - PS}{PSat - PS} \cdot 100$$

*Temperatura foliar.* La temperatura se midió en la segunda hoja trifoliada completamente

expandida, en el foliolo central, usando un termómetro infrarrojo HT-817. Este parámetro fue medido a los 7 días, cuando alcanzaron el 30% del contenido hídrico del suelo. Las mediciones se realizaron en cada planta individual para cada ensayo independiente.

*Verdor.* Se determinó en la segunda hoja trifoliada de cada planta con el medidor CL-01 (Hansatech).

*Fluorescencia de clorofilas.* Se determinó la eficiencia cuántica máxima del PSII (Fv/Fm), mediante un medidor de pulso modulado Pocket PEA (Hansatech), las mediciones se efectuaron entre las 09:00 y 11:30 h sobre el foliolo central de cada hoja, durante días soleados y despejados. Fue medido a los 7 días, cuando alcanzaron el 30% del contenido hídrico del suelo. Este parámetro disminuye cuando la planta está sometida a algún tipo de estrés, tanto biótico como abiótico, y es indicativo de procesos de fotoinhibición dados por daños fotooxidativos de proteínas esenciales del PSII (Greer, 1998).

## **2.5. Parámetros Bioquímicos:**

*Prolina.* Se cuantificó usando el ensayo de ninhidrina (Bates *et al.*, 1973), en el cual se homogeneizó el tejido vegetal, se resuspendió en ácido sulfosalicílico al 3% (p/v) y centrifugó a 12000 rpm a 4 °C durante 10 min. El producto de reacción coloreado se extrajo con un volumen de tolueno y el sobrenadante se cuantificó mediante espectrofotometría a 520 nm. La concentración de prolina se calculó en base a una curva de calibración de L-prolina.

*Clorofilas a.* El contenido de clorofilas se determinó en extractos etanólicos (1 mg PF/1 ml etanol 95% v/v) (Lichtenthaler, 1987; Monteoliva *et al.*, 2019). Se calentó durante 20 min a 80 °C, centrifugó 5 min a 5000 rpm. El pellet se resuspendió dos veces más con una proporción final de 1 ml de etanol por 10 mg de biomasa fresca inicial a fin de extraer completamente las clorofilas remanentes. Se colectaron todos los sobrenadantes en un mismo tubo y se diluyeron 10 veces en etanol al 95% v/v. Se midió la absorbancia a 470, 648 y 664 nm. La concentración de clorofila a se calculó según la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g Clorofila a/ml extracto} = 13.36 (A_{664,2}) - 5.19 (A_{648,6})$$

*Peroxidación lipídica (MDA).* El daño de la membrana se evaluó midiendo el contenido

de malondialdehído (MDA), un indicador de lípidos peroxidados, según Hodges *et al.*, 1999, con modificaciones menores. Se homogeneizaron 50 mg de hojas con 1 ml de etanol al 80% v/v y se centrifugaron a 14000 g durante 10 min. Después de la centrifugación, 0,25 ml de sobrenadante se mezclaron con 0,5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,65% (p/v)) en 20% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) y se incubó en baño de agua caliente (90 °C) durante 20 min. Se enfrió inmediatamente en un baño de hielo para detener la reacción y se centrifugó a 14000 g durante 10 min.

Se midió la absorbancia a 532 y 600 nm y la concentración de MDA se estimó restando la absorción inespecífica a 600 nm de la absorción a 532 nm, utilizando el coeficiente de extinción (155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). El contenido de MDA se expresó como nmol por mg de PF.

*Capacidad férrica reductora de plasma (FRAP)*. La capacidad antioxidante total no enzimática se determinó según el método de Benzie y Strain, 1996. Se tomaron 5 µl de la extracción etanólica utilizada para la medición de MDA y se hicieron reaccionar con 100 µl de una mezcla que contenía buffer acetato de sodio 0,25 M pH 3,6, TPTZ 0,83 mM y FeCl<sub>3</sub> 16,6 mM. Luego de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 600 nm. Los resultados fueron referidos en µmoles cm<sup>-2</sup> utilizando para esto una curva de concentraciones conocidas de TROLOX realizada en paralelo a las muestras medidas cada vez.

## 2.6. Cálculos y análisis de datos

*Índice de tolerancia al estrés (ITE)*, expresa el efecto relativo del estrés en relación con el máximo potencial en condiciones óptimas para cada genotipo. Al ser valores relativos permiten comparar materiales con respuestas variables en su magnitud inicial absoluta. Este índice, se estimó para el contenido relativo de agua, prolina y clorofilas para cada uno de los 24 genotipos, según la ecuación propuesta por Fernández, 1992:

$$ITE = (Y_s * Y_p) / \bar{Y}_{p2}$$

$Y_s$  e  $Y_p$  representan el valor de las variables bajo condiciones de estrés y no estrés (parámetro óptimo control) respectivamente, para cada genotipo, y  $\bar{Y}_{p2}$  es la media del valor de las variables bajo la condición sin estrés para todos los genotipos.

Los genotipos con ITE más cercano a 1 fueron los más tolerantes al déficit hídrico, y los que fueron cercanos a 0, los más sensibles, según los parámetros analizados.

Para calcular el ranking se promediaron los tres índices calculados anteriormente (CRA, prolina y clorofilas), para cada uno de los genotipos.

*Análisis estadístico.* Los resultados fueron analizados mediante el test de Análisis de la Varianza y análisis a posteriori de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0,01$ , utilizando los programas Infostat y Graphpad prism.

### **3. RESULTADOS**

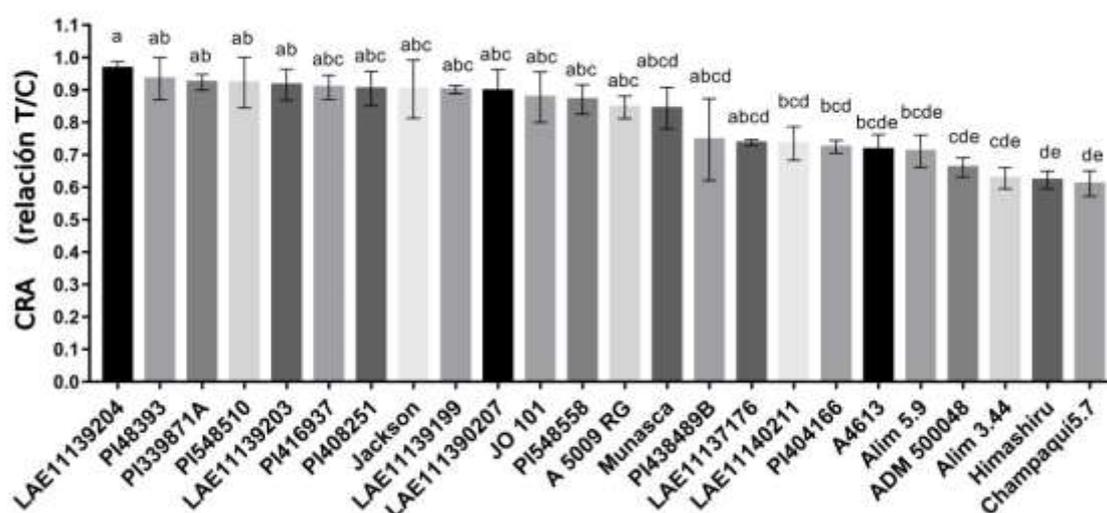
Los 24 genotipos de soja fueron analizados bajo condiciones de estrés por déficit hídrico, incluyendo dos testigos, uno sensible (ADM 50048) y otro tolerante a la sequía (A 5009 RG). Los genotipos ADM 50048 y A 5009 RG fueron seleccionados como testigos, según sus respuestas contrastantes al estrés por déficit hídrico previamente caracterizados por Silvente *et al.*, 2012 y este grupo de trabajo (Guzzo *et al.*, 2021).

#### **3.1. Contenido relativo de agua**

El contenido relativo de agua (CRA) mostró variabilidad en la respuesta a sequía en los materiales evaluados. Las plantas bajo riego mostraron valores entre 87% y 94%, mientras las plantas en sequía oscilaron entre 56% y 88% (no mostrado). En general, comparando las plantas de cada genotipo en sequía con el mismo genotipo bajo riego, el valor de CRA disminuyó en todos los genotipos.

En la Figura 2, se muestra la proporción de cambio en el CRA producida por la sequía respecto de plantas en riego, para cada genotipo. Esta forma de expresar los resultados permite comparar la proporción de cambio generada por la sequía en genotipos con niveles basales (en riego) variables.

Entre los 24 materiales analizados, 10 disminuyeron por debajo del 70% de CRA, indicando que son materiales sensibles. Las mayores disminuciones se observaron en los genotipos PI404166, A4613, Alim 5.9, Alim 3.44, Himeshirazu, Champaqui 5.7, y el testigo sensible (ADM 50048) (Fig. 2).

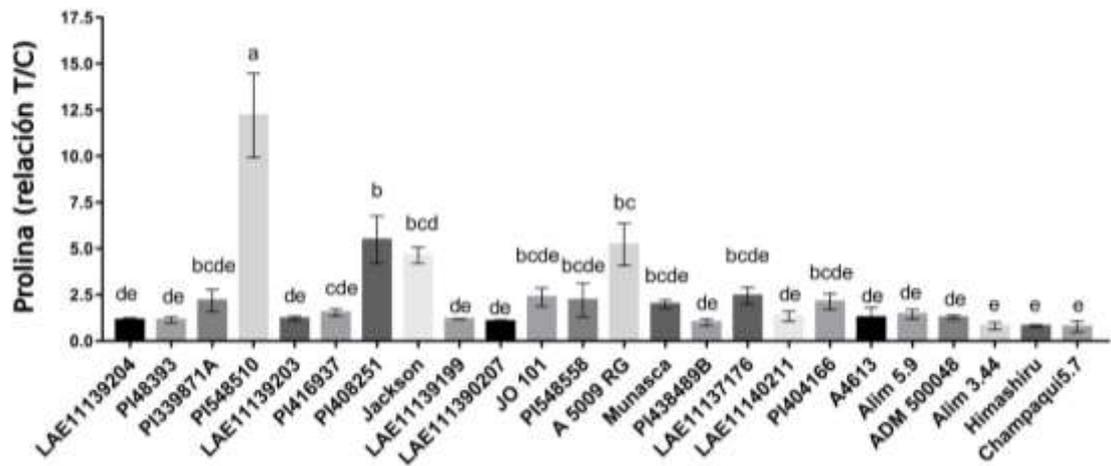


**Fig. 2. Contenido relativo de agua de las hojas de soja en estrés por sequía al 30% CHS a los 7 días de iniciada la sequía.** ADM 50048, control sensible A 5009 RG, control tolerante. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (n=10). Letras compartidas indican diferencias no significativas (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

El resto de los materiales se mantuvo por encima del 70%. Entre ellos, 11 mantuvieron el CRA por encima del 80%. La menor disminución porcentual (entre 3 y 8% relativa al control en riego, es decir los genotipos que mostraron menor sensibilidad a la sequía) fue registrada en las variedades LAE11139204, PI48393, PI339871A, PI548510 y LAE11139203.

### 3.2. Variaciones en el ajuste osmótico: cambios en contenido de prolina

Se sabe que la prolina se acumula en tejidos de soja bajo sequía (Hossain *et al.*, 2014; Tripathi *et al.*, 2016; Buezo *et al.*, 2019), y su acumulación está asociada con la capacidad de la planta para tolerarla (Akitha Devi *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2020). En este estudio, los genotipos de soja analizados mostraron variabilidad en el contenido de prolina en tejidos foliares bajo estrés (no mostrado). En la Figura 3, se muestra la proporción de cambio en el contenido de prolina observada entre plantas en sequía y en riego para cada genotipo.

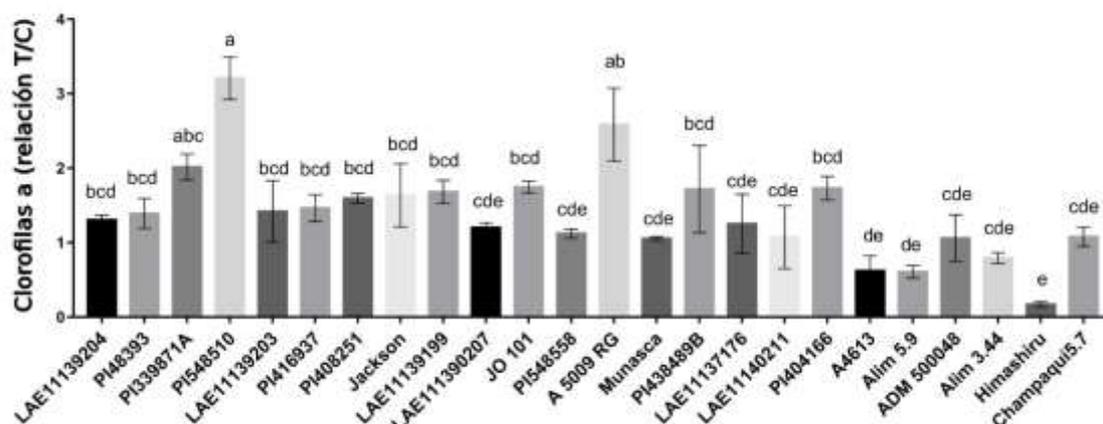


**Fig. 3. Contenido de prolina al 30% CHS a los 7 días de iniciada la sequía.** Genotipos control susceptible ADM 50048 y control tolerante A 5009 RG. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (n=10). Letras compartidas indican diferencias no significativas (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

Los mayores incrementos relativos se vieron en PI548510 (12,20 veces), PI408251 (5,5 veces), Jackson (4,59 veces), JO101 (2,25 veces), LAE11137176 (3,49 veces) PI548558 (2,10 veces) y con respecto del control bajo riego. El resto de los genotipos no presentaron cambios significativos o redujeron su contenido de prolina en sequía (Fig. 3).

### 3.3. Variaciones en pigmentos fotosintéticos: cambios en contenido de clorofila a

Las clorofilas desempeñan un importante papel en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Jahan *et al.*, 2014) y su disminución es un síntoma de alteraciones en el proceso de fotosíntesis (Khairi *et al.*, 2015). El contenido de clorofilas mostró variabilidad en los materiales analizados tanto en riego como en sequía (no mostrado). En la Figura 4, se muestra la proporción de cambio causada por la sequía en el contenido de clorofilas (T/C). La mayoría de los materiales mostró incrementos bajo restricción hídrica (valores mayores a 1).



**Fig. 4. Contenido de clorofila a en genotipos de soja bajo estrés al 30% CHS a los 7 días de iniciada la sequía.** Genotipos control susceptible ADM 50048 y control tolerante A 5009 RG. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (n=10). Letras compartidas indican diferencias no significativas (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

Las clorofilas aumentaron en mayor proporción en los genotipos PI339871A, PI548510, LAE11139199, JO101, PI438489B, PI404166, de forma similar al testigo tolerante. El valor más alto de este parámetro se registró en PI548510, la cual en sequía acumulo 3,2 veces más clorofilas que en riego. Mientras que los materiales A4613, Alim 5.9, Alim 3,44 e Himeshirazu, mostraron las mayores disminuciones del contenido de clorofilas respecto del control regado y en forma similar al testigo sensible (entre 20% y 83% menos), quedando por debajo de los valores obtenidos para el testigo tolerante.

### 3.4. Índice de tolerancia al estrés (ITE)

Para evaluar la tolerancia relativa al estrés de los 24 genotipos de soja, se calcularon los Índices de Tolerancia al estrés (ITE) para CRA, prolina y clorofilas. Utilizando ese índice, se observaron diferencias significativas entre los genotipos considerando cada parámetro. Los resultados mostraron que genotipos más tolerantes tenían valores altos de clorofilas a y CRA, mientras los genotipos más sensibles tuvieron valores más bajos.

Utilizando los ITEs obtenidos para los tres parámetros, se calculó un ranking para clasificar los genotipos según su grado de tolerancia al estrés (Tabla 2). Los genotipos PI548510, LAE11139204, JO 101, Alim 5.9, LAE11139203, A4613, Jackson, LAE11140211, PI438489B quedaron ubicados entre los primeros niveles del ranking, lo que sugiere que son más tolerantes al estrés, según los parámetros considerados. En contraste, los genotipos Champaquí 5.7, Alim 3.44 y Himeshirazu obtuvieron valores de clasificación más bajos y, por lo tanto, serían los más sensibles a la sequía.

**Tabla 2.** Índices ITE de los tres parámetros fisiológicos (CRA: contenido relativo de agua, PRO: prolina, CLO: clorofilas a) y valores de ranking de los 24 genotipos de soja bajo condiciones de estrés por sequía.

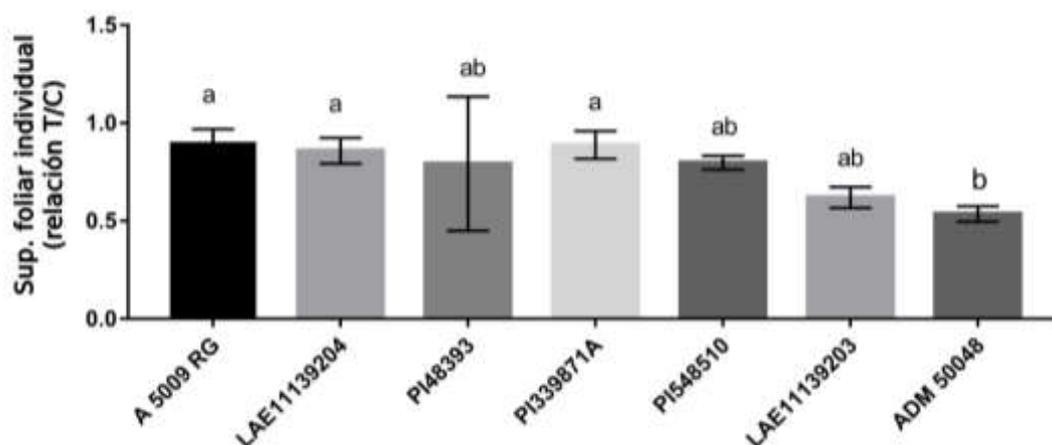
GENOTIPO	ITE CRA	ITE CLO	ITE PRO	ITE ponderado	RANKING
PI548510	0,91	0,92	1,00	0,94	1
LAE11139204	1,00	1,00	0,02	0,67	2
JO 101	0,87	0,95	0,16	0,66	3
Alim 5.9	0,74	0,83	0,25	0,61	4
LAE11139203	0,97	0,79	0,03	0,60	5
A4613	0,75	0,91	0,09	0,59	6
Jackson	0,86	0,60	0,20	0,55	7
<b>A 5009 RG</b>	0,91	0,59	0,11	0,53	8
LAE11140211	0,81	0,66	0,04	0,50	9
PI438489B	0,72	0,66	0,03	0,47	10
PI48393	0,94	0,38	0,04	0,45	11
PI408251	0,93	0,36	0,06	0,45	12
PI548558	0,91	0,39	0,05	0,45	13
PI416937	0,94	0,35	0,04	0,44	14
LAE111390207	0,95	0,33	0,04	0,44	15
PI404166	0,79	0,46	0,06	0,44	16
Munasca	0,82	0,41	0,06	0,43	17
LAE11137176	0,78	0,40	0,05	0,41	18
LAE11139199	0,91	0,24	0,03	0,39	19
PI339871A	0,92	0,17	0,04	0,38	20
Champaquí5.7	0,64	0,38	0,05	0,36	21
<b>ADM 500048</b>	0,74	0,29	0,03	0,35	22
Alim 3,44	0,65	0,21	0,00	0,29	23
Himeshirazu	0,64	0,08	0,03	0,25	24

En base a los valores obtenidos por el ranking y los parámetros analizados anteriormente, se seleccionaron 5 genotipos para realizar un análisis más amplio de las respuestas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas asociadas a la tolerancia. Estos materiales fueron seleccionados según una combinación de criterios. Por un lado, se eligieron algunos de los genotipos más tolerantes, también se consideraron algunas líneas que tuvieron alto CRA y bajo contenido de clorofilas y prolina, y se incluyó la línea PI339871A debido a que presentó una morfología particular con potencial de alta

tolerancia al estrés. Los materiales seleccionados fueron PI548510, LAE11139204, LAE11139203, PI48393, y PI339871A. Las determinaciones se realizaron a los 7 y 14 días luego de iniciado el estrés, pero se muestran solo los resultados iniciales (7 días), ya que las respuestas se mantuvieron similares para la mayoría de los parámetros.

### 3.5. Rasgos morfológicos: Superficie foliar individual y biomasa

A nivel morfológico se determinó la superficie foliar individual (del foliolo central de la segunda hoja trifoliada) y la biomasa aérea total fresca y seca. Como se puede observar en la Figura 5, la superficie foliar se redujo en todos los genotipos expuestos a sequía (valores menores a 1). En genotipos más tolerantes, esta relación no se vio afectada significativamente. La mayor superficie foliar en sequía se observó en los genotipos LAE11139204 y PI339871A, tanto a los 7 (Figura 5) como a los 14 días de tratamiento (no mostrado). En el testigo sensible, ADM 50048, se puede observar la proporción sequía/riego más baja, mostrando un área foliar casi 50% menor en sequía que en riego.

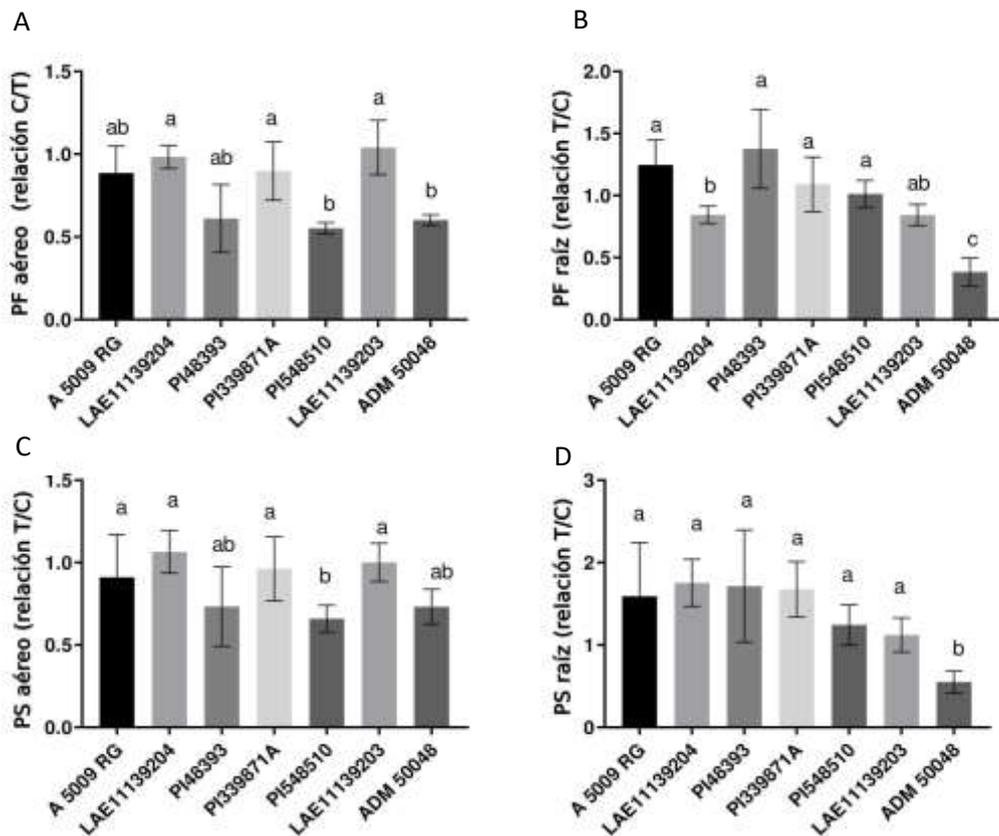


**Fig. 5. Superficie foliar de genotipos de soja bajo estrés por sequía, a los 7 días de iniciada la sequía.** Se determinó la superficie foliar como se detalla en materiales y métodos, midiendo el largo y ancho del foliolo central de la segunda hoja trifoliada (contenido hídrico del suelo de 30%). Se muestran las medias  $\pm$  SD de cada genotipo en 3 experimentos independientes con  $n=10$  para cada tratamiento. Letras compartidas indican diferencias no significativas (ANOVA,  $p<0,01$ ).

El peso aéreo fresco y seco en plantas bajo riego fue similar entre los genotipos evaluados (datos no mostrados), mientras que, en sequía, la proporción de biomasa aérea entre las plantas bajo estrés por sequía y las plantas con riego (T/C) se redujo en todos los genotipos, de forma similar para el peso fresco y peso seco (Fig. 6 A y C). En cuanto a la

proporción de peso fresco (PF) aéreo entre plantas tratadas con sequía y plantas bajo riego los genotipos LAE1113204, PI339871A, LAE11139203 presentaron diferencias significativas con respecto al genotipo PI548510 y al testigo sensible (Fig. 6A). En la proporción de peso seco (PS) aéreo se pudo observar que los genotipos LAE1113204, PI339871A, LAE11139203 y testigo tolerante fueron significativamente diferentes a PI548510 (Fig. 6C).

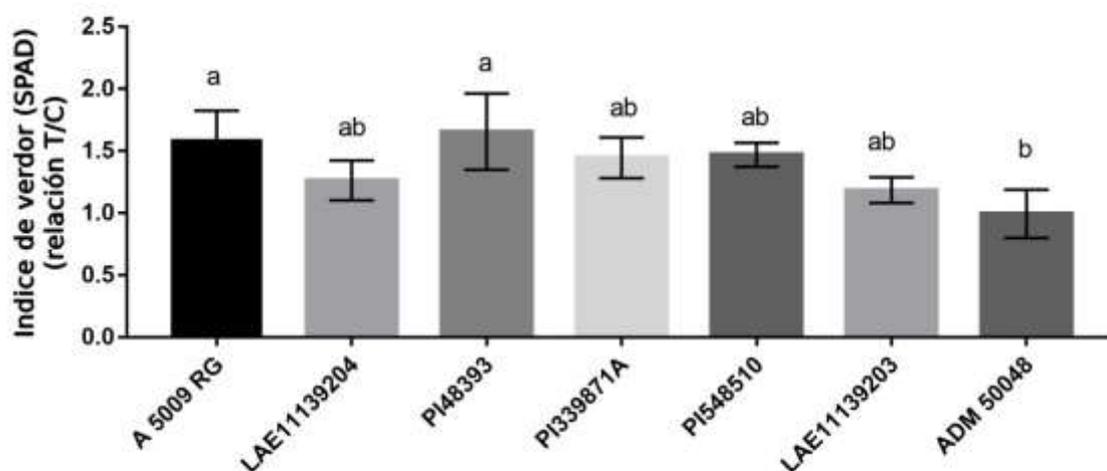
La proporción de biomasa radical fresca (T/C) fue superior a 1 en los genotipos PI48393, PI339871A, PI548510, siendo significativamente diferente del genotipo LAE1113204 y del testigo sensible (Fig. 6B). La proporción de peso seco radical (T/C) en todos los genotipos fue igual y significativamente diferente del testigo sensible (Fig. 6D).



**Fig. 6. Biomasa fresca (PF) y seca (PS) de genotipos de soja en sequía.** PF aéreo (A), PF raíz (B), PS aéreo (C), PS raíz (D). Se determinó el peso a los 7 días de tratamiento (contenido hídrico del suelo de 30%). Se muestran las medias  $\pm$  SD de cada genotipo en 3 experimentos independientes con  $n=10$  para cada tratamiento. Letras compartidas indican diferencias no significativas (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

### 3.6. Verdor

El verdor es un indicador del contenido de clorofilas. En los 7 materiales evaluados se observó un incremento bajo sequía, excepto en el testigo sensible (sin cambios respecto del control en riego) (Figura 7). Los cambios en verdor variaron entre los diferentes genotipos en el transcurso de los días. A los 7 días de sequía, el mayor incremento relativo en el verdor se observó en el genotipo PI48393 (y en el testigo tolerante), mientras el mayor verdor a los 14 días se registró en el genotipo PI548510 (y el testigo tolerante, no mostrado), siendo estos los únicos materiales que se diferenciaron significativamente del testigo sensible. Además, el máximo verdor en términos absolutos se registró en la PI339871A tanto en riego (11,52 y 12,28) como en sequía (16,45 y 17,25) a los 7 y 14 días (respectivamente).



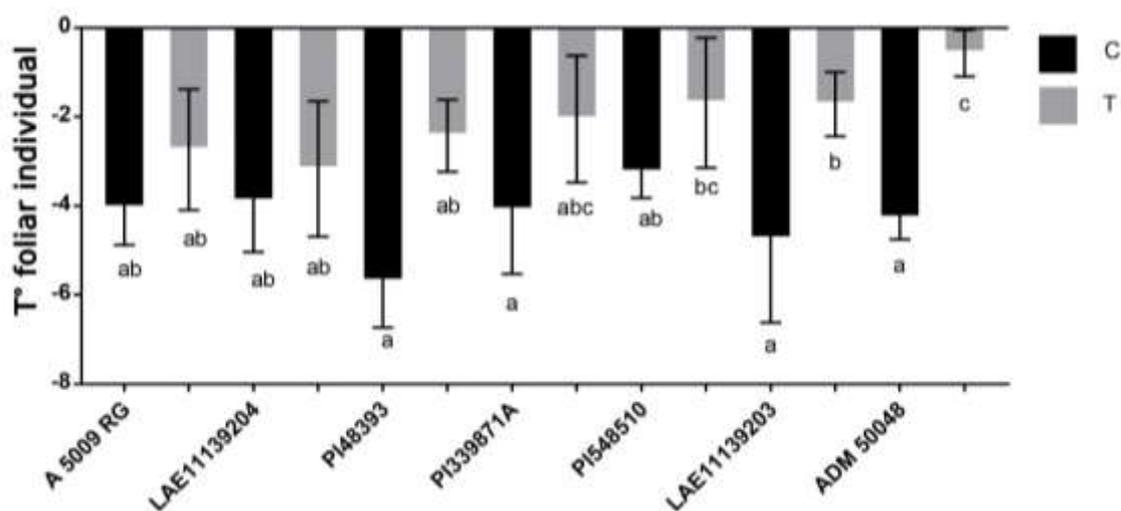
**Fig. 7. Verdor en genotipos de soja bajo sequía.** 7 días de tratamiento (contenido hídrico del suelo de 30%). Se determinó el verdor mediante uso del SPAD en la segunda hoja trifoliada. Se muestran las medias  $\pm$  SD de cada genotipo en 3 experimentos independientes con  $n=10$  para cada tratamiento. Letras compartidas indican diferencias no significativas (ANOVA,  $p<0,01$ ).

### 3.7. Temperatura foliar

La transpiración juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas ya que el transporte de agua interno depende de esta, el intercambio de gases (incluyendo la entrada de  $CO_2$ ) y juega un rol vital en la regulación de la temperatura. El cierre de estomas disminuye el intercambio de gases, y al reducirse la evaporación de

agua en las hojas, la temperatura de esta aumenta. Esos cambios en la temperatura pueden usarse como un indicador de la transpiración/evaporación de agua en las hojas (Liu *et al.*, 2009). Se espera que, en hojas de plantas bajo sequía, aumente el cierre estomático y se incremente la temperatura foliar (en comparación con la temperatura de una hoja en riego a CC). En este proyecto, nos interesa particularmente que la tolerancia no sea mediada por un cierre estomático total, ya que eso impactaría negativamente en el rendimiento.

En la Figura 8, se muestra la variación de temperatura registrada en las plantas bajo riego y estrés por sequía. El testigo sensible se diferencia claramente del resto de los materiales (con una diferencia de más de 3°C entre hojas de plantas regadas y en sequía). La línea LAE11139203 es la única que mostro una variación significativamente diferente con las plantas en riego, lo que sugiere un aumento del cierre estomático similar al testigo sensible. Los demás materiales no mostraron cambios significativos de la temperatura foliar, de forma similar al testigo tolerante, lo que les permitiría continuar fijando CO<sub>2</sub> bajo sequía, reduciendo el impacto negativo en los rendimientos.



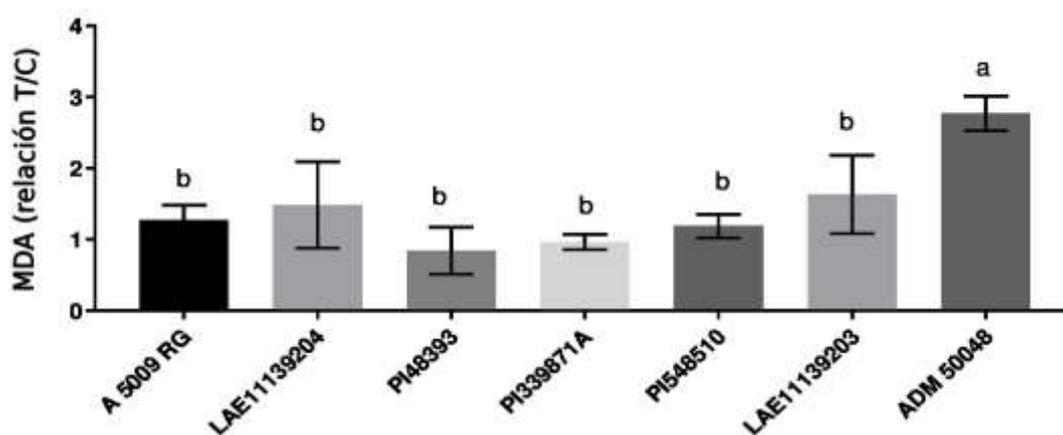
**Fig. 8. Diferencia entre la temperatura foliar y la ambiental en genotipos de soja en sequía y riego, a los 7 días de iniciada la sequía.** Se muestran los promedios  $\pm$  SD de cada genotipo en 3 experimentos independientes con  $n = 10$  para cada tratamiento. Letras compartidas indican diferencias no significativas (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

### 3.8. Rasgos bioquímicos: FRAP, MDA

Se midieron dos parámetros bioquímicos relacionados a la capacidad antioxidante de los genotipos. El primer parámetro, llamado “FRAP”, es un indicador de la capacidad

antioxidante total no enzimática (medido como la capacidad de reducir hierro de los extractos foliares) que está relacionada con la capacidad de detoxificar procesos oxidativos perjudiciales para el tejido expuesto al estrés. Mayores valores de FRAP indican una mayor defensa antioxidante contra el estrés (un tejido “más tolerante”).

El segundo parámetro, es el MDA (malondialdehído), que es un lípido peroxidado indicador de los daños oxidativos en la membrana plasmática generados por la exposición al estrés. Valores más bajos de MDA indican una mayor tolerancia al estrés.



**Fig. 9. Peroxidación lipídica (MDA) en genotipos de soja a los 7 días de iniciada la sequía.** Los valores son la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes con  $n=10$  para cada tratamiento. Letras compartidas indican diferencias no significativas (ANOVA,  $p<0,01$ ). MDA, malondialdehído.

El FRAP no mostro diferencias significativas a los 7 días de tratamiento, pero a los 14 días, los genotipos PI548510 y PI339871A mostraron cambios interesantes. La línea PI548510 mostró una disminución del 50% y PI339871A un incremento de casi el 30%, en sequía respecto a riego (datos no mostrados).

El testigo sensible mostró un aumento de casi 3 veces más MDA en plantas bajo sequía, mientras los genotipos en estudio LAE11139204, PI48393, PI339871A, PI548510 y LAE11139203 exhibieron un contenido de MDA similar al testigo tolerante, siendo significativamente diferentes al testigo sensible (Fig. 9).

### 3.9. Eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Fv/Fm)

El rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) refleja el máximo potencial de

capacidad fotosintética de las hojas en plantas después de un tiempo suficiente de adaptación a la oscuridad (Sharma *et al.*, 2015). Los valores de  $F_v/F_m$ , en condiciones ambientales normales, son relativamente constantes, generalmente entre 0,8 y 0,85; pero cuando las plantas están estresadas, este parámetro disminuye, dependiendo del cultivar y del estado de crecimiento (Xu, 2002). En el presente trabajo, los genotipos analizados no presentaron cambios significativos en las plantas bajo estrés por sequía en comparación con sus controles, tanto a los 7 como a los 14 días de tratamiento. Es decir, los materiales no mostraron daños en el fotosistema II bajo sequía (datos no mostrados).

#### 4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se detectó variabilidad entre los diferentes genotipos de soja del Banco de germoplasma de INTA y se clasificaron los distintos genotipos de soja de acuerdo con los parámetros analizados. Además, se observó la activación de diversos mecanismos que parecen contribuir a la tolerancia al estrés por déficit hídrico.

La respuesta de tolerancia de las plantas a la sequía consiste en la activación de una serie de mecanismos bioquímicos, morfológicos y fisiológicos. Debido a que las activaciones de unos y otros mecanismos dependen del genotipo, en una primera instancia se utilizaron tres criterios de selección diferentes. Dentro de los rasgos fisiológicos, el contenido relativo de agua (CRA) caracteriza el estado hídrico de las plantas. La prolina participa en la regulación del equilibrio osmótico y en el mantenimiento de la turgencia celular, que son rasgos fisiológicos fundamentales para reducir los efectos negativos del estrés por sequía (Aranjuelo *et al.* 2011). Por último, las clorofilas son el componente principal del proceso de fotosíntesis y usualmente son dañadas por procesos oxidativos desencadenados por situaciones de estrés ambiental, por lo cual la medición del contenido de clorofilas resulta en un indicador útil para detectar tolerancia (Monteoliva *et al.*, 2022).

Se clasificaron 24 genotipos de soja utilizando esos tres parámetros para comparar el comportamiento de cada genotipo en sequía y riego. Los parámetros utilizados mostraron variabilidad y permitieron clasificar los materiales según su tolerancia. Para ello, se generó un índice de tolerancia al estrés (ITE) para los tres parámetros (CRA, clorofilas y prolina).

Los resultados mostraron que todos los genotipos de soja disminuyeron su CRA en el tratamiento bajo sequía comparado con las plantas bajo riego, en mayor o menor medida. Además, la mayoría de las líneas en estudio que presentaron una menor disminución del contenido de CRA (menor efecto del estrés) también mostraron altos contenidos de prolina y/o clorofilas (Fig. 2-4).

En cuanto al contenido de prolina, de los 24 genotipos analizados, se identificaron 6 que presentaron la mayor proporción de cambio entre plantas en sequía y bajo riego (Fig. 3). Teniendo en cuenta los estudios que muestran que la prolina se acumula en tejidos de soja bajo sequía (Hossain *et al.*, 2014; Tripathi *et al.*, 2016; Buezo *et al.*, 2019), y su acumulación está asociada con la capacidad de la planta para tolerar tal estrés (Akitha Devi *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2020), se propone que dichos genotipos son más resistentes al estrés por sequía. El resto de los genotipos no presentaron cambios significativos o redujeron el contenido de prolina.

Considerando el contenido de clorofilas a, se distinguieron 6 genotipos que presentaron la mayor proporción de cambio causada por la sequía (Fig. 4). Estos genotipos respondieron de forma similar al genotipo testigo tolerante. Jaleel *et al.*, 2009, propone que bajo restricción de agua, usualmente se reduce la concentración de clorofilas, sin embargo, aquí se observó que la mayoría de los genotipos bajo sequía no redujeron la concentración de clorofilas a, lo que sugiere que estas plantas podrían tener un mecanismo de defensa contra la degradación de las mismas y ser tolerantes al estrés por sequía.

Luego, en base a estas tres variables analizadas y a una combinación de criterios se seleccionaron 5 genotipos que se consideraron como los mejores candidatos a tolerar el estrés por sequía. Se los analizó en base a sus respuestas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas asociadas a la tolerancia (superficie foliar, biomasa, verdor, temperatura foliar, FRAP, MDA, Fv/Fm).

La superficie foliar se redujo en todos los genotipos expuestos a sequía según lo esperado. Plantas expuestas a sequia tienden a reducir el crecimiento, lo cual impacta en la superficie foliar. En este caso, sólo los genotipos LAE11139204 y PI339871A presentaron diferencias significativas con respecto al control sensible, tanto a los 7 (Fig. 5) como a los 14 días de tratamiento, similar a lo reportado por Morandi *et al.*, 1981 para otros genotipos de soja analizados en sequía.

En sequía, un mayor enraizamiento y una mayor relación raíz-tallo (producto de la estimulación del crecimiento de las raíces y la inhibición del crecimiento de la biomasa aérea), permite alcanzar suelos más profundos (Bloom *et al.*, 1985). En concordancia con esto, en los resultados obtenidos, los genotipos se comportaron de acuerdo con lo esperado (Fig. 6) excepto el genotipo PI548510, que no mostró incremento de la biomasa aérea, similar a las respuestas del testigo sensible (Fig. 6A y 6C). Por su parte, el genotipo LAE1113204 también mostró cierta particularidad, ya que la biomasa radical fresca fue significativamente diferente al resto de los genotipos (Fig. 6B), pero la biomasa seca mostró la misma proporción de cambio que el testigo tolerante (Fig. 6D). Esto indica que la partición de C hacia la raíz es proporcionalmente similar al resto de los materiales tolerantes, pero el contenido hídrico de estas es menor, lo cual estaría evidenciando algún tipo de alteración en el estado hídrico radical que deberá ser estudiada con mayor detalle para entender las implicancias en la tolerancia a la sequía.

En cuanto a los dos parámetros bioquímicos (FRAP y MDA) aplicados a los tratamientos, el FRAP no mostró diferencias significativas. Sin embargo, en el contenido de MDA todos los genotipos estudiados presentaron diferencias significativas respecto al testigo sensible, encontrando en éste hasta 3 veces más concentración de MDA (Fig. 9). Los contenidos de MDA más altos están asociados con un menor nivel de protección de membrana y una menor tolerancia a la sequía (Mohammadkhani *et al.*, 2007). El estrés por sequía provoca una modificación en la matriz lipídica de la membrana plasmática y cambios en la organización física (Mirzaee *et al.* 2013). Es por esto que los resultados obtenidos indican que las líneas estudiadas, a nivel de membrana, tendrían mecanismos internos que le permitirían una mayor protección para ser tolerantes al estrés por sequía.

Para concluir y en base a todo lo que se analizó en este trabajo, se propone como los genotipos potencialmente más tolerantes a la sequía a PI548510, LAE1113204 y PI339871A. En particular, el genotipo PI548510 se comportó de acuerdo con lo esperado en los parámetros fisiológicos y bioquímicos analizados: menor disminución de CRA, mayor incremento de prolina, y mayor incremento de clorofilas a (Fig. 2-4). Sin embargo, en los parámetros morfológicos se comportó como una planta sensible ante el estrés ya que redujo su biomasa aérea ante el estrés hídrico (Fig. 6A y C), lo cual sugiere que su mecanismo de tolerancia está asociada a la acumulación de osmolitos protectores, pero no serían suficientes para proteger al genotipo de la inhibición del crecimiento aéreo inducida por la sequía.

El genotipo LAE1113204 presentó alto CRA, niveles de clorofilas intermedios y muy bajo contenido de prolina, indicando la activación de otro tipo de respuestas metabólicas que están contribuyendo al mantenimiento del contenido hídrico de las hojas. A su vez, es la línea que mostró mayor tolerancia a la sequía en su contenido hídrico, es decir, que se trata potencialmente de un genotipo altamente tolerante, que sería capaz de mantener su equilibrio hídrico interno en condiciones muy adversas. Esto no se debe a un gran cierre estomático ya que su temperatura foliar no se incrementa en sequía, es decir, que este genotipo es capaz de continuar transpirando (Fig. 8), sin reducir su área foliar individual (Fig. 5), acumulando biomasa (Fig. 6A, C), pero el mecanismo que está contribuyendo a retener el agua en el interior de los tejidos no sería la acumulación de prolina sino, posiblemente, algún otro compuesto osmóticamente activo.

La línea PI339871A, seleccionada también como una posible tolerante, mostró aumento en el contenido de prolina (Fig. 3), clorofilas y verdor (Fig. 4, 7), con la menor reducción de superficie foliar, y uno de los valores más bajos de daño oxidativo de membranas (MDA, aunque no estadísticamente significativo) (Fig. 9). Posiblemente, este genotipo debe su mayor tolerancia a una combinación de mecanismos que incluyen la acumulación de compuestos osmóticamente activos, como prolina, así como la protección antioxidante, evidente en el bajo daño oxidativo y el alto contenido de clorofilas en sequía. Además, también mostró un incremento de la biomasa radical seca en sequía (Fig. 6D), lo cual podría darle una ventaja adicional a campo.

## **5. CONCLUSIÓN**

El análisis de los parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos permitió clasificar los genotipos de soja provistos por el banco de germoplasma de EEA INTA Marcos Juárez y EEA Paraná según su tolerancia al estrés por sequía en condiciones semi-controladas. Según los parámetros analizados los genotipos PI548510, LAE11139204 y PI339871A se proponen como genotipos más tolerantes al estrés por sequía, mientras los genotipos Champaquí5.7, Alim 3,44 y Himeshirazu fueron clasificados como los más sensibles.

Estos resultados proporcionan una base para futuras investigaciones sobre genotipos de soja bajo déficits de agua y pueden aportar información valiosa para los futuros programas de mejoramiento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Akitha Devi, M. K., & Giridhar, P. 2015. Variations in physiological response, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities, proline and isoflavones content in soybean varieties subjected to drought stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85(1), 35-44.
- Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Avice, J. C., & Nogués, S. 2011. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 111-123.
- Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African journal of agricultural research*, 6(9), 2026-2032.
- Avramova, V., Abdelgawad, H., Zhang, Z., Fotschki, B., Casadevall, R., Vergauwen, L., & Beemster, G. T. 2015. Drought induces distinct growth response, protection, and recovery mechanisms in the maize leaf growth zone. *Plant physiology*, 169(2), 1382-1396.
- Bai, T., Li, C., Ma, F., Feng, F., & Shu, H. 2010. Responses of growth and antioxidant system to root-zone hypoxia stress in two *Malus* species. *Plant and Soil*, 327(1), 95-105.
- Barrs, H. D. & Weatherley, P. E. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian journal of biological sciences*, 15(3), 413-428.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.
- Berglund, D. R., McKay, K., & Knodel, J. J. 2002. Canola production.
- Benzie IFF & Strain JJ. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”. The FRAP Assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Blum, A. 2011. Drought resistance—is it really a complex trait?. *Functional Plant Biology*, 38(10), 753-757.
- Bruce, W. B., Edmeades, G. O., & Barker, T. C. 2002. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal of experimental botany*, 53(366), 13-25.
- Buezo, J., Sanz-Saez Á., Moran, J. F., Soba, D., Aranjuelo, I., & Esteban, R. 2019. Drought tolerance response of high-yielding soybean varieties to mild drought: physiological and photochemical adjustments. *Physiologia plantarum*, 166(1), 88-104.
- Cakir, R. 2004. Effect of water stress at different development stages on vegetative and reproductive growth of corn. *Field Crops Research*, 89(1), 1-16.
- Carrera, C., Martínez, M. J., Dardanelli, J., & Balzarini, M. 2009. Water deficit effect on the relationship between temperatures during the seed fill period and soybean seed oil and protein concentrations. *Crop Science*, 49(3), 990-998.
- Coronel, A. 2013. Drought: concept and monitoring indices. Proposal for a new index. *Agromensajes Magazine*, 37(1), 1-3.

- Cushman, J. C., & Bohnert, H. J. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current opinion in plant biology*, 3(2), 117-124.
- Cushman, J. C. 2001. Osmoregulation in plants: implications for agriculture. *American zoologist*, 41(4), 758-769
- Del Río, L. A., & López-Huertas, E. 2016. ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant and Cell Physiology*, 57(7), 1364-1376.
- Du Y., Zhao Q., Chen L., Yao X., & Xie F. 2020. Effect of drought stress at reproductive stages on growth and nitrogen metabolism in soybean. *Agronomy*, 10(2), 302.
- Eid, A. R., Bakry, B. A., & Taha, M. H. 2013. Effect of pulse drip irrigation and mulching systems on yield, quality traits and irrigation water use efficiency of soybean under sandy soil conditions. *Agricultural Sciences*, 4, 249-261.
- Esteban, R., Barrutia, O., Artetxe, U., Fernández-Marín, B., Hernández, A., & García-Plazaola, J. I. 2015. Internal and external factors affecting photosynthetic pigment composition in plants: a meta-analytical approach. *New Phytologist*, 206(1), 268-280.
- FAOSTAT 2016 Document. Available at [www.fao.org/land-water7databases-and-software/cropinformation/soybean/en/](http://www.fao.org/land-water7databases-and-software/cropinformation/soybean/en/)
- Fan, H. F., Ding, L., Xu, Y. L., & Du, C. X. 2017. Antioxidant system and photosynthetic characteristics responses to short-term PEG-induced drought stress in cucumber seedling leaves. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(2), 162-173.
- Fehr, W., & Caviness, C. 1977. Stages of soybean development. Iowa State University, Ames, 80(11).
- Fang, Y., & Xiong, L. 2015. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and molecular life sciences*, 72(4), 673-689.
- Fernandez, G. C. 1992. Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In *Proceeding of the International Symposium on Adaptation of Vegetables and other Food Crops in Temperature and Water Stress*. Pp. 257-270. Shanhuah, Taiwan.
- Forlani, G., Bertazzini, M., & Cagnano, G. 2019. Stress-driven increase in proline levels, and not proline levels themselves, correlates with the ability to withstand excess salt in a group of 17 Italian rice genotypes. *Plant Biology*, 21(2), 336-342.
- Garcés-Fiallos, F. R., Ampuño-Muñoz, S. A., & Vásquez-Montúfar, G. H. 2014. Agronomía, producción y calidad de grano de variedades de soya durante dos épocas de cultivo. *Biosci. j.(Online)*, 717-719.
- Greer, D. H. 1998. Photoinhibition of photosynthesis in dwarf bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves: effect of sink-limitations induced by changes in daily photon receipt. *Planta*, 205(2), 189-196.
- Guzzo, M. C., C. Costamagna, M. S. Salloum, J. L. Rotundo, M. I. Monteoliva, & C. M. Luna. 2021. Morpho-physiological traits associated with drought responses in soybean. *Crop Science*. 61: 672–688.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. 2006. Free radicals in biology and medicine, Edition 4th. Clarendon Press, Oxford.
- Havaux, M. 1998. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in plant*

- science*, 3(4), 147-151.
- Hare, P.D., & Cress W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21(2): 79–102
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604-611.
- 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. *The Crop Journal*, 2(6), 366-380.  
<https://www.nasa.gov>  
<https://www.sinavimo.gob.ar/cultivo/glycine-max>
- Jahan, M. S., Nozulaidi, M., Khandaker, M. M., Afifah, A., & Husna, N. 2014. Control of plant growth and water loss by a lack of light-harvesting complexes in photosystem II in *Arabidopsis thaliana* chl-1 mutant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(7), 1627-1635.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol*, 11(1), 100-105
- Kantolic, A.; Giménez, P.; de la Fuente, E. & Giménez, P. 2006. Ontogenic cycle, dynamics of development and generation of soybean yield and quality. *Grain Production. Functional bases for its management*. Buenos Aires. pp: 165-201.
- Khairi, M., Nozulaidi, M., & Jahan, M. S. 2015. Effects of different water levels on physiology and yield of salinity rice variety. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(2), 339-345.
- Liang, Y., Zhang, K., Zhao, L., Liu, B., Meng, Q., Tian, J., & Zhao, S. 2010. Identification of chromosome regions conferring dry matter accumulation and photosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 171(1), 145-156.
- Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350-382
- Liu, Y., Ding, J., Chander, S., Liao, D., Zhao, J., & Li, J. 2009. Identification of maize drought-tolerance at seedling stage based on leaf temperature using infrared thermography. *Scientia Agricultura Sinica*, 42(6), 2192-2201.
- Mahouachi, J., Gómez-Cadenas, A., Primo-Millo, E., & Talon, M. 2005. Antagonistic changes between abscisic acid and gibberellins in citrus fruits subjected to a series of different water conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24(3), 179-187.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mirzaee M, Moieni A & Ghanati F. 2013. Effects of drought stress on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola cultivars (*Brassica napus* L.). *J Agron SciTech*. 15: 593–602.
- Mohammadkhani, N., & Heidari, R. 2007. Effects of drought stress on protective enzyme activities and lipid peroxidation in two maize cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 10(21), 3835-3840.

- Monteoliva, M., Guzzo M. C., & Posada G. A. 2021. Breeding for Drought Tolerance by Monitoring Chlorophyll Content. *Gene Technology*. 10: 1–10.
- Monteoliva, M. I., Bustos D., & Luna C. M. 2019. Physiological Approaches for the Study of Abiotic Stress in Plants: Dissertations and Protocols. INTA Editions, Buenos Aires, Argentina, pp. 87.
- Monteoliva, M. I., Soave S., Soave J. H., Buteler M., Luna C. M., & Guzzo M. C. 2018. Tolerance to drought in peanut cultivars from Criadero El Carmen: vegetative and reproductive states. Gral. Cabrera, Argentina.
- Pimentel D. & Patzek TW. 2008. Ethanol production using corn, grass and wood; biodiesel production from soybeans. Biofuels, solar and wind energy as renewable energy systems: benefits and risks. Springer, Dordrecht, Países Bajos, 375–396.
- Pingali, P. L. 2012. Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), 12302-12308.
- Pirasteh-Anosheh, H., Saed-Moucheshi, A., Pakniyat, H., & Pessarakli, M. 2016. Stomatal responses to drought stress. *Water stress and crop plants: A sustainable approach*, 1(2), 24-40.
- Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Palme, K. J., & Jansen, M. A. 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?. *Trends in plant science*, 12(3), 98-105
- Ramadan EA, Ahmed BB & Hamed TM. 2013. Effect of pulse drip irrigation and mulching systems on yield, quality traits and irrigation water use efficiency of soybean under sandy soil conditions. *Agricultural Sciences*. 4(5): 249-261.
- Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G., & Perrotta, C. 2006. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, cell & environment*, 29(12), 2143-2152.
- Sasaki-Sekimoto, Y., Taki, N., Obayashi, T., Aono, M., Matsumoto, F., Sakurai, N. & Ohta, H. 2005. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 44(4), 653-668.
- Saxena SC & Kaur H, Verma P. 2013. Osmoprotectors: potential for crop improvement under adverse conditions. Tuteja N, Singh GS, Plant acclimatization to environmental stress, Nueva York: Springer, 197-232.
- Sharma, S., O'Reilly, C. M., Gray, D. K., Hampton, S. E., Read, J. S., Rowley, R. J. & Zhang, G. 2015. Rapid and highly variable warming of lake surface waters around the globe. *Geophysical Research Letters*, 42(24), 10-773.
- Signorelli, S., & Monza, J. 2017. Identification of  $\Delta$ 1-pyrroline 5-carboxylate synthase (P5CS) genes involved in the synthesis of proline in *Lotus japonicus*. *Plant signaling & behavior*, 12(11), e1367464.
- Silvente, S., Sobolev, A. P., & Lara, M. 2012. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. *PLoS One*, 7(6).
- Taiz, L., & Zeiger, E. 2006. Plant Physiology Sinauer Associates. Inc., Sunderland, MA.
- Taiz L., & Zeiger E. 2008. "Stress physiology". *Plant physiology*. California, Sinauer Associates Inc. Pp.1129-1189.
- Tripathi, P., Rabara, R. C., Reese, R. N., Miller, M. A., Rohila, J. S., Subramanian, S.

- & Rushton, P. J. 2016. A toolbox of genes, proteins, metabolites and promoters for improving drought tolerance in soybean includes the metabolite coumestrol and stomatal development genes. *BMC genomics*, 17(1), 1-22.
- Wang, F. Z., Wang, Q. B., Kwon, S. Y., Kwak, S. S., & Su, W. A. 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of plant physiology*, 162(4), 465-472.
- World Meteorological Organization (WMO). 1986. Report on drought and countries affected by drought during 1974–1985. *WMO, Geneva*, 118.
- Xu, Z. & G. Zhou. 2006. Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. *Planta*. 224:1080-1090.