



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS CONTRASTANTES PARA EL AUMENTO DE
LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN SEMILLAS DE SOJA: IMPACTOS A
NIVEL ECOFISIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO**

Ing. Agr. Florencia B. Poeta

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: Dr. José L. Rotundo

CO- DIRECTOR: Dr. Hugo R. Permingeat

AÑO: 2016

EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS CONTRASTANTES PARA EL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN SEMILLAS DE SOJA: IMPACTOS A NIVEL ECOFISIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO

Florencia B. Poeta

Ingeniera Agrónoma - Universidad de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Cátedra de Manejo de Cultivos Extensivos de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), durante el período comprendido entre 6 de diciembre de 2010 y 10 de diciembre 2016 bajo la dirección del Dr. José L. Rotundo.

Ing. Agr. Florencia B. Poeta

Doctorando

José L. Rotundo

Director

Hugo. R. Permingeat

Co - Director

Defendida:de 2017.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Silvia y Victor, por su cariño, apoyo incondicional y, en especial por su paciencia. Gracias por enseñarme los valores que me han llevado a alcanzar una gran meta.

A Pablo, con su amor incondicional ha sido amigo y compañero, fuente de calma y consejos en todo momento.

A mis hermanos, por acompañarme en los momentos más importantes de mi vida, éste logro también es de ustedes.

A José Rotundo, a Lucas Borrás y, a Hugo Permingeat por darme la oportunidad de hacer este trabajo de tesis y, por brindarme su dedicación, capacidad y experiencia científica, fundamentales para la concreción de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del GIMUCE, por el tiempo que dedicaron a ayudarme, las charlas y los mates que hacen más fácil este camino.

A Alicia Busi, porque ha sido una gran profesora y motivadora.

A José Gerde y a Brenda Gambín por su ayuda en distintos momentos de la realización de ésta tesis.

Al personal de la facultad que facilitó nuestro trabajo en el campo y a distintos docentes de la facultad que me ayudaron con consultas específicas de su tema.

A los evaluadores de este trabajo de tesis: Mirtha Cuniberti, Carlos Gosparini y Carlos Cairo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de la Beca Doctoral con la cual se realizó esta tesis.

DEDICATORIA

A mis abuelas, Ida y Mabel.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

Poeta F.B., Ochogavía A.C., Permingeat H.R., Rotundo J.L. 2017. Storage-associated genes and reserves accumulation in soybean cultivars differing in physiological strategies for attaining high seed protein concentration. *Crop Science*. 57: 1-10 (doi: 10.2135/cropsci2016.07.0611)

Poeta F.B., Borrás L., Rotundo J.L. 2016. Variation in seed protein concentration and seed size affects soybean crop growth and development. *Crop Science*. 56: 3196-3208. (doi:10.2135/cropsci2016.01.0025)

Poeta F.B., Borrás L., Rotundo J.L., Westgate M.E. 2014. Seed water concentration and the accumulation of protein and oil during soybean seed development. *Crop Science Ame. Soc.* Volume 54, Issue 6, Pages 2752-2759. (doi: 10.2135/cropsci2014.03.0204)

PRESENTACIONES EN CONGRESOS DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS.

Poeta F.B., Rotundo J.L., Borrás L. 2016. Desarrollo de poblaciones segregantes de alta concentración de proteína a partir de parentales de soja con estrategias fisiológicas contrastantes. XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Corrientes.

Poeta F.B., Borrás L., Rotundo J.L., 2014. Evaluación de estrategias fisiológicas contrastantes para la generación de alta concentración proteica en semillas de soja. XXX Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. Mar del Plata. Buenos Aires.

Poeta F.B., Borrás L., Rotundo J.L. 2012. Evaluación de parámetros fisiológicos en genotipos de soja asociados a estrategias fisiológicas contrastantes para la generación de alta concentración proteica. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata. Buenos Aires.

Poeta F.B., Rotundo J.L., Borrás L. 2011. Identificación de genotipos con estrategias contrastantes para la generación de alta concentración de proteína en semillas de soja” Mercosoja 2011. Rosario. Santa Fe.

PRESENTACIONES ORALES DERIVADAS DE LA TESIS EN REUNIONES CIENTÍFICAS

Poeta F.B. 2014. Evaluación de estrategias contrastantes para el aumento de la concentración de proteína en semillas de soja: impactos a nivel ecofisiológico y bioquímico. 2º Taller avances de las línea de investigación del ámbito público y privado en los cultivos de soja y maíz”. Facultad Cs. Agrarias. UNR.-INTA Oliveros. Santa Fe.

Poeta F.B. 2012. Identificación de genotipos con estrategias contrastantes para la generación de alta concentración de proteína en semillas de soja. En el marco del Plan Estratégico Agroalimentario y Agroindustrial Participativo y Federal (PEA). Facultad de Ciencias Agrarias. UNR. Santa Fe.

EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS CONTRASTANTES PARA EL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN SEMILLAS DE SOJA: IMPACTOS A NIVEL ECOFISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

INDICE

Abreviaturas, símbolos y anglicismos	1
Resumen	2
Abstract	4
Capítulo I: Introducción general	5
Producción de soja en Argentina y el mundo	5
Concentración de proteína y rendimiento	6
Concentración de proteína y funcionamiento del cultivo	6
Concentración de proteína y controles embrionarios	7
Enfoque aplicado en la presente tesis doctoral	7
OBJETIVOS	8
Hipótesis específicas	8
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Capítulo II: Efecto de la variación en la concentración de proteína y en el peso de las semillas sobre el crecimiento y desarrollo en el cultivo de soja.	10
INTRODUCCIÓN	10
Hipótesis específicas	11
Objetivos específicos	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Experimento I	13
Experimento II	14
RESULTADOS	17
Experimento I	17
Experimento II	19
Concentraciones y contenidos de proteína, aceite y residual y tamaño de grano	19

Rendimiento, biomasa, índice de cosecha	20
Crecimiento y Desarrollo de las semillas	22
Características relacionadas al área foliar	23
Asimilados disponibles por semilla durante el llenado	25
Análisis multivariado para las categorías de tamaño de semilla	26
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	31

Capítulo III: Patrones de acumulación y redistribución del nitrógeno en genotipos de soja con diferente concentración proteica y peso de grano.

	32
INTRODUCCIÓN	32
Hipótesis específicas	35
Objetivos específicos	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
Experimento de campo	36
Material vegetal utilizado	36
Variables medidas	36
Análisis estadístico	38
RESULTADOS	39
Reservorio de N foliar para el llenado de los granos	39
Patrones de partición del N durante el llenado de los granos	44
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	49

Capítulo IV: Genes asociados al almacenamiento y acumulación de reservas en cultivares de soja que difieren en la estrategia fisiológica para lograr alta concentración proteica en las semillas.

	50
INTRODUCCIÓN	50
Hipótesis específicas	
Objetivos específicos	53
MATERIALES Y MÉTODOS	54
Material vegetal	54
Experimento de campo	54
Recolección de tejidos	54
Determinación de caracteres relacionados al desarrollo de la semilla y a la acumulación de reservas	55
Análisis de qPCR en tiempo real (RT-PCR)	56

Diseño experimental y análisis estadístico	58
RESULTADOS	59
Crecimiento de la semilla y normalización del desarrollo	59
Características del desarrollo relacionadas a la acumulación cada constituyente de la semilla	60
Niveles transcripcionales de los genes evaluados	62
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES	67
Capítulo V: Desarrollo de poblaciones segregantes de alta concentración de proteína a partir de parentales de soja con estrategias fisiológicas contrastantes	68
INTRODUCCIÓN	68
Hipótesis específicas	
Objetivos específicos	70
MATERIALES Y MÉTODOS	71
Material vegetal	71
Experimento de campo	72
Variables medidas	72
Análisis estadístico	72
RESULTADOS	74
DISCUSIÓN	78
CONCLUSIONES	80
Capítulo VI: Discusión general	81
CONTRASTE DE HIPÓTESIS PLANTEADAS	85
CONCLUSIONES FINALES	88
Referencias	89
Apéndices	99
Apéndice I	99
Apéndice II	100
Apéndice III	106
Apéndice IV	108
Apéndice V	110
Apéndice VI	117

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS

AP: alta concentración de proteína

AP-Semilla grande: genotipos con alta concentración de proteína debido a un aumento más que proporcional en el contenido de proteína en grano (mg semilla^{-1}) en relación al incremento del contenido de aceite y carbohidratos.

AP-Semilla pequeña: genotipos con alta concentración de proteína debido a una reducción más que proporcional en el contenido de aceite y carbohidratos (mg semilla^{-1}) en relación a la reducción en el contenido de proteína.

BioTotR7: biomasa total a madurez.

CC: cultivares comerciales, con proteína estándar y alto rendimiento.

CoefSen_{IAF}: coeficiente de senescencia del área foliar

CoefSenN: coeficiente de senescencia en términos de pérdida del contenido de N foliar

CoefSen_{NFE}: coeficiente de senescencia en términos de pérdida de NFE.

d: día.

DAF: duración del área foliar

DLLG: duración de la fase lineal del llenado de granos.

DMS: Diferencia mínima estadísticamente significativa

H²: heredabilidad en sentido amplio

h²: heredabilidad en sentido estricto

ha: hectárea

IAF R5: índice de área foliar al comienzo de llenado de grano.

IAF: Índice de área foliar.

IC: índice de cosecha

ICN: índice de cosecha de N

LLG: llenado de granos

MSE: materia seca específica

N foliar: contenido de N foliar

N: nitrógeno

NFE: nitrógeno foliar específico

°C: grados centígrados.

QTL: "Quantitative trait loci". Loci de caracteres cuantitativos.

TCS: tasa de crecimiento de la semilla.

%N foliar: concentración de nitrógeno foliar.

Δ N hojas: variación del contenido de N foliar

EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS CONTRASTANTES PARA EL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN SEMILLAS DE SOJA: IMPACTOS A NIVEL ECOFISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS.

Resumen

La concentración de proteína y aceite en la semilla de soja es el principal determinante de su valor como cultivo. En Argentina, los cultivares más difundidos han sido seleccionados por alto rinde y poseen baja proteína. Existe, por lo tanto, interés en desarrollar cultivares de alto rendimiento y alta concentración de proteína (AP). Sin embargo, la obtención de cultivares con dichos caracteres es dificultosa debido a la correlación negativa frecuentemente observada entre rinde y proteína.

La **hipótesis** de trabajo de la tesis es que existen genotipos de soja que expresan estrategias fisiológicas contrastantes que permiten lograr una alta concentración de proteína, asociadas al tamaño de la semilla de soja: (a) Genotipos AP semilla grande: alta concentración de proteína debido a un aumento más que proporcional en el contenido de proteína en grano (mg semilla^{-1}) en relación al incremento del contenido de aceite y carbohidratos, (b) Genotipos AP semilla pequeña: alta concentración de proteína debido a una reducción más que proporcional en el contenido de aceite y carbohidratos (mg semilla^{-1}) en relación a la reducción en el contenido de proteína. La mayoría de los estudios fisiológicos o de mejoramiento genético ignoran la posible existencia de éstas estrategias alternativas para lograr cultivares con alta concentración de proteína.

El **objetivo general** de la tesis es evaluar la existencia de estrategias contrastantes para la generación de alta concentración de proteína y evaluar su impacto en el funcionamiento del cultivo y su uso potencial como parental en esquemas de mejora genética. Los **objetivos particulares** fueron cuatro: **(i)** describir la existencia de estrategias fisiológicas alternativas asociadas a alta concentración de proteína; **(ii)** analizar las consecuencias ecofisiológicas a nivel de cultivo de variaciones en la estrategia para generar alta concentración de proteína; **(iii)** caracterizar la acumulación de reservas de la semilla y la expresión de genes asociados a la composición del grano de soja en genotipos que expresan estrategias contrastantes; y **(iv)** evaluar la utilidad de incorporar dichas estrategias en esquemas de cruzamientos para mejorar rinde y proteína.

En relación al **Objetivo (i)** se caracterizaron 97 cultivares en condiciones de campo y se encontraron líneas con alta concentración de proteína ($\sim 450 \text{ g kg}^{-1}$) que expresaban las estrategias alternativas arriba descriptas. A partir de este experimento, se seleccionaron tres

genotipos con la estrategia AP-Semilla grande, tres AP-Semilla pequeña. Se incluyeron también tres cultivares comerciales de ciclo similar con tamaño de grano y concentración de proteína estándar (CC).

El Objetivo (ii) se llevó a cabo utilizando estos 9 genotipos. Asociado a este objetivo, los CC mostraron una mayor duración del área foliar ($\sim 137.6 \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$), mayor índice de cosecha ($\sim 0.445 \text{ kg kg}^{-1}$), mayor rendimiento en nitrógeno ($\sim 25.7 \text{ g m}^{-2}$) pero la menor redistribución aparente de nitrógeno cuando se compararon con los genotipos AP. Los genotipos AP-Semilla grande se asociaron con una mayor cantidad de asimilados por semilla ($\sim 23.8 \text{ cm}^2 \text{ semilla}^{-1}$). Los genotipos AP-Semillas pequeña mostraron una mayor área foliar al comienzo de llenado de granos ($4.33 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$), muy bajos niveles de asimilados por semillas y el mayor valor de removilización aparente de N ($\sim 40 \%$).

En relación al Objetivo (iii) la comparación se hizo entre un CC y dos cultivares alta proteína, un AP-Semilla grande y un AP-Semilla pequeña. El genotipo AP-Semilla grande tuvo la tasa más rápida y el período más largo de crecimiento de semilla y acumulación de reservas, en comparación a la estrategia AP alternativa. Los niveles de expresión de algunos de los genes involucrados en la síntesis de proteína y lípidos fueron los menores en el genotipo AP-Semilla pequeña en comparación con los otros dos. No se observaron diferencias de expresión entre el CC y el AP-semilla grande, lo que sugeriría un control por medio de los asimilados disponibles durante el llenado sobre la determinación de alta concentración de proteína mediante esta estrategia.

El Objetivo (iv) buscó testear si la correlación negativa entre rendimiento y proteína (%) de una población derivada del cruzamiento entre un CC y un donante AP, depende de la estrategia que posee este último. Para testear esto se construyeron 6 poblaciones a partir de tres parentales CC, tres AP-Semilla grande y tres AP-Semilla pequeña. Las poblaciones que incluyeron parentales AP-Semilla pequeña resultaron con nula correlación negativa entre rendimiento y proteína. Mientras que dos de las tres poblaciones que incluyeron parentales AP-Semilla grande presentaron correlaciones negativas significativas.

Los resultados de esta tesis muestran que los impactos a nivel fisiológico y bioquímico de la selección para alta concentración de proteínas dependen de la estrategia fisiológica asociada a AP. Este trabajo provee de nuevos conocimientos acerca de los controles que rigen sobre la composición de los granos de soja. La identificación de las estrategias propuestas, su impacto en el funcionamiento del cultivo, y su uso potencial en programas de mejoramiento son aportes novedosos a un área de estudio importante (la interrelación entre el metabolismo del N y el rendimiento) que incorpora un aspecto ignorado en la bibliografía hasta la actualidad.

ASSESSMENT OF CONTRASTING STRATEGIES FOR INCREASING PROTEIN CONCENTRATION IN SOYBEAN SEEDS: IMPACTS AT ECO-PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL LEVEL.

ABSTRACT

Developing high protein (HP) cultivars is often precluded by the inverse relationship between protein and yield. We hypothesized that attaining HP concentration based on contrasting seed size impacts crop growth, development and gene expression differently. First, we screened 97 soybean genotypes and found lines with HP concentration ($\sim 450 \text{ g kg}^{-1}$) associated with (i) increased protein content (mg seed^{-1}) in large seed genotypes, and (ii) reduced oil and carbohydrate contents in small seed ones. Second, we evaluated different growth traits in a subset of three HP large and three HP small seed genotypes, as well as in three high-yielding (HY) genotypes with average seed size and protein concentration. We found that HY genotypes had higher leaf area duration, harvest index and nitrogen harvest index, when compared with HP genotypes, regardless of seed size. HP large seed was associated mainly with more assimilate availability per seed during seed filling, while HP small seed showed more canopy biomass production, higher leaf area and nitrogen content per unit area at the beginning of seed fill, more apparent nitrogen redistribution and very low levels of assimilate per seed. Third, we compared a HY genotype with two HP genotypes (large seed size and small seed size) for studying seed development and gene expression. Results showed that the HP large seed genotype exhibited the fastest rate and longest period of seed growth and reserves accumulation compared with the HP small genotype. Expression levels of some of the genes involved in protein and oil synthesis were lower in the HP small seed genotype compared with the other genotypes. No difference in gene expression was observed between the HY and the HP large seed genotypes, suggesting a role for assimilate supply controlling HP concentration based on this strategy. Based on these results, we finally tested if parental selection for HP donors should take into account the contrasting influence of seed size on crop function. To test this hypothesis, we developed breeding populations using HP cultivars crossed with a HP large (crossbreed A) and small (crossbreed B) seed size donors. Our results suggested that there is a higher chance of obtaining high-protein, high-yielding cultivars in crossbreeds B. This thesis provides a new insight in relation to mechanisms that govern soybean seed composition.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Producción de soja en Argentina y el mundo.

El cultivo de soja [*Glycine max (L.) Merr.*] es uno de los más importantes a nivel mundial. El volumen de su producción constituye el cuarto lugar. Parte de ésta se utiliza directamente y, más del 85 por ciento es procesada para la obtención de harina de soja y aceite. La harina de soja es rica en proteínas, y se utiliza principalmente para alimentación animal. El aceite de soja se utiliza sobre todo para el consumo humano y, además en la producción de biodiesel. El grano de soja y sus derivados, son los productos agrícolas más negociados, representando más del 10 por ciento del valor total del comercio agrícola mundial (<http://ers.usda.gov/>; verificado 6 de octubre de 2016).

Argentina se encuentra entre los productores mundiales más importantes de soja, ubicándose como tercer productor de granos a nivel mundial (<http://faostat3.fao.org>; verificado 1 de septiembre de 2016) y primer exportador de harinas proteicas y aceite. El cultivo de soja es el principal a nivel agroindustrial en la región pampeana, ya sea por superficie bajo cultivo (las estimaciones actuales rondan el 65% de la superficie bajo sistemas de cultivos extensivos con soja de primera) o por la generación de ingresos en el sector agropecuario. Debido a que la concentración de proteína en los granos de soja es importante desde el punto de vista económico, incrementar su cantidad es un objetivo perseguido en la mayoría de los planes de mejoramiento (Wilson, 2004).

Particularmente, la industria harinera requiere combinaciones específicas de aceite y proteína para asegurar harinas de soja de alto tenor proteico (Brumm y Hurburgh, 2006). Una de las problemáticas de dicha industria a nivel nacional se centra en que el aumento en los rindes de soja se acompaña de desbalances a nivel nutricional por disminución en el contenido de proteína de la semilla, afectando consecuentemente el porcentaje proteico de las harinas. Esto puede deberse tanto a factores ambientales como genéticos. Debido a que las variedades más difundidas en Argentina se han seleccionado para altos rendimientos y poseen alto contenido de aceite y bajo de proteína (Cuniberti y Herrero, 2006), existe interés económico en aumentar la concentración de proteína manteniendo, o incluso aumentando, la concentración de aceite y el rendimiento.

Concentración de proteína y rendimiento

La selección por alta concentración proteica en soja es a menudo exitosa (Cober y Voldeng 2000, Orf et al. 2004), pero los incrementos están usualmente asociados con baja concentración de aceite (Cober y Voldeng 2000; Wilson 2004) y bajo rendimiento (Hartwig y Hinson 1972; Brin y Burton 1979; Helms y Orf 1998). Los mecanismos que explican dicha correlación negativa no son aún claros por lo que un mejor entendimiento de las bases genéticas y/o fisiológicas que determinan estos atributos permitirá eliminar dichas correlaciones.

Existen trabajos en los que se evaluó si la correlación entre rinde y concentración de proteína se debían a ligamientos genéticos o a efectos pleiotrópicos (Nichols et al., 2006). Las correlaciones debidas a ligamientos podrían eliminarse o disminuirse vía recombinación. Sin embargo, los resultados han sido inconsistentes. En algunas poblaciones se han logrado correlaciones negativas muy bajas o nulas entre rendimiento y proteína mientras que en otras no fue posible romper dicha correlación (Cober y Voeldeng 2000). Generalmente, la estrategia más seleccionada indirectamente por el mejoramiento para incrementar la concentración de proteína en los granos de soja se basó en aumentos en el contenido de proteína (Rotundo et al., 2009).

Un aspecto ignorado hasta el momento es que una alta concentración de proteínas en las semillas podría ser lograda tanto por esa vía, es decir, a través de aumentos más que proporcionales en el contenido de proteína en grano (mg semilla^{-1}) en relación a los incrementos en los contenidos de aceite y carbohidratos en semillas grandes, o por reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y/o carbohidratos en relación a las reducciones en el contenido de proteína en semillas pequeñas.

Concentración de proteína y funcionamiento del cultivo

Existen fuertes evidencias de que las características químicas del grano afectan el funcionamiento del cultivo (Egli., 1998). Para el cultivo de soja, está establecido que entre el 50 y el 90% del nitrógeno del grano proviene de removilización de nitrógeno foliar previamente fijado (Yamagata et al., 1987; Chapin et al., 1990; Turner et al., 2005). Los altos requerimientos de nitrógeno de la semilla de soja llevaron a Sinclair y de Wit (1975, 1976) a plantear la idea de que este alto requerimiento de nitrógeno determinaba una senescencia acelerada por removilización de nitrógeno foliar. Esta senescencia acelerada reducía el período de llenado de los granos, reduciendo el rendimiento. Este proceso explicaría, al menos en parte, la correlación negativa entre la concentración de proteína y el rendimiento del cultivo de soja. A nivel intra-específico, esta idea fue luego explorada con cultivares

comerciales de soja que diferían en concentración de proteína (Salado-Navarro et al., 1985). En concordancia con la hipótesis de Sinclair y de Wit (1975), estos autores demostraron que los genotipos con mayor concentración de proteína presentaban una senescencia foliar acelerada y un período de llenado más acotado. A pesar de que éstas investigaciones son consistentes con dicha hipótesis, otras no han encontrado relación entre proteína de las semillas y N redistribuible durante el desarrollo de las semillas. Egli y Bruening (2007a), por ejemplo, plantean que altas concentraciones proteicas no reducen la tasa de crecimiento individual de las semillas de soja ni acortan el período de llenado.

Concentración de proteína y controles embrionarios

Numerosos estudios bioquímicos han sido realizados con el fin de dilucidar la base bioquímica que rige al carácter concentración de proteínas en las semillas. Por ejemplo Smith et al. (1989) y Sugimoto et al. (1989) demostraron que una mayor concentración de proteína estaba positivamente correlacionada con una mayor actividad de una enzima clave para la síntesis de proteínas en la semilla (fosfoenolpiruvato carboxilasa). Otras evidencias utilizando plantas transgénicas de arveja sugieren que la sobreexpresión de transportadores de sacarosa y aminoácidos es importante para determinar aumentos en concentración de proteína debidos a mayor contenido de proteína. Por otro lado, estudios sobre la enzima ADP-Glucosa pirofosforilasa, que cataliza la reacción limitante para la síntesis de carbohidratos en semillas (Golombek et al., 2001) reportaron que la inhibición de su expresión provocó aumentos en concentración de proteína debido a menores contenidos de carbohidratos en Vicia (Weber et al., 2000; Rolletschek et al., 2002).

Enfoque aplicado en la presente tesis doctoral

En esta tesis doctoral se estudian los controles que rigen sobre la composición de los granos de soja bajo el marco teórico de que aumentos en la concentración de proteína pueden lograrse a partir de dos estrategias fisiológicas contrastantes: (i) a través de aumentos más que proporcionales en el contenido de proteína en grano (mg semilla^{-1}) en relación a los incrementos en los contenidos de aceite y carbohidratos en semillas grandes, o (ii) a través de reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y/o carbohidratos en relación a las reducciones en el contenido de proteína en semillas pequeñas. La utilización de este marco teórico incorpora un aspecto ignorado hasta la actualidad y aporta nuevos conocimientos acerca de los controles que rigen sobre la composición de los granos de soja.

OBJETIVOS E HIPOTESIS

Hipótesis específicas

1) Existen genotipos de soja que expresan estrategias fisiológicas contrastantes que permiten lograr una alta concentración de proteína, asociadas al tamaño de la semilla de soja: (a) genotipos AP semilla grande: tienen alta concentración de proteína debido a un aumento más que proporcional en el contenido de proteína en grano (mg semilla^{-1}) en relación al incremento del contenido de aceite y carbohidratos, (b) genotipos AP semilla pequeña: presentan alta concentración de proteína debido a una reducción más que proporcional en el contenido de aceite y carbohidratos (mg semilla^{-1}) en relación a la reducción en el contenido de proteína.

2) Los impactos fisiológicos a nivel de cultivo debido a aumentos en la concentración de proteína dependen de la estrategia que expresen los genotipos evaluados.

- La selección por alta concentración de proteínas en la semilla puede impactar de manera diferencial sobre el crecimiento y el desarrollo dependiendo del mecanismo que esté rigiendo al carácter de interés.
- La selección por alta concentración de proteínas en la semilla puede impactar de manera diferencial sobre el metabolismo del N dependiendo del mecanismo que esté rigiendo al carácter de interés.

3) Un mismo nivel de concentración proteica en los granos puede alcanzarse a través de patrones de acumulación de reserva contrastantes. A su vez, una alta concentración de proteína en las semillas mediante la estrategia “AP-Semilla grande” depende de una mayor expresión de genes involucrados en la síntesis proteica, mientras que aumentos mediante la estrategia “AP-Semilla pequeña” dependen de una menor expresión de genes involucrados en la síntesis de aceite y carbohidratos.

4) El grado de correlación negativa entre rendimiento y concentración de proteína de una población segregante derivada de la cruce entre un cultivar estándar de alto rendimiento y un donante de alta concentración de proteína depende de la estrategia que posee el donante de alta proteína.

Objetivo general de la tesis

Evaluar la existencia de estrategias contrastantes para la generación de alta concentración de proteína, evaluar su impacto en el funcionamiento del cultivo, y su potencial uso como parental en esquemas de mejora genética.

Objetivos específicos

1) Describir la existencia de dos estrategias fisiológicas contrastantes para incrementar la concentración de proteína en semillas de soja. (CAPÍTULO II)

Las estrategias son:

“AP-Semilla grande”, consiste en aumentos en la concentración de proteína a través de aumentos más que proporcionales en el contenido de proteína en grano (mg semilla^{-1}) en relación a los incrementos en los contenidos de aceite y carbohidratos en semillas grandes

“AP-Semilla pequeña”, consiste en aumentos en la concentración de proteínas mediante reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y/o carbohidratos en relación a las reducciones en el contenido de proteína en semillas pequeñas.

2) Analizar las consecuencias ecofisiológicas a nivel de cultivo de variaciones en la estrategia para generar alta concentración de proteína

- Evaluación de caracteres relacionados al crecimiento y desarrollo del cultivo (CAPÍTULO II)
- Evaluación de caracteres relacionados a la economía del nitrógeno (CAPÍTULO III)

3) Caracterizar la acumulación de reservas de la semilla y la expresión de genes asociados a la composición del grano de soja en genotipos que expresan estrategias contrastantes. (CAPÍTULO IV)

4) Cuantificar la correlación existente entre rendimiento y porcentaje de proteína en poblaciones de líneas segregantes construidas a partir de padres de alta proteína generada a partir de estrategias distintas. (CAPÍTULO V)

CAPÍTULO II

EFFECTO DE LA VARIACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA Y EN EL PESO DE SEMILLAS SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO EN EL CULTIVO DE SOJA.

Poeta F.B., Borrás L., Rotundo J.L. 2016. Variation in seed protein concentration and seed size affects soybean crop growth and development. Crop Science. 56: 3196-3208. (doi:10.2135/cropsci2016.01.0025)

INTRODUCCIÓN

La industrialización de las semillas de soja [*Glycine max (L.) Merr.*] comprende la extracción de aceite por solvente o presión con la subsecuente producción de harina proteica (Lusas, 2004). Estas harinas de alta proteína son utilizadas para alimentación animal, y solo pueden ser logradas con semillas de soja que contengan concentraciones proteicas superiores a 380 g kg⁻¹ (base seca) (Hurburgh, 1994; Brumm y Hurburgh, 2006). Sin embargo, el mercado internacional está enfrentando déficits proteicos en los granos de soja (Dardanelli et al., 2006; Naeve y Huerd, 2008; Medic et al., 2014; Cuniberti y Herrero, 2013; Rotundo et al., 2016). Esto conlleva a la imposibilidad de producir harinas de alta proteína requeridas para una comercialización rentable. Independientemente del cultivar seleccionado, las condiciones ambientales y las prácticas de manejo son factores que afectan la concentración de proteína en las semillas (Medic et al., 2014; Cuniberti et al., 2011). Por ejemplo, altos rendimientos determinados por fechas de siembra tempranas o por abundante disponibilidad de agua durante el llenado de granos, están usualmente asociados con baja concentración de proteína en grano (Bastidas et al., 2008; Rotundo y Westgate, 2009; Bellaloui et al., 2011). También, las bajas temperaturas en latitudes altas están asociadas a baja proteína (Naeve y Huerd, 2008; Rotundo et al., 2016). Una alternativa posible para compensar los efectos del ambiente y/o del manejo sobre los déficits proteicos es aumentar la concentración proteica de las semillas de cultivares comerciales.

La selección por alta concentración de proteínas es factible, pero la obtención de un cultivar comercial competitivo, con alta concentración de proteínas, es obstaculizado por la correlación negativa existente entre proteína y rendimiento (Brim y Burton, 1979; Carter et al., 1982; Wilcox y Zhang, 1997; Wilcox y Shibles, 2001). Diferentes explicaciones fisiológicas en relación a ésta correlación negativa han sido propuestas. Sinclair y de Wit (1975, 1976) sugirieron que las limitaciones en rendimiento están relacionadas a los altos requerimientos de N de las semillas en genotipos AP, lo que determina una senescencia foliar acelerada debido a la removilización de N, un acortamiento en el período de llenado de

granos, y una partición de asimilados a las semillas más acelerada. Mientras que algunos estudios acuerdan con esta hipótesis auto-destructiva (ej. Salado-Navarro et al., 1985; Leffel et al., 1992) otros proponen que una alta proteína en los granos no afecta el normal crecimiento y desarrollo del cultivo. Por ejemplo, Egli y Bruening (2007b) mostraron que no existen evidencias a favor de que la selección para alta concentración de proteínas afecte la removilización del N, la senescencia foliar, o el período de llenado de granos (PLLG). Por otro lado, rendimientos bajos en cultivares AP se asociaron a incrementos en la cantidad de asimilados por semilla requeridos para llenar semillas de alto peso y con alta concentración proteica durante el PLLG (Rotundo et al., 2009, 2011). Dicho incremento en la disponibilidad de asimilados por semilla es comúnmente consecuencia de reducciones en el número de semillas más que el resultado de incrementos en la cantidad de asimilados durante el PLLG (Rotundo et al., 2009, 2011). Este efecto es responsable de las limitaciones en el rendimiento observadas en semillas grandes con alta proteína.

La concentración de proteína de las semillas (g kg^{-1}) es una relación matemática entre el contenido de proteína (mg semilla^{-1}) y el peso total de la semilla (suma de proteína, aceite y carbohidratos; Ishii et al., 2010). Por lo tanto, AP en las semillas podría ser lograda a través de (i) aumentos más que proporcionales en el contenido de proteína en grano (mg semilla^{-1}) en relación a los incrementos en los contenidos de aceite y carbohidratos en semillas grandes (AP semillas grandes), o por (ii) reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y/o carbohidratos en relación a las reducciones en el contenido de proteína en semillas pequeñas (AP semillas pequeñas). Los estudios relacionados a la determinación de la base genética o fisiológica de éste carácter han ignorado el factor tamaño de grano (ej., Brim y Burton, 1979; Salado-Navarro et al., 1985; Wilcox y Zhang, 1997; Cober y Voldeng, 2000; Egli y Bruening, 2007b), o mostraron una correlación positiva entre tamaño de grano y proteína (Alt et al., 2002; Panthee et al., 2005; Rotundo et al., 2009). La posibilidad de lograr AP a través de semillas pequeñas y su posible impacto sobre el funcionamiento del cultivo han sido ignorados. Es posible que resultados contradictorios en relación al impacto de la concentración de proteína en las semillas sobre el crecimiento y el desarrollo (ej., Salado-Navarro et al., 1985; Egli y Bruening, 2007b) puedan deberse a no considerar el efecto del peso del grano.

Hipótesis específicas

1) 1) Existen genotipos de soja que expresan estrategias fisiológicas contrastantes que permiten lograr una alta concentración de proteína, asociadas al tamaño de la semilla de soja: (a) genotipos AP semilla grande: tienen alta concentración de proteína debido a un

aumento más que proporcional en el contenido de proteína en grano (mg semilla^{-1}) en relación al incremento del contenido de aceite y carbohidratos, (b) genotipos AP semilla pequeña: presentan alta concentración de proteína debido a una reducción más que proporcional en el contenido de aceite y carbohidratos (mg semilla^{-1}) en relación a la reducción en el contenido de proteína.

2) Los impactos fisiológicos a nivel de cultivo debido a aumentos en la concentración de proteína dependen de la estrategia que expresen los genotipos evaluados.

- La selección por alta concentración de proteínas en la semilla puede impactar de manera diferencial sobre el crecimiento y el desarrollo dependiendo del mecanismo que esté rigiendo al carácter de interés.

Objetivos específicos

1) Describir la existencia de dos estrategias fisiológicas contrastantes para incrementar la concentración de proteína en semillas de soja.

Las estrategias son:

“AP-Semilla grande”, consiste en aumentos en la concentración de proteínas a través de aumentos más que proporcionales en el contenido de proteína en grano (mg semilla^{-1}) en relación a los incrementos en los contenidos de aceite y carbohidratos en semillas grandes

“AP-Semilla pequeña”, consiste en aumentos en la concentración de proteínas mediante reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y/o carbohidratos en relación a las reducciones en el contenido de proteína en semillas pequeñas.

2) Analizar las consecuencias ecofisiológicas a nivel de cultivo de variaciones en la estrategia para generar alta concentración de proteína

- Evaluación de caracteres relacionados al crecimiento y desarrollo del cultivo: (i) rendimiento, número de granos, biomasa del canopeo a madurez e índice de cosecha ((IC); (ii) el índice de área foliar durante el llenado de granos (Salado-Navarro et al., 1985; Leffel et al., 1992); (iii) la tasa de crecimiento de la semilla y duración del llenado de granos (Egli y Bruening, 2007b); y (iv) asimilados disponibles durante el llenado de granos (Rotundo et al., 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo dos experimentos en el Campo Experimental Villarino, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, en Zavalla, Argentina. El suelo fue del tipo arcillo-limoso (Argiudol vértico, serie Roldan). La disponibilidad de agua a la siembra, las precipitaciones durante la estación de crecimiento, y la temperatura media están disponibles en el Apéndice I.

Experimento I: Caracterización de estrategias para aumentar la concentración proteica en semillas de soja grandes y pequeñas

Se seleccionaron 97 genotipos provenientes del banco de germoplasma del USDA y de otras fuentes (Apéndice II). El criterio de selección incluyó que la mayoría de cultivares pertenezcan a grupos de madurez entre III y V (mas dos cultivares del grupo de madurez VI), que los rendimientos reportados sean mayores a 1500 kg ha⁻¹, y que la concentración de proteína sea mayor a 410 g kg⁻¹ (base seca). Los 97 genotipos se evaluaron en la campaña 2010-2011 en dos fechas de siembra (6 diciembre y 27 diciembre). Las fechas de siembra fueron utilizadas como réplica ambiental para testear las diferencias genotípicas bajo condiciones ambientales que es sabido afectan severamente el carácter concentración de proteína (Medic et al., 2014). Las parcelas consistieron en 3 surcos, de 1 metro de largo y el espacio entre surcos fue de 0.52 metros. La densidad consistió en 30 plantas m⁻². Se realizaron controles químicos de plagas y enfermedades según recomendaciones, y el control de malezas fue manual en post emergencia.

Se determinó madurez fisiológica (R7, Fehr y Caviness, 1977) en cada parcela, tres veces por semana sobre 20 plantas consecutivas en el surco central. En este estadio, 0.75 metros lineales de los surcos centrales fueron cosechados a mano y trillados con maquina estática. La concentración de proteína fue estimada por medio de NIRS (Espectroscopia de infrarrojo cercano, Infratec 1241, Foss, Denmark) y expresada en base seca. El equipo de NIRS tiene ecuaciones de calibración desarrolladas por la Universidad Nacional de Rosario en cooperación con Foss Argentina. La calibración del NIR contempla genotipos de tegumento verde. El peso seco del grano (PS; mg semilla⁻¹) fue calculado con una muestra de 200 semillas, secadas a 60°C hasta alcanzar peso constante. El contenido de proteína (mg semilla⁻¹) fue calculado multiplicando el PS por el porcentaje de proteína.

El diseño experimental fue un diseño en parcelas divididas con tres bloques. La fecha de siembra fue la parcela principal, y los genotipos las sub-parcelas. La información

fue analizada usando un modelo lineal generalizado (GLM) del programa SAS 9.1 (SAS Institute, 1999). El modelo estadístico incluyó como factores principales al bloque, la fecha de siembra y el genotipo. Se consideraron diferencias significativas a un 0.05 nivel de probabilidad. Las medias individuales fueron comparadas con una prueba de diferencia mínima significativa (DMS).

Experimento II: Alta concentración de proteína en semillas grandes y pequeñas, y su relación con el crecimiento y el desarrollo del cultivo.

Se seleccionaron seis genotipos AP a partir del experimento llevado a cabo durante la campaña 2010/11 – tres cultivares con semillas grandes y tres con semillas pequeñas. Estos genotipos fueron evaluados para rendimiento, componentes de rendimiento, entre otras características del cultivo. Además, se incluyeron tres cultivares comerciales nacionales (Comerciales), NK34, DM3100 y SPS3x1. Éstos tienen alto rendimiento pero un tamaño de grano y concentración de proteína promedio, según lo reportado por el Instituto Nacional de Semillas de Argentina (INASE). Solo tres genotipos por categoría fueron incluidos en este experimento debido a la dificultad de llevar a cabo caracterización fisiológica detallada en un mayor número de genotipos. El experimento se llevó a cabo durante las campañas 2011/12 y 2012/13, y las fechas de siembra fueron 1 de Noviembre y 13 de Noviembre respectivamente. La densidad fue de 34 plantas m². Las parcelas consistieron en 4 surcos de 5.5 metros de largo y 0.52 metros entre surcos. Las semillas se inocularon con *Bradyrhizobium* antes de la siembra. Se realizaron controles químicos de plagas y enfermedades según recomendaciones.

Los estadios fenológicos se determinaron tres veces por semana sobre 20 plantas consecutivas en cada parcela. Los estadios considerados fueron R1 (comienzo de floración), R3 (comienzo de fructificación), R5 (comienzo de llenado de granos), R6 (semilla completamente desarrollada) y R7 (madurez fisiológica) (Fehr y Caviness, 1977). El período de llenado de granos efectivo (PLLG) fue determinado por los días transcurridos entre R5 y R7 (Egli et al., 1981). En el apéndice III se encuentran los detalles de la fenología.

La biomasa aérea se muestreó a mano en los dos surcos centrales en cinco diferentes estadios de crecimiento durante el PLLG: R5, R5 + 10 días, R6, R6 + 10 días, y R7. El área muestreada consistió en 0.52 m². Entre cada área de muestreo se dejó 0.26 m² de bordura para minimizar los efectos de los bordes. Las muestras fueron separadas en tallo más pecíolos, hojas verdes, hojas senescentes y vainas. La relación entre el peso de las semillas y el peso de las vainas se determinó en una sub-muestra de 100 vainas, en todos los estadios menos en R7. Esta relación fue usada para determinar el peso de las semillas por unidad de área en los muestreos previos a R7. En R7, las vainas fueron trilladas con una

máquina estática. Para realizar una correcta determinación de la biomasa aérea total, se recolectaron las hojas y pecíolos caídos con una red de plástico ubicada en las zonas de muestreo desde R5 a R7 (Salvagiotti et al., 2009). La senescencia foliar antes de R5 representa menos del 15% de la biomasa foliar, bajo condiciones de crecimiento normales a campo (Hanway y Weber, 1971; Hanway et al., 1984). Por lo tanto, la colocación de redes a partir de R5 aseguró la captura de la mayoría de las hojas senescentes. Las hojas caídas se recolectaron dos veces por semana, y ésta biomasa fue sumada a la biomasa cosechada. Todas las muestras se secaron a 60°C hasta alcanzar peso constante.

El rendimiento en grano (peso de las semillas por unidad de área en R7) fue expresado en base seca. Los componentes numéricos del rendimiento se determinaron usando la muestra en R7. Se contaron y pesaron 200 semillas para determinar el peso individual de las mismas. El número total de semillas fue calculado como la relación entre el rendimiento y el peso individual de la semilla. El índice de cosecha (IC) se calculó como la relación entre el rendimiento y la biomasa aérea total en R7 (BioTotR7) (Donald y Hamblin, 1976).

Las hojas se separaron para determinar el índice de área foliar (IAF, superficie foliar verde por unidad de superficie de suelo) durante el período de llenado de granos mediante el uso de áreafolímetro LI-3100 (LI-COR, Nebraska, USA). Las muestras se mantuvieron en bolsas herméticamente cerradas y almacenadas en cámara fría (5°C) para evitar marchitamiento hasta el momento de ser procesadas. La senescencia foliar por unidad de superficie se estimó a través de un modelo cuadrático desde R5 a R7 (Poeta et al., 2016):

$$y = a + bx^2 \quad [1]$$

donde y es el IAF, a es la ordenada al origen (IAF R5, índice de área foliar a R5), b es el coeficiente de senescencia foliar (CoefSen_{IAF}), y x son los días después de R5. El CoefSen_{IAF} (b) toma valores negativos. Cuanto más negativo es el valor implica que la tasa de pérdida de área foliar verde es mayor. El término lineal de la función cuadrática (Ecuación 1) fue considerado como cero para una mejor modelización de la tasa de senescencia foliar asumiendo que el IAF en R5 es máximo (días después de R5 = 0). La duración del área foliar (DIAF) se estimó como la integral de la Ecuación 1 desde R5 a R7.

Los asimilados disponibles por semilla durante el PLLG se estimaron siguiendo lo indicado en Rotundo et al., (2009), dividiendo el parámetro a de la ecuación 1 (IAF R5, m² m⁻²) por el número de semillas por unidad de área en R7.

La concentración de proteína y aceite (g kg⁻¹) se estimaron por NIRS en muestras de semillas en R7 y se expresaron en base seca. La calibración del NIRS contempla semillas de tegumento verde. La concentración de residual (carbohidratos y cenizas) se estimó como

la fracción residual de la semilla ($1000 - \text{proteína [g kg}^{-1}] - \text{aceite [g kg}^{-1}]$). Los contenidos de proteína, aceite y residual (mg semilla^{-1}) se calcularon como el producto entre el peso individual de la semilla y la concentración de proteína, aceite y residual, respectivamente.

Para este experimento el diseño experimental consistió en un diseño en bloques completos aleatorizados con cuatro repeticiones. La información fue analizada usando un modelo lineal generalizado (GLM) con el programa SAS 9.1 (SAS Institute, 1999). El modelo incluyó año, bloque anidado en año, tamaño de la semilla (estándar, semilla pequeña, semilla grande), y genotipo anidado dentro de la categoría como factores principales. El factor "genotipo" cuantifica la variación residual después de considerar el efecto del tamaño de la semilla. Se consideraron diferencias significativas a un 0.05 nivel de probabilidad. Las medias individuales fueron comparadas con una prueba de diferencia mínima significativa (DMS). Se llevó a cabo un análisis de componentes principales que incluyó los caracteres fisiológicos que estuvieron significativamente asociados con las estrategias para generar alta concentración de proteínas.

RESULTADOS

Experimento I: Describir la existencia de dos estrategias fisiológicas contrastantes para incrementar la concentración de proteína en semillas de soja.

La concentración (g kg^{-1}) y el contenido (mg semilla^{-1}) de proteína mostraron una variación significativa entre los 97 genotipos evaluados en las dos fechas de siembra (Fig. II.1, Apéndice II). La interacción genotipo x fecha de siembra no fue significativa ($P > 0.05$) para la concentración y el contenido de proteína (datos no mostrados). La concentración de proteína promedio fue 416 g kg^{-1} para la primera fecha de siembra y 430 g kg^{-1} para la segunda fecha de siembra. El contenido de proteína varió desde 20 a $140 \text{ mg semilla}^{-1}$ para la primera fecha y entre 30 y $120 \text{ mg semilla}^{-1}$ para la segunda fecha de siembra (Fig. II.1). El peso de grano varió de 50 a $318 \text{ mg semilla}^{-1}$ en la primera fecha de siembra y de 68 a $282 \text{ mg semilla}^{-1}$ en la segunda fecha de siembra.

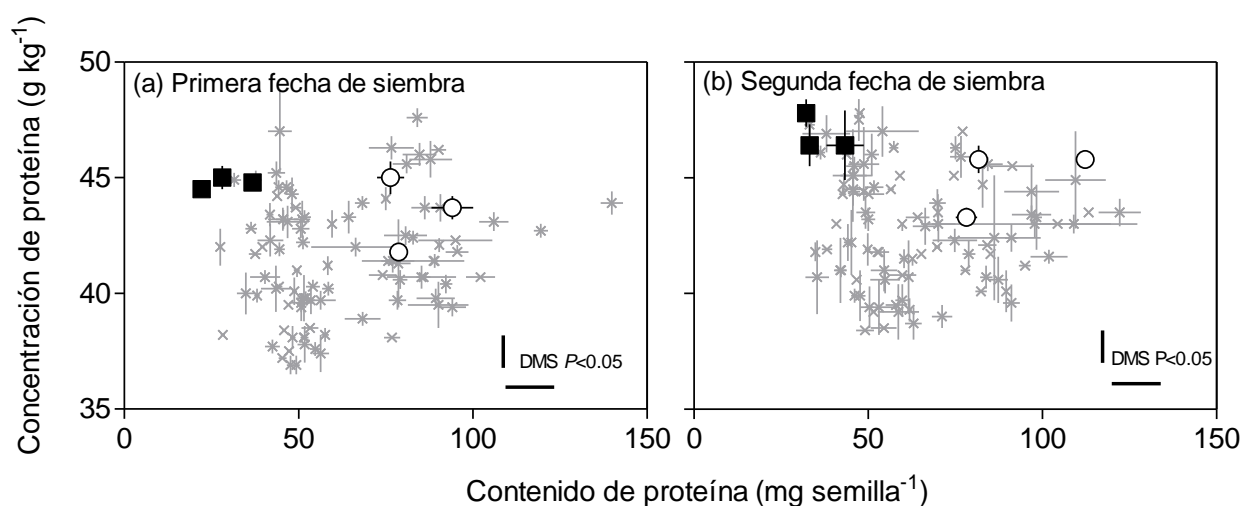


Fig. II.1. Gráfico de dispersión de la variación genotípica en concentración y contenido de proteína para dos fechas de siembra (a) 6 Dic. y (b) 27 Dic.. Los genotipos no seleccionados se indican con (x). Los círculos indican los genotipos seleccionados con alta concentración de proteína (AP) y granos grandes, que tienen alta concentración proteica debido a alto contenido de proteína en las semillas (AP- Semilla grande); los cuadrados indican los genotipos seleccionados con AP y semillas pequeñas, que tienen alta concentración proteica a partir de reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y carbohidrato (AP-Semilla pequeña). Cada punto es un promedio de tres repeticiones \pm EE. Líneas verticales y horizontales muestran LSD ($P < 0.05$).

A partir de esta caracterización inicial, se seleccionaron seis genotipos con alta concentración de proteína (g kg^{-1}) asociada con las estrategias (i) alto contenido de proteína y alto peso de grano (AP-Semilla grande) o (ii) bajo contenido de proteínas, aceite, y residual y semillas pequeñas (AP-Semilla pequeña). La Tabla II.1 describe los 97 genotipos que seleccionamos, y la Fig. II.1 muestra cómo se ubican en relación con la variabilidad total explorada.

Tabla II.1.: Concentración y contenido de proteína, peso de semilla individual, días a madurez fisiológica, y hábito de crecimiento para seis genotipos alta proteína (AP) con peso de grano contrastante seleccionados durante la campaña 2010-2011 a partir de una caracterización de 97 genotipos (Fig. II.1). AP-Semilla grande tienen alta concentración de proteínas debido a alto contenido de proteína (IA3011, PI555396, PI538376); AP-Semilla pequeña tienen alta concentración de proteína basada en reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y carbohidratos (PI518757, PI398970, PI196177). La diferencia mínima significativa (DMS) y el porcentaje de la suma de cuadrados total (%SC) fueron calculados para comparar interacciones significativas. Los valores específicos para cada uno de los 97 genotipos en cada fecha de siembra se incluyeron como información suplementaria en la tabla Apéndice II.

Fuente de variación	Concentración de proteína (g kg^{-1})	Contenido de proteína (mg semilla^{-1})	Peso de semilla (mg semilla^{-1})	Días a madurez (días)				
Fecha de siembra								
Primera	443	56.8	128.9	109.4				
Segunda	459	63.5	139.4	103.2				
Tamaño de semilla								
AP- Semilla grande	444	86.7	195.2	105.8				
AP- Semilla pequeña	457	32.6	71.3	108.1				
Genotipo								
(S-D)† IA3011	426	78.4	185.2	104.8				
(I) PI555396	453	78.5	173.2	105.4				
(S-D) PI538376	445	101.4	227.3	107.2				
(S-D) PI518757	461	29.8	64.5	113.0				
(S-D) PI398970	454	39.4	86.5	105.6				
(D) PI196177	454	27.7	60.8	105.6				
Significancia estadística	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC
Bloque	-	2.8	-	0.6	-	0.3	-	0.2
Fecha de siembra (FS)	** (6)	30	n.s.	1.8	n.s.	0.8	n.s.	39.8
Tamaño semilla (TS)	** (11)	26.7	*** (5.4)	86.5	*** (11.2)	89.2	n.s.	5.7
FS* TS	n.s.	1	n.s.	0.1	n.s.	0	n.s.	0.1

Genotipo (TS)	** (15)	36	*** (7.7)	10.1	*** (15.8)	8.7	* (5.6)	38.9
FS*Genotipo (TS)	n.s.	3.4	n.s.	0.9	n.s.	0.9	n.s.	15.3

* Significativo al 0.05 nivel de probabilidad.

** Significativo al 0.01 nivel de probabilidad.

***Significativo al 0.001 nivel de probabilidad.

† Tipo de hábito de crecimiento: (I) indeterminado, (D) determinado, (S-D) semi-determinado.

El principal criterio para la selección de estos genotipos se basó en alta concentración de proteína con contenido de proteína contrastante, alto o bajo (y por lo tanto alto o bajo peso de grano). Sin embargo, hubo algunas restricciones para la selección, las cuales fueron impuestas por problemas agronómicos, tales como vuelco y susceptibilidad a enfermedades. Por lo tanto, algunos genotipos que tenían mayor concentración de proteína que los seleccionados no pudieron ser utilizados (Fig. II.1). El promedio de la concentración de proteína para los seis genotipos fue 449 g kg⁻¹.

Experimento II: Consecuencias ecofisiológicas a nivel de cultivo de variaciones en la estrategia para generar alta concentración de proteína

1) Concentraciones y contenidos de proteína, aceite y residual y tamaño de grano.

Los genotipos seleccionados mostraron que las estrategias, incluyendo los genotipos Comerciales, difirieron en cuanto a las concentraciones de proteína, aceite y residual (P<0.01; Fig. II. 2). La concentración de proteína promedio fue 364 g kg⁻¹ para los genotipos Comerciales, 432 g kg⁻¹ para AP-Semilla grande, y 412 g kg⁻¹ para AP-Semilla pequeña (factor principal tamaño de grano, P<0.05). Se presentaron también diferencias significativas entre los genotipos dentro de cada estrategia (Fig. II.2). Los genotipos Comerciales presentaron mayores concentraciones de aceite y residual (aceite 219 g kg⁻¹ y residual 417 g kg⁻¹) que las otras dos categorías (aceite 199 y 181 g kg⁻¹ y residual 369 y 407 g kg⁻¹, respectivamente para AP-Semilla grande y AP-Semilla pequeña). Como era de esperar, la mayor concentración de proteínas de los genotipos AP estuvo asociada con un incremento del contenido de proteína por semilla en la categoría AP- Semilla grande y con reducciones en los contenidos de aceite y residual por semilla en la categoría AP-Semilla pequeña cuando se comparan con los genotipos Comerciales.

Las concentraciones y contenidos de proteína, aceite y residual estuvieron afectados por la interacción año x tamaño de semilla, y genotipo x año (P<0.05). Sin embargo, estos efectos explicaron una baja proporción de la variación en concentración y contenido (<2.5 % de la suma de cuadrados). Una descripción completa de estas interacciones está disponible en el Apéndice IV.

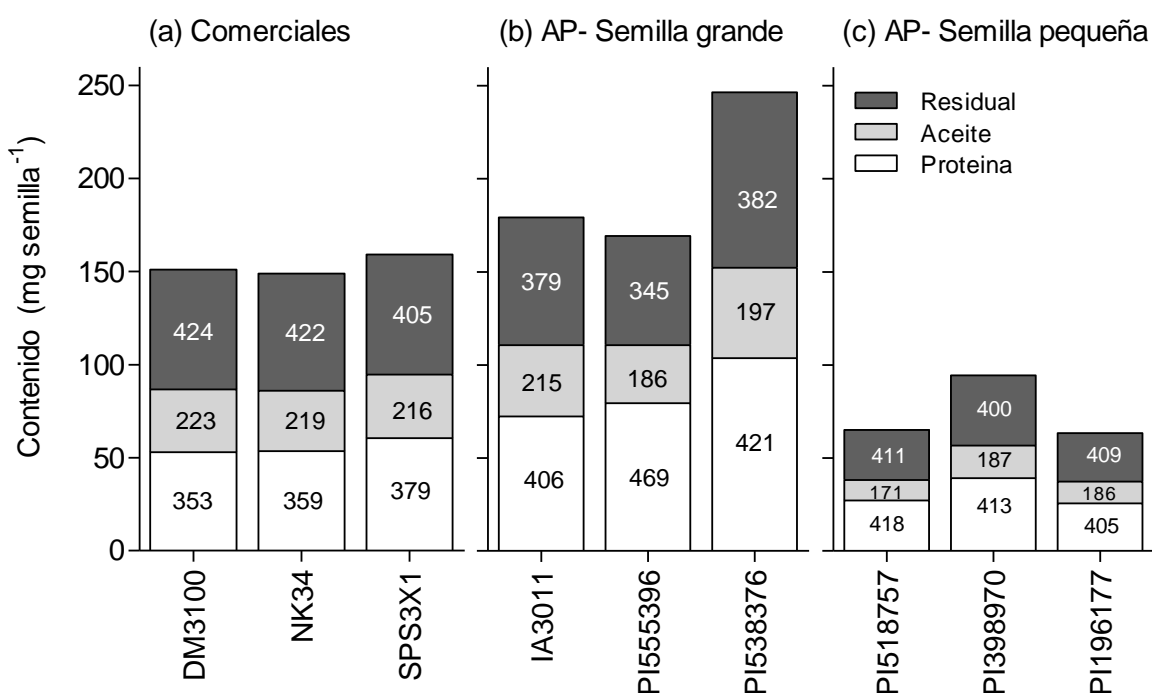


Fig. II.2. Efectos genotípicos sobre los contenidos de proteína, aceite y residual en cultivares con diferente tamaño de grano y composición. (a) “Comerciales” son cultivares elite con contenido de proteína y peso de grano promedio, (b) “AP- Semilla grande” son genotipos con alta concentración de proteína en las semillas a través de alto contenido, y (c) “AP- Semilla pequeña” son genotipos con alta concentración de proteína basada en reducciones en los contenidos de aceite y carbohidratos. Los números dentro de las barras refieren a la concentración de cada componente ($g\ kg^{-1}$) en base seca. La diferencia mínima significativa (DMS) para contenido (y concentración) son: proteína $1.6\ mg\ semilla^{-1}$ ($4\ g\ kg^{-1}$), aceite $0.7\ mg\ semilla^{-1}$ ($2\ g\ kg^{-1}$), y residual $1.2\ mg\ semilla^{-1}$ ($3\ g\ kg^{-1}$). Cada valor es un promedio de cuatro repeticiones y dos campañas agrícolas (2011–2012 y 2012–2013).

2) Rendimiento, biomasa, índice de cosecha

Como se esperaba, los genotipos Comerciales superaron en rendimiento a AP-Semilla grande y AP-Semilla pequeña en los dos años de experimento ($4300\ kg\ ha^{-1}$ contra $2900\ kg\ ha^{-1}$, respectivamente) (Tabla II.2). En la campaña 2011-2012, los genotipos AP-Semilla pequeña superaron en rendimiento a los AP-Semilla grande, pero éste fue similar durante la campaña 2012-2013. El efecto residual del genotipo después de considerar los efectos de las categorías basadas en el peso de grano fue no significativo (Tabla II. 2). Los rendimientos promedios en las campañas 2011-2012 y 2012-2013 fueron significativamente diferentes (2995 contra $3845\ kg\ ha^{-1}$ respectivamente).

Tabla II.2: Rendimiento, componentes numéricos y fisiológicos del rendimiento para genotipos con diferente tamaño de semilla y concentración de proteína evaluados en las campañas 2011/12 y 2012/13. Los genotipos del 1 al 3 son “Comerciales”, desde el 4 al 6 son “AP-Semillas grandes” y del 7 al 9 son “AP-Semillas pequeñas”. La diferencia mínima significativa (DMS) y el porcentaje de la suma de cuadrados total (%SC) fueron calculados para comparar interacciones significativas.

Fuente de variación	Rendimiento (kg ha ⁻¹)	Componentes numéricos		Componentes fisiológicos						
		Número de semillas (semilla m ⁻²)	Tamaño de semilla (mg semilla ⁻¹)	Biomasa total (g m ⁻²)	Índice de cosecha (kg kg ⁻¹)					
Tamaño de semilla										
Comerciales	4362	2993	152.8	978.9	0.445					
AP-Semilla grande	2818	1460	196.2	764.1	0.361					
AP-Semilla pequeña	3093	4333	74.2	973.5	0.320					
Año x Tamaño de semilla										
2011/12 Comerciales	4134	2836	146.2	996.2	0.422					
AP-Semilla grande	2230	1256	183.5	727.2	0.307					
AP-Semilla pequeña	2622	3738	73.3	1058.4	0.249					
2012/13 Commercial	4613	3149	160.1	961.5	0.468					
AP-Semilla grande	3357	1646	207.9	801.1	0.414					
AP-Semilla pequeña	3565	4928	75.1	888.7	0.391					
Genotipo										
1. DM3100	4374	2906	151.1	939.3	0.466					
2. NK34	4585	3469	149.0	1077.1	0.427					
3. SPS3X1	4158	2615	159.3	920.3	0.443					
4. IA3011	3039	1668	179.3	772.4	0.392					
5. PI555396	2648	1552	169.2	787.0	0.333					
6. PI538376	2760	1116	246.5	732.9	0.357					
7. PI518757	3073	4713	65.0	1089.9	0.285					
8. PI398970	3043	3307	94.2	851.6	0.351					
9. PI196177	3164	4980	63.3	979.1	0.324					
Significancia estadística										
	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC
Año	** (186)	23.5	** (125)	5.0	** (4.0)	1.1	n.s.	2.1	*** (0.008)	38.5
Bloque (Año)	–	6.0	–	1.2	–	0.2	–	9.2	–	0.6
Tamaño de semilla (TS)	*** (370)	62.5	*** (383)	77.2	*** (7.4)	83.9	*** (66.9)	46.0	*** (0.021)	40.6
Año x TS	* (741)	3.7	* (766)	2.4	* (14.8)	0.4	** (133.8)	11.4	*** (0.042)	5.9
Genotipo (TS)	n.s.	3.0	*** (1150)	13.2	*** (22.2)	13.7	** (200.6)	23.2	*** (0.063)	9.8
Año x Genotipo (TS)	n.s.	1.3	n.s.	1.1	* (44.5)	0.7	n.s.	8.1	* (0.125)	4.6

* Significativo al 0.05 nivel de probabilidad.

** Significativo al 0.01 nivel de probabilidad.

***Significativo al 0.001 nivel de probabilidad

Los componentes numéricos del rendimiento, número de semillas y peso de semilla individual, estuvieron muy asociados a las categorías de tamaño de semilla (Tabla II. 2). El número de semillas m^{-2} cosechadas fue 2993, 1460, y 4333 para los genotipos comerciales, AP-Semilla grande, y AP-Semilla pequeña respectivamente; se observaron diferencias genotípicas significativas dentro de cada estrategia ($P < 0.001$, Tabla II. 2). El peso de grano fue 153, 196, y 74 $mg\ semilla^{-1}$ para los genotipos comerciales, AP-Semilla grande y AP-Semilla pequeña, respectivamente. Dentro de cada categoría existieron diferencias genotípicas ($P < 0.001$, Tabla II.2). Las interacciones, año x tamaño de semilla y año x genotipo, fueron significativas dentro de las categorías de tamaño de semilla, pero explicaron una proporción muy pequeña del modelo total de variancia (Tabla II.2).

La biomasa total de las plantas a madurez fue mayor para las categorías Comerciales y AP-Semilla pequeña ($\sim 980\ g\ m^{-2}$) y menor para la categoría AP-Semilla grande ($\sim 760\ g\ m^{-2}$). El índice de cosecha fue mayor para los Comerciales (~ 0.45) y menor para las categorías AP (~ 0.40) (Tabla II.2). La interacción significativa de año x tamaño de semilla muestra que las diferencias en biomasa total entre los genotipos Comerciales y AP-Semilla grande fueron mayores durante la campaña 2011/12 (diferencia de $270\ g\ m^{-2}$) que durante la campaña 2012/13 (diferencia de $160\ g\ m^{-2}$, Tabla II.2). Hubo un efecto significativo del año para el IC (0.32 en 2011/12 y 0.42 en 2012/13). Aunque hubo un efecto significativo del peso de la semilla sobre el IC, las diferencias entre los genotipos AP fueron más evidentes en 2011/12 (diferencia de 0.06) que en 2012/13 (diferencia de 0.02).

3) *Crecimiento y Desarrollo de las semillas*

Los genotipos Comerciales presentaron la mayor duración de llenado de granos (48 días), mientras que los genotipos AP- Semilla pequeña la menor (36 días), y los genotipos AP-Semilla grande presentaron una duración intermedia (42 días) (Fig. II. 3). Hubo interacción significativa para año x tamaño de semilla ($P < 0.05$); en la campaña 2012/13 no hubo diferencias entre las categorías AP-Semilla grande y pequeña (promedio 40 días), pero existieron diferencias durante la campaña 2011/12 (43 vs. 35 días, respectivamente para AP-Semilla grande y pequeña). No hubo diferencias a través de los genotipos AP en cuanto a tasa de llenado de granos y DLLG. Los genotipos Comerciales tuvieron una tasa de crecimiento de los granos intermedia ($3.6\ mg\ semilla^{-1}\ día^{-1}$), AP-Semilla grande presentaron la mayor tasa ($5.3\ mg\ semilla^{-1}\ día^{-1}$) y los genotipos AP-Semilla pequeña la menor ($2.2\ mg\ semilla^{-1}\ día^{-1}$) (efecto principal del tamaño de la semilla $P < 0.05$) (Fig. II. 3).

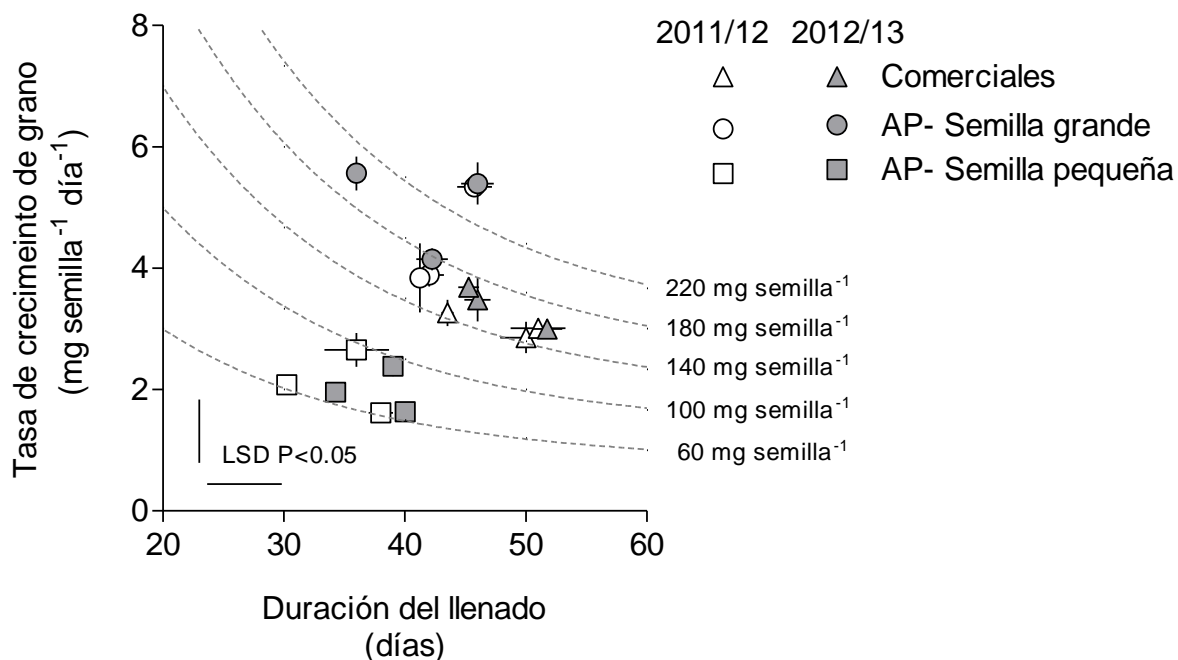


Fig. II.3. Tasa de crecimiento de grano y duración del llenado en genotipos con diferente tamaño de semilla y composición. Los triángulos hacen referencia a la estrategia Comerciales que son genotipos con tamaño de grano y proteína promedio, los círculos refieren a genotipos incluidos en la estrategia AP-Semilla grande, que tienen alta concentración de proteína debido a alto contenido de proteína, y los cuadrados son genotipos de la estrategia AP-Semilla pequeña que tienen alta concentración de proteína por reducciones en los contenidos de aceite y carbohidratos. Cada valor es un promedio de cuatro repeticiones. Las líneas punteadas indican combinaciones de tasa de crecimiento y duración del llenado para un mismo tamaño de semilla.

4) Características relacionadas al área foliar

El área foliar al comienzo del llenado de granos (IAF R5) fue mayor para los genotipos AP-Semilla pequeña ($4.3 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$), intermedia para los Comerciales ($3.8 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$), y la menor para los AP-Semilla grande ($3.3 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$) (Tabla II.3). Aunque hubo interacción significativa para año x tamaño de semilla, las tres categorías exhibieron un ranking similar durante las dos campañas (Tabla II.3). El promedio de IAF R5 difirió entre las campañas, con 3.08 y $4.54 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$ en los años 2011/12 y 2012/13, respectivamente ($P < 0.05$). Se evidenciaron algunas diferencias entre los genotipos de la categoría AP-Semilla pequeña (4.8 contra $3.9 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$ para los dos genotipos más contrastantes). La senescencia foliar más acelerada después de R5 estuvo asociada con las estrategias, alcanzando casi 70% del total de la suma de cuadrados del modelo ($P < 0.05$, Tabla II.3). Los genotipos AP-Semilla pequeña presentaron

la tasa de senescencia más acelerada ($b=-0.0029$) en comparación con los genotipos AP-Semilla grande ($b=-0.0016$) o con los Comerciales ($b=-0.0013$); estas diferencias fueron evidentes en los dos años. Hubo diferencias genotípicas dentro de las estrategias, especialmente dentro de AP-Semilla pequeña, donde PI518757 presentó la mayor tasa de senescencia ($b=-0.0036$) en comparación con los otros dos genotipos ($b=-0.0026$) (Tabla II. 3).

La duración del área foliar durante el llenado de granos (DAF) fue muy dependiente de la estación de crecimiento (93.7 contra 141.6 $m^2 d^{-1}$, en 2011/12 y 2012/13, respectivamente). El tamaño de semilla fue la segunda fuente de variación más importante, como se puede observar en la proporción de la suma de cuadrados en la Tabla II. 3. Los genotipos Comerciales fueron los que tuvieron la mayor DAF (137.6 $m^2 día^{-1}$), mientras que los genotipos AP-Semilla grande tuvieron la menor (102.7 $m^2 día^{-1}$), y estas diferencias fueron similares durante las dos estaciones de crecimiento. Hubo diferencias genotípicas significativas dentro de cada estrategia (Tabla II. 3).

Tabla II.3. Características relacionadas al área foliar para genotipos con diferente tamaño de semilla y concentración de proteína evaluados en las campañas 2011/12 y 2012/13. Comerciales son genotipos con tamaño de grano y proteína promedio, AP-Semilla grande son con alta concentración de proteína debido a alto contenido de proteína, y AP-Semilla pequeña son genotipos con alta concentración de proteínas por reducciones en los contenidos de aceite y carbohidratos. Los genotipos del 1 al 3 son “Comerciales”, desde el 4 al 6 son “AP-Semilla grande” y del 7 al 9 son “AP-Semilla pequeña”. La diferencia mínima significativa (DMS) y el porcentaje de la suma de cuadrados total (%SC) fueron calculados para comparar interacciones significativas.

Fuente de variación		Área foliar en R5 ($m^2 m^{-2}$)	CoefSen _{IAF}	Duración área foliar ($m^2 día$)
Tamaño de semilla				
	Comercial	3.77	-0.0013	137.6
	AP-Semilla grande	3.33	-0.0016	102.7
	AP-Semilla pequeña	4.33	-0.0029	112.7
Año x tamaño de semilla				
2011/2	Comercial	3.22	-0.0011	116.9
	AP-Semilla grande	2.47	-0.0012	75.5
	AP-Semilla pequeña	3.55	-0.0026	88.8
2012/3	Comercial	4.32	-0.0015	158.4
	AP-Semilla grande	4.18	-0.0020	129.9
	AP-Semilla pequeña	5.11	-0.0032	136.7
Genotipos				
	1. DM3100	3.43	-0.0012	124.8
	2. NK34	4.01	-0.0012	154.4

3. SPS3X1	3.87		-0.0015		133.7	
4. IA3011	3.25		-0.0019		90.7	
5. PI555396	3.03		-0.0013		98.3	
6. PI538376	3.71		-0.0016		119.1	
7. PI518757	4.38		-0.0036		102.1	
8. PI398970	3.86		-0.0023		107.1	
9. PI196177	4.75		-0.0029		129.0	
Significancia estadística	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC
Año	*** (0.59)	59.8	* (0.0001)	11.3	** (6.1)	54.7
Bloque (Año)	–	5.7	–	2.0	–	5.4
Tamaño de semilla (TS)	*** (0.29)	18.9	*** (0.0003)	68.0	*** (9.9)	20.5
Año x TS	* (0.58)	1.9	n.s.	1.1	n.s.	0.7
Genotipo (TS)	*** (0.87)	10.2	*** (0.0010)	16.5	*** (29.7)	13.8
Año x Genotipo (TS)	n.s.	3.5	n.s.	1.1	* (59.5)	4.9

* *Significativo al 0.05 nivel de probabilidad.*

** *Significativo al 0.01 nivel de probabilidad.*

*** *Significativo al 0.001 nivel de probabilidad.*

5) *Asimilados disponibles por semilla durante el llenado*

El área foliar a comienzo del llenado de granos (R5) se usó como una aproximación del total de asimilados disponibles para el llenado de la semilla (Rotundo et al., 2009). Debido a que el número de vainas y granos en R5 están en gran parte fijados (Board y Tan, 1995; Jiang y Egli, 1995), la relación entre el área foliar verde en R5 y el número de semillas en R7 puede ser considerada como un estimador de la disponibilidad de asimilados por semilla.

Esta característica estuvo fuertemente afectada por las estrategias relacionadas al tamaño de la semilla ($P < 0.05$), explicando más del 60% del total de la variabilidad. Los genotipos AP-Semilla grande siempre presentaron mayor cantidad de asimilados por semilla durante el llenado de granos, con 23.8 cm^2 de área foliar disponible por semilla; los genotipos Comerciales tuvieron $13.6 \text{ cm}^2 \text{ semilla}^{-1}$, y los AP-Semilla pequeña solo $10.2 \text{ cm}^2 \text{ semilla}^{-1}$. Hubo efecto significativo del genotipo dentro de cada estrategia sobre la disponibilidad de asimilados por semilla, alcanzando 27% de la suma de cuadrados del modelo. La variabilidad en la cantidad de asimilados disponibles por semilla estuvo explicada por diferencias en el número de semillas por unidad de área ($R^2 = 0.92$, $P < 0.05$), y no por diferencias en el área foliar por unidad de área ($R^2 = 0.18$, $P > 0.05$).

Se observó una relación asintótica entre el tamaño de la semilla y los asimilados disponibles por semilla (Fig., II. 4a). Una única función incluyó todos los genotipos y años, indicando una fuerte relación entre las variables. Sin embargo, no se observó relación entre la concentración de proteína y los asimilados disponibles por semilla (Fig. II. 4b).

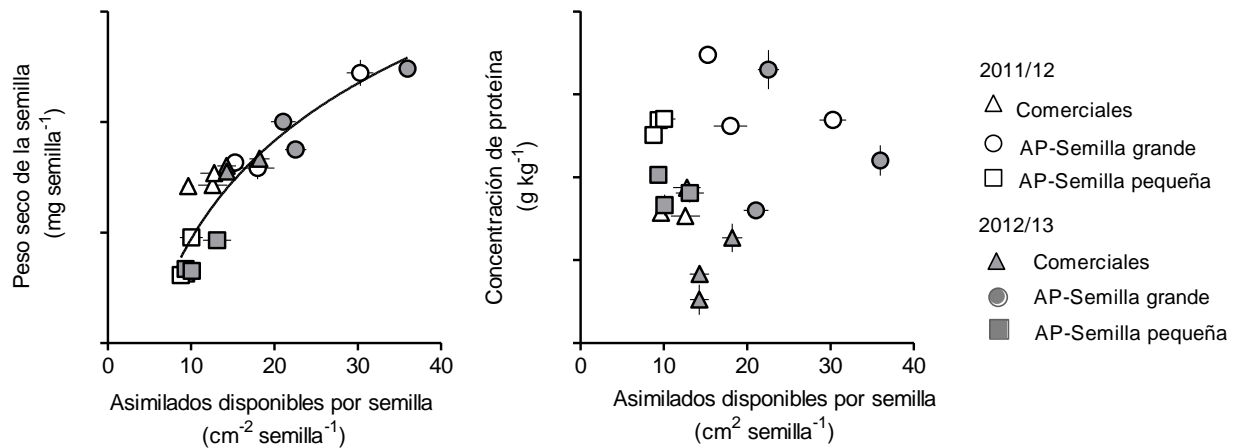


Fig. II.4. Relación entre el tamaño de la semilla (a) y la concentración de proteína (b) contra los asimilados disponibles por semilla. Los triángulos hacen referencia a la estrategia Comerciales que son genotipos con tamaño de grano y proteína promedio, los círculos refieren a genotipos incluidos en la estrategia AP-Semilla grande, que tienen alta concentración de proteína debido a alto contenido de proteína, y los cuadrados son genotipos de la estrategia AP-Semilla pequeña que tienen alta concentración de proteínas por reducciones en los contenidos de aceite y carbohidratos. Cada valor es un promedio de cuatro repeticiones.

6) Análisis multivariado para las categorías de tamaño de semilla.

Un análisis de componentes principales fue llevado a cabo para identificar características asociadas con el tamaño de la semilla. Los genotipos fueron usados como entradas, y las características del cultivo analizadas fueron aquellas que mostraron efectos genotípicos significativos a través de los años. Las dos primeras componentes explicaron el 73% del total de la variabilidad. La primera componente (47% de la variación) separó a los genotipos de la categoría AP-Semilla grande de los genotipos AP-Semilla pequeña de acuerdo con la cantidad de asimilados disponibles por semilla, la tasa de crecimiento de los granos, el área foliar a inicios de llenado de granos (Fig. II.5). La segunda componente (26% de la variabilidad) separó a los genotipos Comerciales de los genotipos de las categorías AP, los cuales se asociaron con mayor índice de cosecha, duración del área foliar, duración del llenado de granos y coeficiente de senescencia (Fig. II. 5).

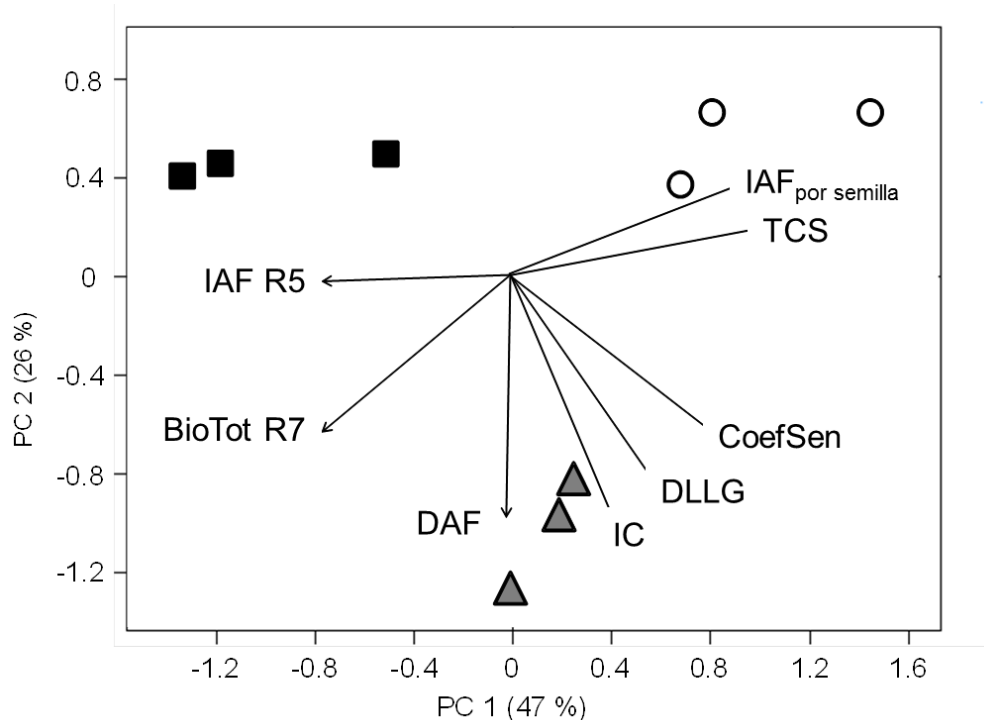


Fig. II.5. Análisis de componentes principales de características fisiológicas asociadas a genotipos con diferente tamaño de semilla y composición. Los triángulos hacen referencia a la estrategia Comerciales que son genotipos con tamaño de grano y proteína promedio, los círculos refieren a genotipos incluidos en la estrategia AP-Semilla grande, que tienen alta concentración de proteína debido a alto contenido de proteína, y los cuadrados son genotipos de la estrategia AP-Semilla pequeña que tienen alta concentración de proteínas por reducciones en los contenidos de aceite y carbohidratos. Las variables evaluadas son IC (kg kg^{-1}), índice de cosecha; BioTotR7 (kg ha^{-2}), biomasa total en madurez fisiológica; DAF ($\text{m}^2 \text{ día}$), duración del área foliar; IC (%), índice de cosecha; DLLG (días); duración de la fase lineal del llenado de granos; CoefSen_{IAF}, coeficiente de senescencia; TCS ($\text{mg semilla}^{-1} \text{ día}^{-1}$), tasa de crecimiento de la semilla; IAF_{por semilla} ($\text{cm}^2 \text{ semilla}^{-1}$), área foliar por semilla.

DISCUSIÓN

Los resultados de éste capítulo avalan la idea de que incrementos en la concentración de proteína pueden lograrse a través de estrategias fisiológicas contrastantes asociadas al tamaño de la semilla. Alta concentración de proteína puede ser obtenida por incrementos más que proporcionales en el contenido de proteína (mg semilla^{-1}) en relación a los contenidos de aceite y carbohidratos en semillas grandes, o por reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y/o carbohidratos en relación a la reducción en el contenido de proteína en semillas pequeñas. Egli (1998) propuso que la selección orientada a mejorar un constituyente químico del grano podría afectar el normal crecimiento y desarrollo de los cultivos. Estos resultados muestran que el impacto también puede depender del mecanismo, asociado a los diferentes tamaños de semilla, que esté modificando la composición del grano. La idea de que es posible seleccionar para un mismo carácter (ej.: concentración proteica de las semillas) a través de diferentes estrategias (ej.: semillas grandes vs. semillas pequeñas) es relevante para encontrar caminos alternativos de modo de eliminar las correlaciones negativas frecuentemente asociadas con limitantes biofísicas o a ligamiento genético (Stearns, 1989; Weih, 2003).

No considerar el rol del tamaño de grano sobre la composición puede llevar a conclusiones erróneas sobre el impacto de la selección para alta concentración de proteína sobre el funcionamiento del cultivo, aun en genotipos con rendimiento similar. Por ejemplo, la biomasa total a R7 (BioTotR7) fue mayor para los genotipos comerciales de alto rendimiento que para los genotipos AP (979 contra 869 g m^{-2} , respectivamente), independientemente del tamaño de grano. Sin embargo, teniendo en cuenta el tamaño de grano, la estrategia AP-Semilla pequeña presentó el potencial de producir una biomasa total a R7 similar a los genotipos Comerciales, mientras que la estrategia AP-Semilla grande no. Los resultados de Egli y Bruening (2007a) sugieren que un mayor reservorio vegetativo a comienzos de llenado de granos no está asociado con mayor concentración de proteína en los granos. Los resultados de esta tesis muestran que esta afirmación es verdadera para AP-Semilla grande, pero no para la estrategia AP-semilla pequeña; ésta última presentó el mayor área foliar al comienzos de llenado de granos. Una senescencia foliar más acelerada es otra característica asociada con una alta concentración de proteína en las semillas (Salado-Navarro et al., 1985). Los genotipos de alta proteína de semillas grandes tuvieron una tasa de senescencia foliar similar a los Comerciales, pero la estrategia de AP de semillas pequeñas tuvo mayor senescencia que la estrategia de Comerciales. El hábito de crecimiento de la mayoría de los cultivares fue semi-determinado, pero hubo un genotipo indeterminado en la categoría AP-Semilla grande, y un determinado en la categoría AP-

Semilla pequeña. Por lo tanto, algunos de los efectos genotípicos observados para las características relacionadas al área foliar, ej., diferencia en DAF entre el indeterminado PI555396 y el determinado PI196177, pueden estar relacionados con diferencias en el hábito de crecimiento. Sin embargo, existe vasta evidencia que avala el concepto de que el hábito de crecimiento no afecta la concentración final de proteína (Bernard, 1972; Escalante and Wilcox, 1993; Wilcox and Zhang, 1997), el área foliar total, la acumulación de materia seca (Beaver and Johnson, 1981) o el rendimiento en grano (Ouattara y Weaver, 1994). Por lo tanto, para entender el impacto de la AP sobre la dinámica del área foliar, es crítico considerar las estrategias en términos de tamaño de semilla que están asociadas con el incremento de la proteína en grano.

De manera similar a Egli y Bruening (2007b), se observó que la tasa de crecimiento de las semillas de los genotipos comerciales fue similar a la de las categorías AP en su conjunto, independientemente del tamaño de grano (3.6 contra 3.7 g semilla⁻¹ día⁻¹, respectivamente). Sin embargo, cuando se considera el tamaño de las semillas, encontramos que la tasa de crecimiento de las semillas fue mayor (5.3 g semilla⁻¹ día⁻¹, AP-Semilla grande) o menor (2.2 g semilla⁻¹ día⁻¹, AP-Semilla pequeña) que la estrategia Comerciales. Debido a que el peso del grano está determinado por cambios en la tasa de crecimiento del grano y en la duración del llenado, una asociación positiva entre el tamaño de la semilla y la tasa de crecimiento de la misma implica que no hubo variación en la duración del llenado entre los genotipos AP (Egli et al., 1981, 1987; Swank et al., 1987). Estos ejemplos muestran que considerar la estrategia que determina alta concentración de proteína es crítico para entender cualquier impacto potencial sobre el crecimiento y el desarrollo del cultivo.

La disponibilidad de asimilados por semilla juega un rol central en la determinación de la concentración de proteína en los granos cuando ésta se basa en el incremento en el contenido de proteína (mg proteína semilla⁻¹) en semillas grandes. En trabajos previos, se mostró que el incremento en la cantidad de asimilados disponibles por semilla, los cuales son necesarios para alcanzar alta concentración de proteína en semillas grandes, fue el resultado de una reducción en el número de granos en lugar de un incremento en la cantidad total de asimilados disponibles (ej., área foliar en R5; Rotundo et al., 2009, 2011). Ésta reducción en el número de granos fue la responsable del bajo rendimiento alcanzado por éstos genotipos AP. Existe suficiente evidencia de los mecanismos que rigen la relación entre los asimilados disponibles y el peso del grano (Jenner et al., 1991; Borrás et al., 2004; Rotundo et al., 2009). Sin embargo, mediante la comprensión de la existencia de diferentes estrategias, en términos de tamaño de la semilla, podríamos identificar genotipos de AP con menores requerimientos de asimilados por semilla (AP-Semilla pequeña) en comparación con los genotipos comerciales. Esto indica que un aumento en la cantidad de asimilados

disponible por semilla no es un requisito para alcanzar alta concentración, como previamente se sugirió (Rotundo et al., 2009).

Por otro lado, se encontró que varios loci de caracteres cuantitativos (quantitative trait loci, QTL) o regiones genómicas estuvieron asociadas con la concentración de proteínas del grano de soja (Diers et al., 1992; Csanádi et al., 2001; Chung et al., 2003; Panthee et al., 2005; Li et al., 2007; Zhao-Ming et al., 2011). El objetivo último de estos estudios fue identificar genes candidatos responsables del gen de interés (Bolon et al., 2010). Tener en cuenta estas estrategias basadas en diferente tamaño de grano para lograr alta concentración de proteína es crítico para facilitar la identificación de mecanismos moleculares responsables para este carácter. Por ejemplo, AP podría ser determinada por un gen relacionado con la reducción de la síntesis de carbohidratos y/o aceite en lugar de estar relacionada con un aumento en la síntesis de proteína. Ishii et al. (2010) demostró que ignorar estas alternativas podría resultar en detecciones de QTL para concentración de proteína que no tengan una función real en la síntesis proteica. La utilidad de estos QTL en el mejoramiento asistido por marcadores para incrementar la síntesis actual de proteína es limitada.

Estos resultados tienen implicancia en la selección de parentales para lograr simultáneamente mejorar por concentración proteica y rendimiento (Medic et al., 2014). La selección de parentales como donantes de AP debería tomar en consideración la influencia diferencial del tamaño de la semilla sobre el funcionamiento del cultivo. Por ejemplo, seleccionar donantes AP basada en tamaño de semilla pequeño sería, hipotéticamente, debido a que producen mayor área foliar al comienzo de llenado de granos (mayor reservorio de N), mayor biomasa, mayor fijación de granos, y menor requerimiento de asimilados por semilla. Para testear esta hipótesis, en el último capítulo de esta tesis evaluamos poblaciones desarrolladas cruzando parentales comerciales de alto rendimiento con donantes AP de semilla grande (cruzamiento Comercial x AP- Semilla grande), y por otro lado con donantes AP de semilla pequeña (cruzamiento Comercial x AP- Semilla pequeña). Según estos resultados existirían grandes chances de obtener un cultivar de alta proteína y alto rendimiento en poblaciones del cruzamiento Comercial x AP-Semilla pequeña.

CONCLUSIONES

El mejoramiento para incrementar la concentración de proteína en las semillas de soja puede ser llevado a cabo a través de dos estrategias basadas en el tamaño de grano. En este trabajo, describimos las dos alternativas: (i) genotipos de semilla grande y de alto contenido de proteína y, (ii) genotipos de semilla pequeña y con reducido contenido de aceite y carbohidratos. Investigaciones tendientes a describir los efectos de la selección por alta concentración de proteína sobre el crecimiento y el desarrollo del cultivo, se focalizaron casi en la mayoría de los casos, en genotipos de granos grandes, y no incluyeron la otra alternativa de AP.

En este capítulo arribamos a la conclusión de que alta proteína y alto rendimiento puede ser obtenido a través de estrategias fisiológicas contrastantes, cuando el tamaño de grano es considerado. Alta concentración de proteína en genotipos de semillas grandes estuvo asociada con un período de llenado de granos más largo, tasas de crecimiento de las semillas más aceleradas y mayor cantidad de asimilados disponibles por grano comparado con la otra estrategia AP. Ésta última presentó mayor área foliar a comienzos de llenado, y una tasa de senescencia más acelerada en comparación con la primera estrategia, y produjo el mismo rendimiento biológico que los genotipos comerciales.

Los resultados de éste capítulo muestran que seleccionar para un mismo carácter (ej.: alta concentración de proteínas en la semilla) puede impactar de manera diferencial sobre el crecimiento y el desarrollo dependiendo del mecanismo que esté rigiendo al carácter de interés.

CAPÍTULO III

PATRONES DE ACUMULACIÓN Y REMOVILIZACIÓN DEL NITRÓGENO EN GENOTIPOS DE SOJA CON DIFERENTE CONCENTRACIÓN PROTEICA Y PESO DE GRANO

INTRODUCCIÓN

La productividad y el valor económico del cultivo de soja se relacionan con la acumulación de N y proteína en las semillas (Egli y Bruening, 2007a). Desarrollar cultivares de alta proteína y alto rendimiento es un objetivo perseguido por el mejoramiento. Sin embargo esto ha estado usualmente restringido por la correlación negativa observada entre ambos caracteres (Wilcox, 1998; Wilcox y Shibles, 2001; Wilson, 2004). A madurez, el grano de soja presenta en promedio 40% de proteína (base seca; Cheftel et al., 1985). Los altos requerimientos de nitrógeno (N) de la semilla de soja llevaron a Sinclair y de Wit (1975, 1976) a plantear la idea de que éste no podía ser satisfecho por las tasas de acumulación diarias de N durante el llenado de granos y por lo tanto, el nitrógeno debía ser removilizado de los tejidos vegetativos desencadenando una senescencia acelerada. Esta senescencia acelerada reduciría la capacidad fotosintética del canopeo y el período de llenado de los granos, repercutiendo en última instancia sobre el rendimiento. Este proceso explicaría, al menos en parte, la correlación negativa frecuentemente observada entre la concentración de proteína y el rendimiento en el cultivo de soja. Aunque muchos trabajos demostraron que los genotipos con mayor concentración de proteína presentan una senescencia foliar acelerada y un período de llenado más acotado (Salado-Navarro et al., 1985; Frederick y Hesketh, 1994; Triboi y Triboi- Blondel, 2002; Leffel et al., 1992), otros plantearon que una alta concentración de proteína no acorta el período de llenado (Egli y Bruening, 2007) y, no se asocian con una mayor cantidad de N potencialmente redistribuible durante el llenado de los granos (Zeihner et al., 1982; Egli y Bruening, 2007).

El nitrógeno de los granos puede provenir del N acumulado en el canopeo previamente a inicio de llenado o posteriormente a éste período. Las fuentes de N pueden ser: (i) fijación de N por los nódulos (ii) absorción de N por las raíces y, (iii) remobilización de N de los tejidos vegetativos durante el llenado de granos. La fijación simbiótica puede contribuir en un 25 a 50% al total del N acumulado en las plantas en condiciones de suelo fértil y, entre un 80 a 94 % en suelos deficientes en N (Harper, 1987). La absorción de N por las raíces puede aportar alrededor de un 20% (Salon et al., 2001). Sin embargo, la

contribución de la fijación simbiótica de N y, la cantidad de N disponible en el suelo para ser absorbido por las raíces comienzan a declinar durante el llenado de los granos (Christensen et al., 1981; Salon et al., 2001; Rossato et al., 2002). Es aquí cuando interviene la removilización, aportando entre un 30 a un 100 % del N a los granos (Hanway y Weber 1971; Egli et al., 1978a; Jeppsen et al., 1978; Zeiher et al., 1982; Egli et al., 1983). La cantidad de N que se removiliza depende de la cantidad de N presente en la planta a comienzo de llenado (ej. Barbottin et al., 2005, Zeiher et al., 1982; Egli et al., 1983; Egli et al., 1978) y de la eficiencia de partición del N (Kichey et al., 2007; Gaju et al., 2011). Aunque se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre la acumulación y la utilización de N en leguminosas (ej. Lawlor 2002; Triboi y Triboi-Blondel 2002; Egli y Bruening, 2007; Munier-Jolain y Duthion, 1996; Leffel et al., 1992), los mecanismos responsables de las interacciones entre concentración de N en los granos y rendimiento aún no son claros.

La discrepancia entre los estudios tendientes a dilucidar las bases ecofisiológicas que rigen el carácter concentración de proteínas en las semillas (ej., Sinclair y de Wit 1975, 1976; Egli y Bruening, 2007; Leffel et al., 1992; Munier-Jolain y Duthion, 1996; Salado-Navarro et al., 1985; Frederick y Hesketh, 1994; Triboi y Triboi-Blondel, 2002) posiblemente radique en que éstos, no contemplan las dos estrategias fisiológicas que hemos expuesto en el capítulo II: (i) “AP-Semilla grande”, consiste en aumentos en la concentración de proteínas a través de aumentos más que proporcionales en el contenido de proteína en grano (mg semilla^{-1}) en relación a los incrementos en los contenidos de aceite y carbohidratos en semillas grandes, (ii) “AP-Semilla pequeña”, consiste en aumentos en la concentración de proteínas mediante reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y/o carbohidratos en relación a las reducciones en el contenido de proteína en semillas pequeñas (Poeta et al., 2016). En el capítulo anterior encontramos que el carácter “alta concentración de proteínas en la semilla” puede impactar de manera diferencial sobre caracteres relacionados con el crecimiento y el desarrollo del cultivo dependiendo de la estrategia que esté rigiendo al carácter. Por lo tanto, sería de esperar que estas estrategias también tengan un impacto diferencial sobre el metabolismo del nitrógeno (N).

En este capítulo nos proponemos describir diferencias en acumulación y distribución del nitrógeno durante el periodo de llenado de granos en genotipos de soja con diferentes estrategias para generar alta concentración proteica. Para abordar este objetivo se utilizaron dos enfoques:

(i) Estudio del reservorio de N foliar: esta aproximación se basa en evidencias que sostienen que un gran reservorio de N vegetativo a inicios de llenado de granos es un prerrequisito para desarrollar cultivares de alto rendimiento y alta proteína (Sinclair y de Wit, 1976; Triboi y Triboi-Blondel; 2002; Salado-Navarro et al., 1985; Sheehy, 2001). El modelo que utilizamos para describir el reservorio de nitrógeno a inicios de llenado de granos fue:

$$\Delta N \text{ hojas} = \Delta IAF \times \Delta NFE$$

(g N hoja m⁻² suelo) (m² hoja m⁻² suelo) (g N hoja m⁻² hoja)

$$\Delta NFE = \Delta \%N \text{ hojas} \times \Delta MSE$$

(g N hoja m⁻² hoja) (g N hojas g⁻¹ hojas) (g hoja m⁻² hoja)

donde $\Delta N \text{ hojas}$ es la variación del contenido de N foliar desde inicios de llenado de granos a madurez fisiológica (R5 y R7 respectivamente; Fehr y Caviness, 1977), la cual se compone de la variación (Δ) en el *IAF* (índice de área foliar), y en el *NFE* (nitrógeno foliar específico); *siendo este último el resultado en la variación en la %N hojas* (concentración de N foliar), y en *MSE* (materia seca específica) desde R5 a R7;

(ii) Estudio de la partición de N durante el llenado de granos: ésta aproximación se basa en estudios previos que sostienen que AP en las semillas (alto N) está asociada con altas tasas de pérdida del reservorio de N vegetativo por unidad de superficie y, con altas tasas de partición del N durante el período de llenado de granos (ej. Salado-Navarro et al.; 1985; Leffel et al., 1992). En el esquema teórico de la Fig. III.1. se puede observar la evolución del reservorio de N foliar desde la emergencia hasta cosecha y su partición a los órganos reproductivos durante el llenado de granos.

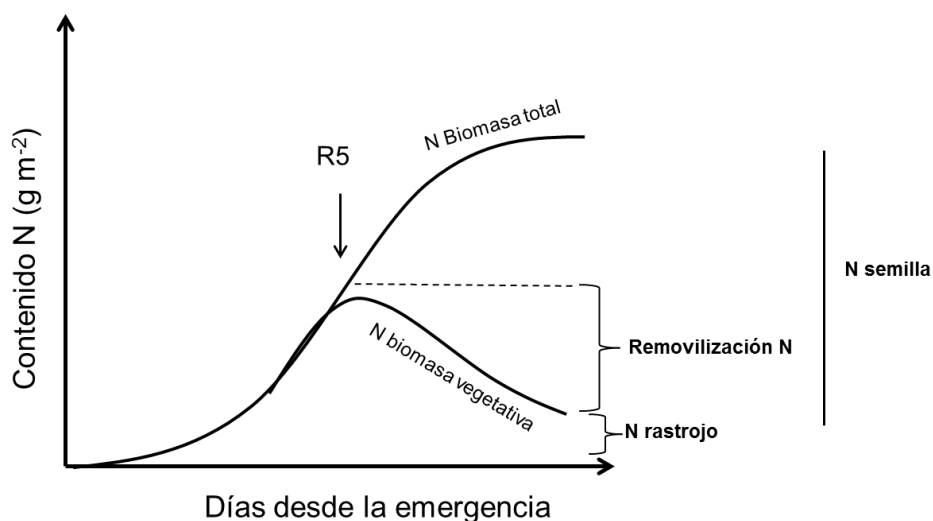


Fig. III.1. Esquema descriptivo de la aproximación ecofisiológica basada en la partición del reservorio de nitrógeno durante el llenado de granos (R5). Las variables detalladas son el nitrógeno de la biomasa vegetativa y de la biomasa total, N de las semillas a madurez (o rendimiento de N), la removilización de N, el N remanente en el rastrojo (N Rastrojo).

Hipótesis específicas

Los impactos fisiológicos a nivel de cultivo debido a aumentos en la concentración de proteína dependen de la estrategia que expresen los genotipos evaluados.

- La selección para un mismo carácter (ej.: alta concentración de proteínas en la semilla) puede impactar de manera diferencial sobre el metabolismo del N dependiendo del mecanismo que esté rigiendo al carácter de interés.

Objetivos específicos

Examinar cambios fisiológicos relacionados a la economía del nitrógeno del cultivo debido a incrementos en la concentración de proteína a través de las distintas estrategias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento de campo

El diseño de éste experimento es el mismo que el descrito en la sección Materiales y Métodos del el Capítulo II. Consistió en dos campañas, 2011/12 y 2012/13, y las fechas de siembra fueron 1 de Noviembre y 13 de Noviembre respectivamente. La densidad fue de 34 plantas m^{-2} . Las parcelas consistieron en 4 surcos de 5.5 metros de largo efectivos y 0.52 metros entre surcos. Las semillas se inocularon con *Bradyrhizobium* previo a la siembra. Se realizaron controles químicos de plagas y enfermedades según recomendaciones.

Material vegetal

Se utilizaron nueve genotipos: tres cultivares AP con semillas grandes y tres AP con semillas pequeñas y tres cultivares comerciales nacionales de alto rendimiento pero con tamaño de grano y concentración de proteína promedio. Un mayor detalle de las características de los genotipos están descritas en la sección Materiales y Métodos del Capítulo II.

VARIABLES MEDIDAS

Los estadios reproductivos (Fehr y Caviness, 1977) se determinaron tres veces por semana sobre 20 plantas consecutivas en cada parcela. Los estadios considerados fueron R1 (comienzo de floración), R3 (comienzo de fructificación), R5 (comienzo de llenado de granos), R6 (semilla completamente desarrollada) y R7 (madurez fisiológica). El período de llenado de granos efectivo (PLLG) fue determinado por los días transcurridos entre R5 y R7 (Egli et al., 1981). Los días transcurridos después de R5 se expresaron en porcentaje (%) en relación al largo del PLLG para homogeneizar diferencias en el número de días calendarios de los diferentes genotipos.

La biomasa aérea se muestreó a mano en los dos surcos centrales en cinco diferentes estadios de crecimiento durante el PLLG: R5, R5 + 10 días, R6, R6 + 10 días, y R7. El área muestreada consistió en 0.52 m^2 . Entre cada área de muestreo se dejó 0.26 m^2 de bordura para minimizar los efectos de los bordes. Las muestras fueron separadas en tallo, pecíolos, hojas verdes, hojas senescidas y vainas. Todas las muestras fueron secadas a 60°C hasta alcanzar peso constante, molidas y pesadas para ser utilizadas en los análisis de N.

La concentración de N en los todos los tejidos, excepto semillas (%) fue determinada sobre una submuestra de 0.1 gramos a través del método Kjeldahl (AOAC Method 988.05, 1990). En el caso de las semillas se utilizó 0.05 gramos de tejido. El contenido de N ($g m^{-2}$

de suelo) se calculó como el producto entre el peso de los tejidos (g m^{-2}) y la concentración de N de los mismos (%) dividido 100.

El rendimiento en grano (peso de las semillas por unidad de área en R7) fue expresado en base seca. El rendimiento de N se calculó como el producto entre el rendimiento en grano en R7 y la concentración de N de los granos en R7. El índice de cosecha (ICN) se calculó como la relación entre el peso seco de N de las semillas y el peso seco de N de la biomasa aérea total en R7, sin considerar las hojas caídas (Salado-Navarro et al., 1985). La cantidad de N removilizado de los tejidos vegetativos (tallos y hojas) se calculó como la diferencia entre el contenido de N vegetativo en R5 y a madurez (removilización aparente absoluta; Egli y Bruening, 2007). El porcentaje de N removilizado aparente se estimó como la relación entre el N vegetativo removilizado (g m^{-2}) y el contenido de N de las semillas en R7 (g m^{-2}) multiplicado por 100 (removilización aparente relativa).

Las hojas se utilizaron para determinar el índice de área foliar (IAF, superficie foliar verde por unidad de superficie de suelo) durante el período de llenado de granos mediante el uso de áreafolímetro LI-3100 (LI-COR, Nebraska, USA). Las muestras se mantuvieron en bolsas herméticamente cerradas y almacenadas en cámara fría (5°C) para evitar marchitamiento hasta el momento de ser procesadas. La materia seca específica (MSE; g m^{-2}) se calculó como la relación entre el peso seco de las hojas verdes (g m^{-2}) y el IAF ($\text{m}^2 \text{ m}^{-2}$). Solo se calculó la MSE en R5, debido a que no se encontró una ecuación que ajuste con el set de datos evaluado ($R^2 < 0.10$).

La senescencia foliar por unidad de superficie se estimó a través de un modelo cuadrático desde R5 a R7 (Poeta et al., 2016):

$$y = a + bx^2 \quad [2]$$

donde y es el IAF, a es la ordenada al origen (IAF R5, índice de área foliar a R5), b es el coeficiente de senescencia foliar ($\text{CoefSen}_{\text{IAF}}$), y x es el tiempo transcurrido después de R5 expresado en porcentaje. El CoefSen (b) toma valores negativos. Cuanto más negativo es el valor implica que la tasa de pérdida de área foliar verde es mayor. El término lineal de la función cuadrática (Ecuación 2) fue considerado como cero para una mejor modelización de la tasa de senescencia foliar asumiendo que el IAF en R5 es máximo (% del período entre R5-R7 después de R5 = 0).

Para modelar a tasa de pérdida del N foliar durante el período de llenado de granos, se usó la ecuación [2]. Donde y es el contenido de N de las hojas (g m^{-2}), a es la ordenada al origen (Contenido de N en R5), b es el coeficiente de senescencia en términos de pérdida de N foliar (CoefSen_N), y x es el tiempo transcurrido después de R5 expresado en porcentaje.

La caída de la concentración de N foliar se estimó a través de un modelo lineal desde R5 a R7:

$$y = a + bx \quad [3]$$

donde y es la concentración de N foliar (g kg^{-1}), a es la ordenada al origen (Concentración de N foliar en R5) b es la caída del N foliar, y x es el tiempo transcurrido después de R5 expresado en porcentaje.

El N foliar específico promedio del canopeo (NFE; g m^{-2} hoja verde) se calculó como la relación entre el contenido de N de las hojas verdes (g m^{-2}) e IAF ($\text{m}^2 \text{m}^{-2}$) (Bertheloot et al., 2008). La evolución del NFE desde R5 a R7 se modeló del mismo modo que la senescencia foliar, utilizando la ecuación [2], donde y es el NFE, a es la ordenada al origen (NFE en R5), b es la caída del NFE ($\text{CoefSen}_{\text{NFE}}$), y x es el tiempo transcurrido después de R5 expresado en porcentaje. El término lineal de la función cuadrática [2] fue considerado como cero para una mejor modelización, asumiendo que el NFE en R5 es máximo (% del período entre R5-R7 después de R5 = 0).

Análisis estadístico

Para este experimento el diseño experimental consistió en un diseño en bloques completos aleatorizados con cuatro repeticiones. La información fue analizada usando un modelo lineal generalizado (GLM) con el programa SAS 9.1 (SAS Institute, 1999). El modelo incluyó año, bloque anidado en año, tamaño de la semilla (estándar, AP-Semilla pequeña, AP- Semilla grande), y genotipo anidado dentro de la categoría como factores principales. El factor "genotipo" cuantifica la variación residual después de considerar el efecto del tamaño de la semilla. Se consideraron diferencias significativas con un nivel de probabilidad del 5%. Las medias individuales fueron comparadas con una prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

RESULTADOS

Reservorio de N foliar para el llenado de los granos

El contenido de N de las hojas en R5 (inicios de llenado de granos) no fue consistente entre las estrategias alta proteína. La categoría AP-Semilla grande presento 10% menos de N en R5 que AP-Semilla pequeña ($P < 0.05$; Tabla III.1.). Los genotipos Comerciales tuvieron igual cantidad de N que AP-Semilla pequeña ($P > 0.05$; Fig. III.2). No hubo interacción significativa para año x tamaño de semilla (Tabla III.1.). Se evidenciaron diferencias entre los genotipos dentro de la categoría AP-Semilla pequeña (5.9 vs. 7.9 g N m² para los dos genotipos más contrastantes) y dentro de los Comerciales (5.7 vs. 7.3 g N m², para los dos genotipos más contrastantes) (Tabla III.1.). La pérdida del contenido de N foliar (CoefSen_N) fue menor para la categoría AP-Semilla grande ($b = -0.0005$), intermedia para los Comerciales ($b = -0.0006$) y mayor para los AP-Semilla pequeña ($b = -0.0007$) ($P < 0.001$; Fig. III.2). No se presentó interacción significativa para año x tamaño de semilla (Tabla III.1.). Hubo un efecto significativo de la campaña, $b = -0.0005$ y $b = -0.0007$ para el año 2011 y 2012 respectivamente ($P < 0.001$; Tabla III.1.).

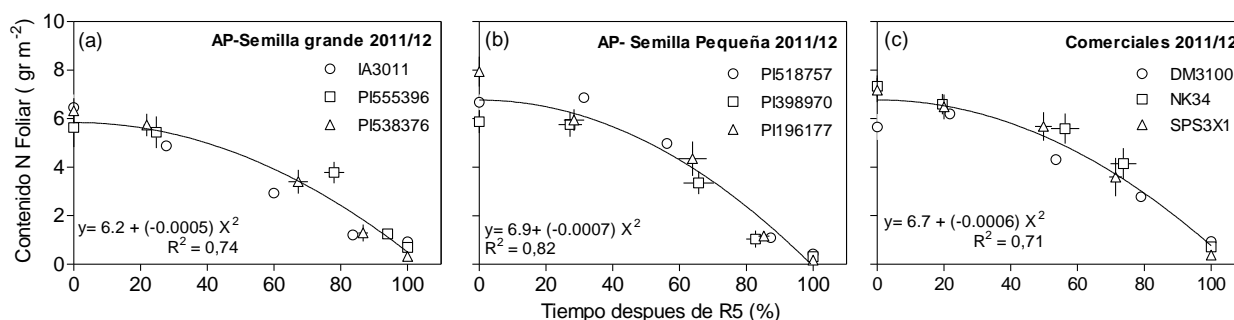


Fig. III.2. Relación entre el contenido de N foliar por unidad de superficie de suelo y el tiempo (% del período entre R5-R7 después de R5 = 0) para genotipos con diferente tamaño de semilla y concentración de proteína evaluados en las campañas 2011/12 y 2012/13. (a) Comerciales, son genotipos con tamaño de grano y proteína promedio; (b) AP-Semilla grande, son genotipos con alta concentración de proteína debido a alto contenido de proteína; (c) AP-Semilla pequeña, son genotipos con alta concentración de proteínas por reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y carbohidratos. Cada valor es un promedio de cuatro repeticiones por campaña.

Tabla III.1.: Contenido de N foliar en R5, índice de área foliar en R5 (IAF R5), nitrógeno foliar específico en R5 (NFE R5) y sus respectivos coeficientes de pérdida a lo largo del PLLG (CoefSen_N, CoefSen_{IAF}, CoefSen_{NFE}, respectivamente), concentración de nitrógeno foliar en R5 v su la tasa de pérdida y, materia seca espeífica en R5 (MSE R5) para genotipos con diferente tamaño de semilla y concentración de proteína evaluados en las campañas 2011/12 y 2012/13. Los genotipos del 1 al 3 son “Comerciales”, desde el 4 al 6 son “APSemilla grande” y del 7 al 9 son “AP-Semilla pequeña”. El valor de DMS_{0.05} y el porcentaje de la suma de cuadrados total (%SC) fueron calculados para comparar interacciones significativas.

	Contenido N foliar en R5	CoefSen _N	IAF R5	CoefSen _{IAF}	NFE R5	CoefSen _{NFE}	Concentración N foliar R5	Tasa de pérdida de la concentración de N foliar	MSE R5
	gr N m ⁻²		m ² m ⁻²		gr N m ⁻²		g kg ⁻¹	g kg ⁻¹ tiempo ⁻¹	g m ⁻² hoja
Tamaño de semilla									
Comercial	6.7	-0.0006	3.6	-0.0003	1.9	-0.00008	45	-0.194	42
AP-Semilla grande	6.2	-0.0005	3.3	-0.0003	1.9	-0.00006	41	-0.160	46
AP-Semilla pequeña	6.9	-0.0007	4.2	-0.0004	1.7	-0.00009	40	-0.155	42
Año x tamaño de semilla									
2011/2 Comercial	5.6	-0.0005	3.0	-0.0003	1.9	-0.00007	44	-0.184	42
AP-Semilla grande	4.9	-0.0004	2.5	-0.0002	2.0	-0.00006	43	-0.154	47
AP-Semilla pequeña	6.1	-0.0006	3.5	-0.0003	1.7	-0.00009	43	-0.174	40
2012/3 Comercial	7.9	-0.0007	4.1	-0.0003	1.9	-0.00009	45	-0.204	43
AP-Semilla grande	7.5	-0.0006	4.1	-0.0004	1.8	-0.00007	39	-0.165	46
AP-Semilla pequeña	7.8	-0.0008	4.9	-0.0005	1.6	-0.00009	35	-0.137	45

Genotipos

1. DM3100	5.7	-0.0005	3.1	-0.0002	1.8	-0.00008	44	-0.190	42
2. NK34	7.3	-0.0006	3.9	-0.0003	1.9	-0.00007	46	-0.189	41
3. SPS3X1	7.2	-0.0006	3.6	-0.0003	2.0	-0.00009	44	-0.204	45
4. IA3011	6.5	-0.0005	3.4	-0.0003	1.9	-0.00008	40	-0.173	49
5. PI555396	5.6	-0.0005	2.9	-0.0003	2.0	-0.00005	43	-0.163	46
6. PI538376	6.3	-0.0006	3.6	-0.0003	1.8	-0.00006	40	-0.144	44
7. PI518757	6.7	-0.0007	4.0	-0.0004	1.8	-0.00010	44	-0.161	42
8. PI398970	5.9	-0.0006	3.8	-0.0003	1.6	-0.00008	38	-0.150	41
9. PI196177	7.9	-0.0008	4.8	-0.0004	1.7	-0.00010	38	-0.155	44

Significancia estadística	Valor P (DMS)	% SC	Valor P (DMS)	% SC	Valor P (DMS)	% SC	Valor P (DMS)	% SC	Valor P (DMS)	% SC	Valor P (DMS)	% SC	Valor P (DMS)	% SC	Valor P (DMS)	% SC	Valor P (DMS)	% SC
Año	** (0,4)	57	*** (0.00004)	50	** (0,2)	54	*** (0.00002)	45	n.s.	5	** (0.00001)	9	*** (1)	22	n.s.	0	n.s.	5
Bloque (Año)		11		7		11		5		6		9		4	n.s.	5		8
Tamaño de semilla (TS)	* (0,5)	5	*** (0.00005)	16	*** (0,3)	17	*** (0.00003)	22	*** (0,1)	40	*** (0.00001)	38	*** (1)	33	*** (0.01)	49	*** (2)	34
Año x TS	n.s.	1	n.s.	0	n.s.	2	*** (0.00004)	7	** (0,1)	12	n.s.	1	*** (1)	19	*** (0.02)	26	** (3)	14
Genotipo (TS)	*** (0,9)	23	*** (0.00009)	23	*** (0,4)	14	*** (0.00005)	17	*** (0,1)	30	n.s.	30	*** (2)	16	n.s.	11	** (3)	29
Año x Genotipo (TS)	n.s.	3	n.s.	4	n.s.	2	** (0.00007)	5	n.s.	7	n.s.	13	* (2)	5	n.s.	9	n.s.	10

* *Significativo al 0.05 nivel de probabilidad.*

** *Significativo al 0.01 nivel de probabilidad.*

*** *Significativo al 0.001 nivel de probabilidad.*

El índice de área foliar (IAF R5) fue menor para los genotipos AP-Semilla grande (~3.3 m² m⁻²), intermedia para los Comerciales (~3.6 m² m⁻²), y mayor para los AP-Semilla pequeña (~4.2 m² m⁻²) (P<0.05; Fig. III.3). No hubo interacción significativa para año x tamaño de semilla (Tabla III.1.). La pérdida del área foliar a lo largo del PLLG (CoefSen_{IAF}) fue significativamente más acelerada para los genotipos AP-Semilla pequeña (b= -0.0004, P<0.001; Fig. III.3.). Para esta característica se presentó interacción significativa año x tamaño de semilla, sin embargo el aporte de ésta al total de la variabilidad fue solo 7% (% suma de cuadrados) (Tabla III.1).

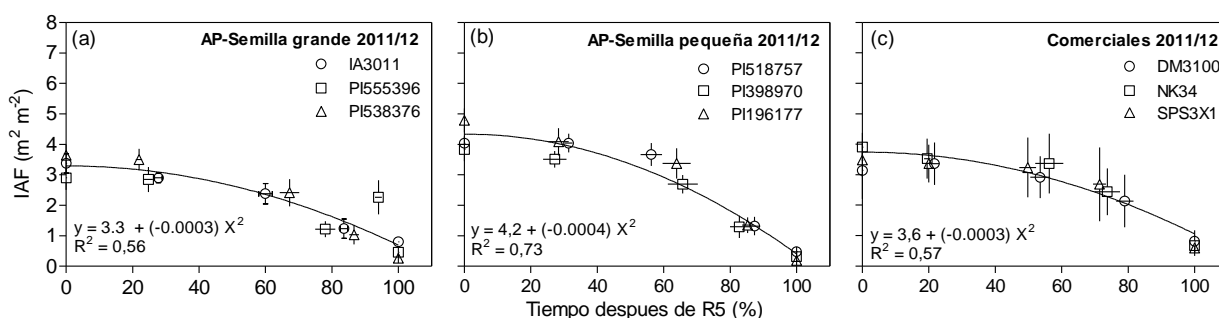


Fig. III.3. Relación entre el área foliar (IAF) y el tiempo (% del período entre R5-R7 después de R5 = 0) para genotipos con diferente tamaño de semilla y concentración de proteína evaluados en las campañas 2011/12 y 2012/13. (a) Comerciales, son genotipos con tamaño de grano y proteína promedio (b) AP-Semilla grande, son genotipos con alta concentración de proteína debido a alto contenido de proteína; (c) AP-Semilla pequeña, son genotipos con alta concentración de proteínas por reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y carbohidrato. Cada valor es un promedio de cuatro repeticiones por campaña.

Al comienzo del llenado de granos, el nitrógeno foliar específico (NFE) no fue diferente en los genotipos de las categorías AP-Semilla grande y Comerciales y, ambos presentaron un 10.5% más de NFE que AP-Semilla pequeña (P<0.001; Fig.III.4). Esta diferencia estuvo principalmente explicada por una mayor MSE a inicios del PLLG en los genotipos AP-Semilla grande (Fig.III.6) y por una mayor concentración de N foliar en los Comerciales (Fig.III.5). Se observó interacción año x peso de semilla para NFE R5; sin embargo su contribución a la variación fue solo 12% (Tabla III.1.). La pérdida del NFE luego de R5 (CoefSen_{NFE}) fue más lenta en los genotipos AP-Semilla grande, intermedia en los Comerciales y más rápida en los AP-Semilla pequeña (P<0.001; Fig. III.4). No se presentó interacción año x peso de semilla (Tabla III.1.). La mayor pérdida de NFE en AP-Semilla pequeña estuvo asociada a mayores tasas de pérdida de materia seca específica (Fig. III.6). Se presentaron diferencias genotípicas dentro de las tres categorías (Tabla III.1.).

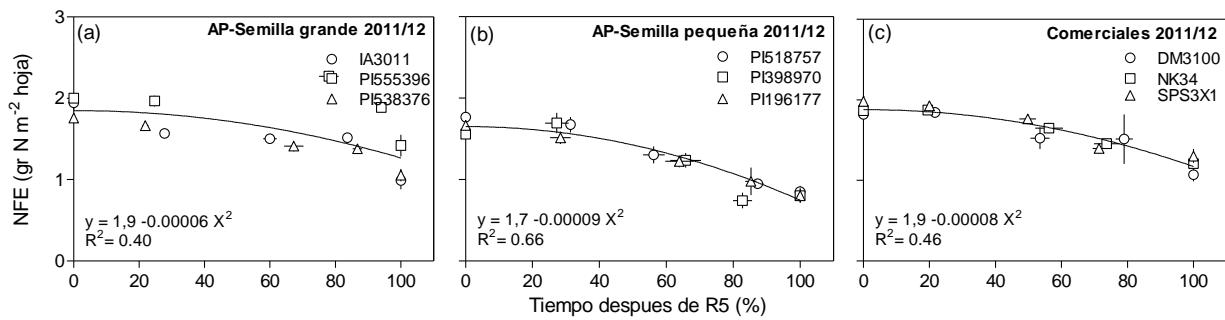


Fig. III.4. Relación entre el nitrógeno foliar específico (NFE) y el tiempo (% del período entre R5-R7 después de R5 = 0) para genotipos con diferente tamaño de semilla y concentración de proteína evaluados en las campañas 2011/12 y 2012/13. (a) Comerciales, son genotipos con tamaño de grano y proteína promedio. (b) AP-Semilla grande, son genotipos con alta concentración de proteína debido a alto contenido de proteína; (c) AP-Semilla pequeña, son genotipos con alta concentración de proteínas por reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y carbohidratos. Cada valor es un promedio de cuatro repeticiones por campaña.

Los genotipos AP presentaron menor concentración de N en R5 (~40 g kg⁻¹) en comparación con los Comerciales (45 g kg⁻¹) (P < 0.05; Fig. III.4). Hubo interacción significativa para año x tamaño de semilla (P < 0.001), sin embargo el efecto de ésta constituyó solo 19% de la variación observada en la concentración de N foliar en R5 (Tabla III.1.). La tasa de pérdida de la concentración de N foliar durante el llenado estuvo muy asociada con las categorías, alcanzando casi 50% del total de la suma de cuadrados del modelo (P < 0.0001; Tabla III.1.). Los genotipos AP tuvieron la menor pérdida (~-0.16; P < 0.001) en comparación con los genotipos Comerciales que presentaron la mayor tasa de pérdida (b = -0.19) (Fig. III.4.).

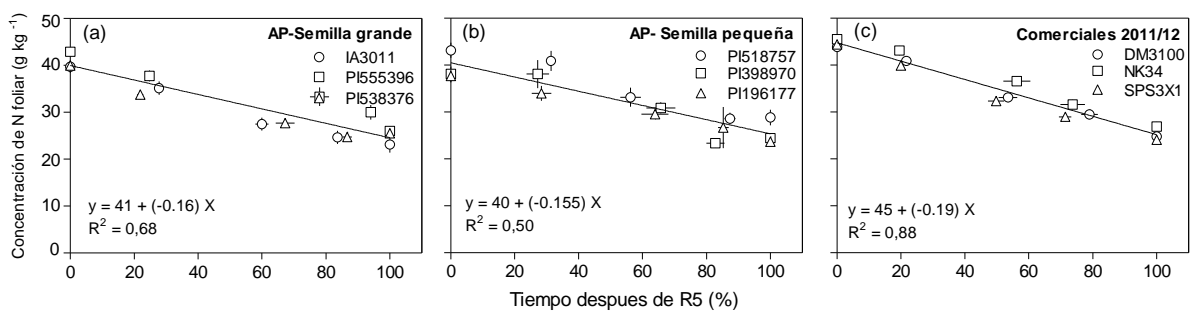


Fig. III.5. Relación entre la concentración de N foliar y el tiempo (% del período entre R5-R7 después de R5 = 0) para genotipos con diferente tamaño de semilla y concentración de

proteína evaluados en las campañas 2011/12 y 2012/13. (a) AP-Semilla grande, son genotipos con alta concentración de proteína debido a alto contenido de proteína; (b) AP-Semilla pequeña, son genotipos con alta concentración de proteínas por reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y carbohidratos; (c) Comerciales, son genotipos con tamaño de grano y proteína promedio. Cada valor es un promedio de cuatro repeticiones por campaña.

La materia seca específica a comienzo de llenado de granos difirió entre las estrategias AP ($P < 0.0001$; Tabla III.1.). La estrategia AP-Semilla grande presento la mayor MSE ($46.5 \text{ g m}^{-2} \text{ hoja}$). Hubo interacción año x peso de semilla, sin embargo el efecto principal de la categoría sobre la variabilidad total fue mayor (34 % SC) que el de la interacción (14% SC) (Tabla III.1.).

La MSE en la categoría AP-Semilla pequeña disminuyó a una tasa de $0.012 \text{ g m}^{-2} \text{ tiempo}^{-1}$ después de R5 (Fig. III.6.), mientras que las otras dos categorías no presentaron variaciones a lo largo del llenado de granos ($R^2 < 0.1$; Fig. III.6).

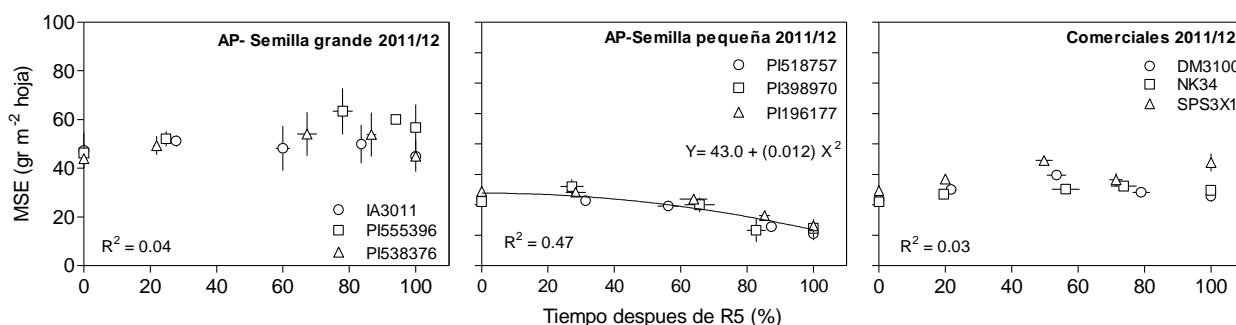


Fig. III.6. Relación entre la materia seca específica (MSE) y el tiempo (% del período entre R5-R7 después de R5 = 0) para genotipos con diferente tamaño de semilla y concentración de proteína evaluados en las campañas 2011/12 y 2012/13. (a) Comerciales, son genotipos con tamaño de grano y proteína promedio; (b) AP-Semilla grande, son genotipos con alta concentración de proteína debido a alto contenido de proteína; (c) AP-Semilla pequeña, son genotipos con alta concentración de proteínas por reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y carbohidratos. Cada valor es un promedio de cuatro repeticiones por campaña.

Patrones de partición del N durante el llenado de granos

Como se esperaba, los genotipos comerciales superaron en rendimiento de N a las categorías AP- Semilla grande y AP- Semilla pequeña en los dos años de experimento (25.6

vs. 20.3 g m⁻², respectivamente) (Tabla III.2). Los genotipos AP-Semilla pequeña superaron en rendimiento de N a AP-Semilla grande en la campaña 2011-2012, pero en la campaña siguiente el rendimiento fue similar. Esta característica estuvo afectada por la interacción año x tamaño de semilla (P<0.01). Sin embargo, estos efectos explicaron una baja proporción de la variación en rendimiento de N (< 2.3 % de la suma de cuadrados). Hubo un efecto significativo del año (22.0 vs. 24.3 g N m⁻²) (Tabla III.2.).

Tabla III.2.: Rendimiento N, índice de cosecha de nitrógeno en madurez (ICN_{R7}) removilización aparente absoluta de N, y removilización aparente relativa de N para genotipos con diferente tamaño de semilla y concentración de proteína evaluados en las campañas 2011/12 y 2012/13. Los genotipos del 1 al 3 son “Comerciales”, desde el 4 al 6 son “APSemillas grandes” y del 7 al 9 son “AP-Semillas pequeñas”. El valor de DMS_{0.05} y el porcentaje de la suma de cuadrados total (%SC) fueron calculados para comparar interacciones significativas.

Fuente de variación		Rendimiento N (gr m ⁻²)	ICNR7	Removilización aparente absoluta (gr N m ⁻²)	Removilización aparente relativa (% N)				
Tamaño de semilla									
	Comerciales	25.7	0.86	7.4	29.1				
	AP-Semilla grande	19.7	0.84	6.8	36.9				
	AP-Semilla pequeña	20.8	0.84	8.9	44.1				
Año x tamaño de semilla									
2011/12	Comerciales	24.9	0.86	6.3	25.6				
	AP-Semilla grande	16.1	0.82	5.7	36.7				
	AP-Semilla pequeña	18.4	0.82	7.5	41.1				
2012/13	Comerciales	26.4	0.86	8.5	32.6				
	AP-Semilla grande	23.3	0.87	7.9	37.3				
	AP-Semilla pequeña	23.2	0.87	10.6	47.8				
Genotipo									
	1. DM3100	24.9	0.86	5.8	23.4				
	2. NK34	27.3	0.85	7.8	28.7				
	3. SPS3X1	24.8	0.87	8.6	35.2				
	4. IA3011	20.3	0.84	7.4	37.9				
	5. PI555396	20.2	0.82	4.7	27.0				
	6. PI538376	18.7	0.86	7.9	43.4				
	7. PI518757	20.9	0.85	7.9	41.3				
	8. PI398970	20.5	0.84	8.5	42.2				
	9. PI196177	21.1	0.85	10.1	48.1				
Significancia estadística									
		Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	% SC	Valor P (DMS)	% SC	Valor P (DMS)	% SC
	Año	*(1.31)	30.9	*(0.02)	14.7	*(0.9)	28.0	n.s.	3.4
	Bloque (Año)	.	13.8	.	8.1	.	16.5	.	16.0
	Tamaño de semilla (TS)	***(1.6)	40.4	n.s.	4.0	***(1.1)	17.9	*** (6.0)	33.8
	Año x TS	** (2.27)	8.0	n.s.	10.2	n.s.	0.9	n.s.	3.4
	Genotipo (TS)	n.s.	3.8	n.s.	17.4	** (1.92)	25.9	* (10.4)	22.6

Año x Genotipo (TS)	n.s.	3.0	n.s.	45.6	n.s.	10.8	* (14.6)	20.8
---------------------	------	-----	------	------	------	------	----------	------

* *Significativo al 0.05 nivel de probabilidad.*

** *Significativo al 0.01 nivel de probabilidad.*

*** *Significativo al 0.001 nivel de probabilidad.*

Las categorías no presentaron diferencias en cuanto al índice de cosecha de N en R7. La estrategia AP-semilla pequeña presentó mayor removilización aparente absoluta de N que AP-Semilla grande y que los Comerciales (8.9 vs. 7.1 g m⁻²) (Tabla III.1.). La estrategia AP-Semilla grande y los Comerciales no difirieron en cuanto a la removilización aparente absoluta de N (Tabla III.1.). En términos relativos, la categoría AP-Semilla pequeña fue la que presentó mayor aporte porcentual de la removilización N a las semillas maduras (44 %), mientras que la removilización de N en la categoría AP-Semilla grande fue 37% y en los Comerciales 29%.

DISCUSIÓN

Los resultados de este capítulo evidencian que un mismo nivel de concentración de proteína en las semillas de soja puede lograrse a través de diferentes patrones de acumulación y utilización de N dependiendo de la estrategia, asociada a diferente tamaño de grano. Se han llevado a cabo muchos estudios con el fin de dilucidar las bases fisiológicas que gobiernan la correlación negativa entre concentración de proteína y rendimiento (ej., Sinclair y de Wit 1975, 1976; Egli y Bruening, 2007 ab; Leffel et al., 1992; Salado-Navarro et al., 1985; Rotundo et al., 2009, 2011). Algunos sugirieron que las limitaciones en rendimiento se deben a los altos requerimientos de N de los granos en genotipos AP, los cuales desencadenan una senescencia foliar acelerada a causa de la removilización del N foliar. Como consecuencia, se acelera la tasa de partición de asimilados a los granos y se acorta el periodo de llenado de granos, repercutiendo en última instancia sobre el rendimiento (Sinclair y de Wit 1975, 1976; Salado-Navarro et al., 1985; Leffel et al., 1992). Otros autores, mostraron que no existen evidencias a favor de ésta hipótesis de auto-destrucción (Egli y Bruening, 2007b; Zeiher et al., 1982). Sin embargo, éstos trabajos no consideraron la influencia del tamaño de grano sobre la composición (ej., Brim and Burton, 1979; Salado-Navarro et al., 1985; Wilcox y Zhang, 1997; Cober y Voldeng, 2000; Egli y Bruening, 2007b), o mostraron una correlación positiva entre tamaño de grano y proteína (Alt et al., 2002; Panthee et al., 2005; Rotundo et al., 2009). Un nuevo enfoque en el estudio de la fisiología del N es fundamental para identificar caracteres fisiológicos potencialmente útiles para el mejoramiento orientado a desarrollar cultivares de alta concentración de proteína y rendimiento.

Existen evidencias que avalan la idea de que un gran reservorio de N vegetativo a inicios de llenado de granos es un prerrequisito para desarrollar cultivares de alto rendimiento y alta proteína (Sinclair y de Wit, 1976; Triboi y Triboi-Blondel; 2002; Salado-Navarro et al., 1985; Sheehy, 2001); sin embargo otras no la sustentan (Egli y Bruening, 2007b). Los resultados aquí descritos se ajustan parcialmente a ésta hipótesis. Por ejemplo, la estrategia AP-Semilla pequeña (asociada a alta concentración de proteína por reducciones más que proporcionales en aceite y carbohidratos) presentó el mayor contenido de N foliar y, área foliar por unidad de superficie a inicios de llenado de granos. En contraposición, la estrategia AP-Semilla grande (asociada a alta concentración de proteína debido a incrementos en el contenido de proteína *per se*) presentó el menor reservorio de N vegetativo. Los genotipos comerciales de alto rendimiento exhibieron igual nivel de contenido de N foliar que la estrategia AP-Semilla pequeña y un IAF intermedio a las categorías AP. Estos resultados son un claro indicio de que la cantidad de N acumulado a

comienzos del período de llenado de granos no está asociada con la concentración de proteína de las semillas *per se* cómo previamente se había reportado (Sinclair y de Wit, 1976; Triboi y Triboi-Blondel; 2002; Salado-Navarro et al., 1985; Sheehy, 2001).

Otros estudios sugirieron que los genotipos con AP en las semillas presentan pérdidas más aceleradas del reservorio de N vegetativo por unidad de superficie y mayores tasas de partición del N durante el período de llenado de granos (ej. Salado-Navarro et al.; 1985; Leffel et al., 1992). Los resultados muestran que patrones de redistribución de N contrastantes emergen de las estrategias evaluadas. Los genotipos AP-Semilla pequeña exhibieron mayores niveles de redistribución del N, y por lo tanto también presentaron una pérdida más acelerada de contenido de N y de área foliar, en comparación con la categoría AP de granos grandes. Es decir, la estrategia AP-Semilla pequeña se ajusta a lo expuesto por Salado-Navarro et al. (1985) y Leffel et al. (1992), pero no la estrategia AP- Semilla grande. Del mismo modo, la estrategia de granos pequeños, que cuenta con el mayor reservorio de N a inicios de llenado, contribuye a la idea de que la cantidad de N presente a comienzos de llenado está íntimamente asociada con la cantidad de N disponible para removilización (Zeihner et al., 1982; Egli et al., 1983; Egli et al., 1978) pero no así en la estrategia AP de granos grandes. Estos resultados reafirman la idea de que el impacto sobre funcionamiento del cultivo dependería de la estrategia, asociada a diferente tamaño de semilla, que esté modificando la composición de la semilla (Poeta et al., 2016).

Por otro lado, para alcanzar altos rendimientos, el cultivo de soja debe mantener altas tasas fotosintéticas y acumular grandes cantidades de N en las semillas. Sinclair y Horie (1989) reportaron que existe una fuerte correlación entre la cantidad de N por unidad de área foliar (NFE) y la fotosíntesis. Debido a esto, el canopeo de un genotipo de alto rinde debería ser capaz de interceptar la mayor cantidad de radiación y, almacenar cantidades de N en las hojas suficientes para mantener el aparato fotosintético de modo de convertir esa radiación interceptada en biomasa y en última instancia en rendimiento en grano. La fotosíntesis neta del cultivo de soja entre floración y comienzos de llenado de granos (R1 a R5, según escala de Fehr y Caviness, 1977), está muy relacionada con el número de granos por unidad de superficie (principal componente del rendimiento) siendo más críticos los estadios que van desde R4 a R5 (plena fructificación y comienzo de llenado de granos, respectivamente según Fehr y Caviness, 1977). Los resultados de este experimento muestran que los genotipos Comerciales presentaron, como se esperaba, mayor rendimiento en N que los genotipos AP. Sin embargo, los Comerciales no mostraron diferencias marcadas en cuanto a NFE en comparación con los genotipos AP. Éstos presentaron igual NFE en R5 que la estrategia AP-Semilla grande y una tasa de caída intermedia a los genotipos AP.

CONCLUSIONES

Los resultados de este capítulo evidencian que un gran reservorio de N vegetativo a inicios de llenado de granos, altas tasas de removilización de N foliar o altos niveles de partición del N durante el PLLG no están asociados con la concentración de proteína de las semillas *per se* como previamente se había reportado. Sino que dependerían de la estrategia fisiológica, asociada al tamaño de grano que esté modificando el carácter.

Alta concentración de proteína en genotipos de semillas pequeñas estuvo asociada a un mayor área foliar y contenido de N por unidad de superficie a inicios de llenado de granos y, a una mayor removilización del N en los granos maduros, en comparación con la otra estrategia AP. Ésta última presentó mayor contenido de N por unidad de área foliar a inicios de llenado y menor pérdida de éste a lo largo del PLLG.

Estos resultados sugieren que no considerar estas estrategias AP puede arribar a resultados contradictorios en relación a características relacionadas a la economía del N.

CAPÍTULO IV

GENES ASOCIADOS AL ALMACENAMIENTO Y ACUMULACIÓN DE RESERVAS EN CULTIVARES DE SOJA QUE DIFIEREN EN LA ESTRATEGIA FISIOLÓGICA PARA LOGRAR ALTA CONCENTRACIÓN PROTEICA EN LAS SEMILLAS.

Poeta F.B., Ochogavía A.C., Permingeat H.R., Rotundo J.L. 2017. Storage-associated genes and reserves accumulation in soybean cultivars differing in physiological strategies for attaining high seed protein concentration. Crop Science. (doi: 10.2135/cropsci2016.07.0611)

INTRODUCCIÓN

Las semillas de soja constituyen la fuente de proteína principalmente usada para alimentación animal. El mercado internacional demanda semillas con alta concentración de proteínas (~380 g kg⁻¹, en base seca) para poder lograr las harinas proteicas de alta calidad requeridas para una comercialización rentable. Dada la importancia de este carácter, el desarrollo de variedades con concentraciones de proteína superiores se ha convertido en una prioridad para la investigación (Wilson, 2004). Sin embargo, está bien documentado que incrementos en la concentración de proteína están asociados a menor concentración de aceite (Wilson, 2004), y menor rendimiento (Brim y Burton, 1979; Carter, 1982; Wilcox y Zhang, 1997; Cober y Voldeng, 2000; Wilcox y Shibles, 2001). También ha sido estudiado que la concentración proteica es un carácter cuantitativo muy afectado por el genotipo y el ambiente (Yaklich et al., 2002; Dardanelli et al., 2006; Naeve y Huerd, 2008; Rotundo y Westgate, 2009; Medic et al., 2014; Rotundo et al., 2016). Debido a la complejidad de este carácter, un enfoque integral que involucre tanto el estudio de aspectos fisiológicos como moleculares es necesario para un mejor entendimiento de los procesos que determinan la concentración de proteína en las semillas de soja.

La composición final de la semilla de soja es el resultado de la relación matemática entre el contenido de cada componente (mg por semilla de proteína, aceite y carbohidratos) y el peso total de la semilla (Ishii et al., 2010). El contenido de cada constituyente químico en la semilla depende, al mismo tiempo, de la tasa acumulación (mg semilla⁻¹ día⁻¹) y la duración del llenado (días) (Swank et al., 1987). En línea con estos conceptos, en el capítulo II, identificamos genotipos de soja AP que logran alta concentración de proteína en las semillas a través de dos estrategias contrastantes basadas en diferente tamaño de semilla (Poeta et

al., 2016). Como vimos en ese capítulo, alta concentración de proteína puede ser lograda por incrementos más que proporcionales en el contenido de proteína en genotipos de semillas grandes (AP-Semilla grande) o, alternativamente, por reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y carbohidratos en genotipos de semillas pequeñas (AP-Semilla pequeña). Este estudio ha demostrado que un mismo carácter (por ejemplo, concentración de proteína de las semillas) puede ser alcanzado vía diferentes estrategias fisiológicas asociadas con el tamaño de la semilla. Además, los resultados de éste experimento mostraron que estas estrategias tienen un impacto contrastante a nivel ecofisiológico. Los genotipos AP-Semilla grande tuvieron periodos de llenado de grano más largos, tasas de llenado más rápidas, y mayor cantidad de asimilados disponibles por grano comparado con los genotipos AP de semillas pequeñas. Éstos últimos presentaron mayor índice de área foliar a comienzos de llenado de granos, senescencia más acelerada, pero muy bajo niveles de asimilados en comparación con la estrategia AP-Semilla grande. Actualmente, no hay información sobre el posible impacto de estas estrategias sobre otros procesos relacionados con la acumulación de proteína, aceite y residual a nivel fisiológico y/o molecular.

Varios estudios, en diferentes especies de plantas, se han llevado a cabo con el objetivo de entender las bases moleculares de la deposición de proteína en las semillas. Se ha sugerido la importancia de algunas enzimas clave involucradas en el metabolismo de carbohidratos y proteínas para incrementar la concentración de proteína. En cotiledones de arveja (*Pisum sativum*), por ejemplo, se reportó que la sobreexpresión de transportadores de sacarosa estimulaba la acumulación de proteínas de reserva a través del incremento de los niveles de glucosa intracelular lo que llevaba a la activación de genes asociados a estas proteínas (St SUT1; Rosche et al., 2002). En *Vicia narbonensis* la concentración de proteína en la semillas se ha incrementado a través de la sobreexpresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (FPC) (Rolletschek et al., 2004). Esta enzima tiene una función principal en la síntesis de carbohidratos y ha sido demostrado que el aumento de su expresión lleva a mayores incorporaciones de carbono en proteínas (Rolletschek et al., 2004; Radchuk et al., 2007). Del mismo modo, la sobreexpresión de una aminoácido permeasa (VfAAP1; Miranda et al., 2001) resultó en incrementos en la concentración de proteína de los granos debido a mayor disponibilidad de aminoácidos (Rolletschek et al., 2005). La inhibición de la ADP-glucosa pirofosforilasa (ADPGP) incrementó la disponibilidad de aminoácidos para la biosíntesis de proteínas determinando una mayor concentración de proteína en las semillas (Rolletschek et al., 2002). En estos estudios previos, los autores consideraron aumentos en la concentración de proteína únicamente a través de incrementos en el contenido de proteína (AP-Semilla grande). En este capítulo, evaluamos la hipótesis de

que la base molecular que rige el carácter alta concentración de proteína en los granos depende de la estrategia fisiológica que lo determina (AP-Semilla grande o pequeña).

El aceite es otro componente importante de la semilla de soja. Varios estudios han evaluado el rol de la acetil Co-A carboxilasa (ACC) y de la diacilglicerol acil transferasa (DGAT) en la acumulación de aceite (ej. Ohlrogge y Jaworski, 1997; Hills, 2004). Lardizabal et al. (2008) reportó que la sobreexpresión de DGAT incrementó el contenido de aceite en las semillas transgénicas de soja. En *Arabidopsis*, la expresión de copias extras de transcritos de DGAT, a través del uso de un promotor específico, incrementó el contenido de aceite (Jako et al., 2001). Además, Roesler et al., (1997) encontró incrementos en los contenidos de ácidos grasos a través de la sobreexpresión de ACC citosólica, forma homomérica, en los plastidios. Considerando estos antecedentes, se podría inferir que alta concentración de proteína en AP-Semilla pequeña está asociada con niveles de expresión reducidos de algunos de los genes que codifican para estas enzimas.

Las estrategias fisiológicas descritas en el capítulo II proveen un marco teórico útil para investigar si existen patrones moleculares y/o de desarrollo contrastantes, a pesar de que las dos estrategias buscan incrementar el mismo carácter (ej. concentración proteica de las semillas). En este capítulo comparamos un cultivar con proteína estándar (Comercial), contra dos cultivares alta proteína (AP-Semilla grande y AP-Semilla pequeña). Los objetivos consistieron en (i) describir el crecimiento de las semillas y normalizar su desarrollo usando como marco teórico la disminución de la humedad de los granos en genotipos con peso de grano y composición contrastante. Esta normalización es crítica para este tipo de estudios de expresión de genes ya que permiten hacer comparaciones entre genotipos que difieren en la duración del llenado de los granos (Swank et al., 1987; Calderini et al., 2000; Borrás y Westgate, 2006); (ii) investigar diferencias en tasa y duración de acumulación de proteína, aceite, y residual en el mismo grupo de genotipos; y (iii) evaluar en los mismos genotipos, la expresión de seis genes que codifican para enzimas involucradas en la composición de la semilla. No hubo intención de presentar un perfil completo de expresión génica, sino que se hizo hincapié en la expresión de ciertos genes cuya función en composición de la semilla ha sido previamente reportada. Los genes evaluados fueron: aminoácido permeasa (AAP), fosfoenol piruvato carboxilasa (FPC), transportador de sacarosa (SUT), ADP-glucosa pirofosforilasa (ADPGP), acetil Co-A carboxilasa (ACC), y diacilglicerol acil transferasa (DGAT). La caracterización de la expresión de genes asociados a la acumulación de reservas en la semilla, en conjunto con el estudio de procesos asociados al desarrollo de la semilla, contribuyen a entender aspectos moleculares y fisiológicos que rigen la acumulación proteica en los granos.

Hipótesis específicas

Un mismo nivel de concentración proteica en los granos puede alcanzarse a través de patrones de acumulación de reserva contrastantes.

Alta concentración de proteína en las semillas mediante la estrategia “AP-Semilla grande” depende de una mayor expresión de genes involucrados en la síntesis proteica, mientras que aumentos mediante la estrategia “AP-Semilla pequeña” dependen de una menor expresión de genes involucrados en la síntesis de aceite y carbohidratos.

Objetivo específico

Caracterizar la acumulación de reservas de la semilla y la expresión de genes asociados a la composición del grano de soja en genotipos que expresan estrategias contrastantes.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

En este capítulo se utilizó solo tres de los nueve los genotipos utilizados en el Experimento II del Capítulo II y, en el capítulo III: un cultivar Comercial (DM 3100) de alto rendimiento (4374 kg ha⁻¹), pero concentración de proteína, contenido de proteína y tamaño de grano promedio (350 g kg⁻¹, 53 mg semilla⁻¹ y 152.8 mg semilla⁻¹, respectivamente) ; un cultivar AP-Semilla grande (PI538376; 196.2 mg semilla⁻¹), con alta concentración y contenido de proteínas (421 g kg⁻¹ y 103.7 mg semilla⁻¹, respectivamente); y un cultivar de semilla pequeña (PI518757; 74.2 mg semilla⁻¹) con alta concentración de proteína (418 g kg⁻¹) asociada con bajo contenido de aceite y carbohidratos (AP-Semilla pequeña). Estos genotipos fueron seleccionados al azar de los nueve genotipos evaluados para características de crecimiento y desarrollo en el Capítulo II, Experimento II (Poeta et al., 2016) y en el capítulo III.

Experimento de campo

El experimento tuvo lugar en el Campo Experimental Villarino, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, in Zavalla, Argentina. El suelo fue de tipo arcillo-limoso Argiudol Vértico, serie Roldán. Las parcelas consistieron en 4 surcos de 6 metros de largo y 0.52 metros entre surcos. Las semillas se inocularon previo a la siembra. Las malezas fueron controladas a la siembra químicamente y durante el cultivo a manualmente. Se realizaron controles químicos de plagas y enfermedades según recomendaciones.

Recolección de tejidos

Se muestrearon las vainas de diez plantas consecutivas, de los dos surcos centrales, tres veces por semana desde R5 (comienzo de llenado de granos) a R8 (madurez de cosecha) (Fehr y Caviness, 1977). En total se realizaron entre 8 – 10 muestreos por unidad experimental. Debido a que las semillas de soja de diferentes posiciones del tallo principal difieren en tamaño y estadio fenológico, se muestrearon todas las vainas de los nudos centrales en cada momento de muestreo (Escalante y Wilcox, 1993; Poeta et al., 2014). Después de muestrear, las vainas fueron inmediatamente guardadas en bolsas plásticas herméticas y almacenadas en hielo para ser transportadas al laboratorio.

Cada muestra de vainas se dividieron en dos submuestras: la primer submuestra de semillas fue separada de los carpelos en cámara húmeda para evitar deshidratación. Ésta submuestra fue también usada para determinar el peso y los componentes químicos de la semilla. La segunda submuestra fue separada de los carpelos a temperatura ambiente e inmediatamente congelada en nitrógeno líquido hasta ser utilizada en las extracciones de

ARN para llevar a cabo los experimentos de expresión. Cada muestra se compuso de 15 a 30 semillas por fecha de siembra.

Determinación de caracteres relacionados al desarrollo de la semilla y a la acumulación de reservas.

El peso fresco de la semilla se estimó a través del pesaje en fresco de la primer submuestra. El peso seco de la semilla (PSS; mg semilla⁻¹) se determinó luego de secar la muestra a 65°C por 96 horas. La concentración de agua de las semillas (CAS; mg agua mg peso fresco⁻¹) se calculó como la diferencia entre el peso fresco menos el peso seco dividido el peso fresco multiplicado por 100.

La concentración de proteína (g proteína kg⁻¹ tejido x100) se determinó como la concentración de N multiplicado por 6.25 a través del uso del método Kjeldahl en una submuestra de 0.1 g (AOAC Method 988.05, 1990). La concentración de aceite (g kg⁻¹; g aceite kg⁻¹ tejido x100) se determinó gravimétricamente después de la extracción con éter de petróleo en una muestra de 0.15 gramos. Los contenidos de proteína y aceite (mg de proteína/ aceite semilla⁻¹) se estimaron como el producto entre el peso individual de la semilla y la concentración del componente. El contenido de residual (mg residual semilla⁻¹) se calculó como la diferencia entre el peso total de la semilla y el contenido de proteína más el contenido de aceite (Hanson et al., 1961). La concentración y el contenido de los componentes se expresaron en base seca.

La variación en la concentración de agua de la semilla (CAS) durante el desarrollo se modeló a través de una ecuación cuadrática desde R5 a R8:

$$y = a + b * x^2 \quad [4]$$

donde y es la CAS (mg mg⁻¹ x 100), a es la ordenada al origen (concentración de agua en R5), b es la tasa de desecación, y x son los días después de R5. El término lineal en la ecuación cuadrática se consideró cero para un mejor modelado de la caída de la concentración hídrica, asumiendo la máxima CAS en R5. (días después de R5=0).

La tasa y la duración de la acumulación del peso seco de la semilla (PSS) y del contenido de cada componente (proteína, aceite y residual) se modelaron usando una función bilineal con plateau (Gambín et al., 2006; Rotundo et al., 2011).

$$\text{PSS o contenido (mg semilla}^{-1}\text{)} = a + b x \text{ para } x < c \text{ (función lineal)} \quad [5]$$

$$\text{PSS o contenido (mg semilla}^{-1}\text{)} = a + bc \text{ para } x > c \text{ (función plateau)}$$

donde x son los días después de R5 (días), a es la ordenada al origen (mg semilla^{-1}), b es la tasa lineal de acumulación del peso seco o del contenido del componente ($\text{mg semilla}^{-1} \text{ día}^{-1}$), y c es x cuando el peso seco o el contenido del componente es máximo. La duración de la acumulación del peso seco de la semilla o de cada componente (días) se calculó como $c - (a/b)$.

Análisis de qPCR en tiempo real (RT-PCR)

Debido a que los estadios de desarrollo de las semillas de los genotipos evaluados podrían diferir en términos de días calendarios, la CAS se usó para normalizar el desarrollo de las semillas (ej. Swank et al., 1987; Borrás y Westgate, 2006; Poeta et al., 2014). Submuestras con $\sim 70 \text{ mg mg}^{-1} \times 100$ de CAS (equivalente al 50% de la duración del llenado de granos independientemente del genotipos y del año) se usaron en los experimentos de expresión. Estas submuestras se seleccionaron *post-facto* después de analizar el desarrollo de las semillas de cada genotipo y año.

El ARN total de las semillas se extrajo usando “SV Total RNA System Kit” (Promega Corporation) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó por espectrofotometría y la integridad se verificó a través de un gel de electroforesis de 1.5% agarosa. El ARN fue almacenado a -80°C . La transcripción reversa se llevó a cabo usando $1.5 \mu\text{g}$ del ARN total con el “iScript™ cDNA synthesis kit” para RT-PCR (BIO-RAD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se diluyó en una concentración final de $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ en agua libre de nucleasas.

Las secuencias de los genes ACC, AAP, DGAT, FPC, TSAC, ADPGP y β -tubulina fueron buscadas en la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnological Information). Los cebadores se diseñaron usando los programas Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000) y Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Para determinar las propiedades de los pares de cebadores, tales como contenido de G/C (guanina/citosina), extensiones de polipirimidinas (T, C) o polipurinas (A, G) temperatura de fusión, compatibilidad cebador-cebador y dímeros de cebadores, se utilizó el programa Oligo Analyzer 1.1.2.. Los pares de cebadores se detallan en la tabla IV.1.

Tabla IV.1.: Cebadores utilizados para qPCR-RT.

Gen de interés	Símbolo	Producto de la función del gen	Accesión	Secuencia de los cebadores (5' - 3')
Gen Acetil-CoA Carboxilasa	ACC	Síntesis de ácidos grasos (ej. Ohlrogge y Jaworski, 1997).	AF163149.1	Fwd ACGAGGAAGAGTTGGCAATG Rev CGTTCACCCTGTTAGCGAGT
Gen Diacilglicerol aciltransferasa	DGAT	Síntesis de triacilglicerolos (ej. Settlage et al., 1998).	AY652765.1	Fwd CCATGCTTAAGGCGTGGTAT Rev ACAGCAGAAACCAGGAATGC
Gen transportador de aminoácidos	AAP	Absorción transporte de aminoácidos (ej. Okumoto et al., 2002).	AY029352	Fwd GCCCTTATTTGCATTTGTGG Rev GCGGTGACAAAATTGCTCTT
Gen transportador de sacarosa	TSAC	Transporte de sacarosa (ej. Rosche et al., 2002).	XM_006589399.1	Fwd GACAGTAGGGGAAGGGAAGG Rev AGTTCAACATCAGCCCCAAC
Gen ADP-glucosa pirofosforilasa	ADPGP	Síntesis de almidón (ej. Weber et al., 1995).	BG370154.1	Fwd ACCGCTGGGAGAGTTTATCAAGGC Rev ACAGCGGTGATTGCTCATAGCCG
Gen fosfoenol piruvato carboxilasa	FPC	Síntesis de esqueletos carbonados (ej. Turpin y Weger, 1990).	AB097087.1	Fwd GTGAATATGCCCTGGTTTG Rev CCAGCAGCAATACCCTTCAT
Gen β -Tubulina	β -Tubulina	Subunidad proteica de microtúbulos (ej. Ludueña, 1997).	M21296.1	Fwd TGCCAGTCCAACCTTTTCAT Rev CACTGAGCTATGGACCCAAGT

Los análisis de qPCR se llevaron a cabo usando el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen®). La reacción contiene “1 x SYBR green PCR Master Mix” (Mezcla Real®, Biodynamics, Argentina), 0.6 μ M de cebadores sentido y anti-sentido y 3 μ L de ADNc en un volumen final de 15 μ L. Se incluyeron también controles negativos. Las condiciones de cada ciclo de amplificación fueron 15 s a 94 °C para la desnaturalización, 30 s a 60 °C para la hibridación, y 20 s a 72 °C para la elongación. La identidad del gen se confirmó a través de un gel de electroforesis en 2.5% agarosa y de cada curva de disociación de las muestras de ADNc analizadas (Bustin et al., 2010). La metodología y calidad de las muestras de ARN están detalladas en el apéndice V. Cada amplificación de qPCR se llevó a cabo por triplicado. La determinación del ciclo umbral (Cq) y la eficiencia (E) para cada amplicón se obtuvo utilizando el programa “Comparative Quantitation” provisto por Corbett Research para el termociclador Rotor Gene. Como gen de referencia se utilizó β -tubulina (el Cq de la tubulina presentó una desviación estándar de 1.3 bajo todas las condiciones). Este gen se utilizó en varias ocasiones como gen de referencia en experimentos de qPCR y se comportó como estable (Wang et al., 2006, 2007). Los niveles de los transcritos de los genes

evaluados se normalizaron en contra del gen de referencia en la misma muestra de ARNm (Bennett et al., 2015). Las expresiones normalizadas se calcularon para cada gen de acuerdo con la fórmula de Simon (2003). Los valores de expresión relativa se calcularon para cada genotipo independientemente y se expresaron respecto al menor valor de la expresión normalizada.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño de éste experimento es el mismo que el descrito en la sección Materiales y Métodos del el Capítulo II. El experimento consistió en dos años, y presentó un diseño en bloques completos aleatorizados con cuatro repeticiones. El desarrollo de la semilla y la acumulación de las reservas se evaluó en cuatro repeticiones (n=8). La expresión génica se analizó en tres réplicas de campo durante dos años (n=6). Cada réplica de campo tuvo tres réplicas de laboratorio en los análisis de expresión. Las variables se testearon usando un análisis de la varianza (ANOVA) que incluyó año, bloque anidado en año y genotipo (Comercial, AP-Semilla grande, AP-Semilla pequeña) como factores principales. Los análisis se llevaron a cabo usando un modelo lineal generalizado del paquete estadístico SAS (“SAS Institute,” 1999). Se consideraron diferencias significativas con un nivel de probabilidad del 0.05. Comparaciones múltiples entre medias se llevaron a cabo usando la metodología de diferencia mínima significativa de Fisher (DMS) y fueron corregidas por el método de Bonferroni (Bonferroni, 1936).

La estabilidad de la expresión del gen de referencia β -Tubulina se evaluó a través del coeficiente de variación (CV) y con ANOVA. La normalidad de los datos se examinó a través del test de Shapiro–Wilk (W). La homogeneidad de varianza se evaluó a partir de la relación entre los residuos estudentizados y los predichos. No se necesitó transformar ninguna variable.

RESULTADOS

Crecimiento de la semilla y normalización del desarrollo

Los genotipos presentaron diferente tasa y duración de acumulación del peso seco de la semilla (Fig. IV.1. a-c). El genotipo AP-Semilla pequeña presentó la menor tasa de llenado en comparación con los otros dos genotipos ($P < 0.05$); la cual fue $2.4 \text{ mg semilla}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para AP-Semilla pequeña, $6.0 \text{ mg semilla}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para el genotipo AP-Semilla grande, y $3.5 \text{ mg semilla}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para el Comercial. La duración del llenado fue la menor en el genotipo AP-Semilla pequeña en comparación con los otros dos genotipos ($P < 0.05$). El período de llenado efectivo fue 26 días, 40 días, y 42 días para AP-Semilla pequeña, AP-Semilla grande y el Comercial, respectivamente.

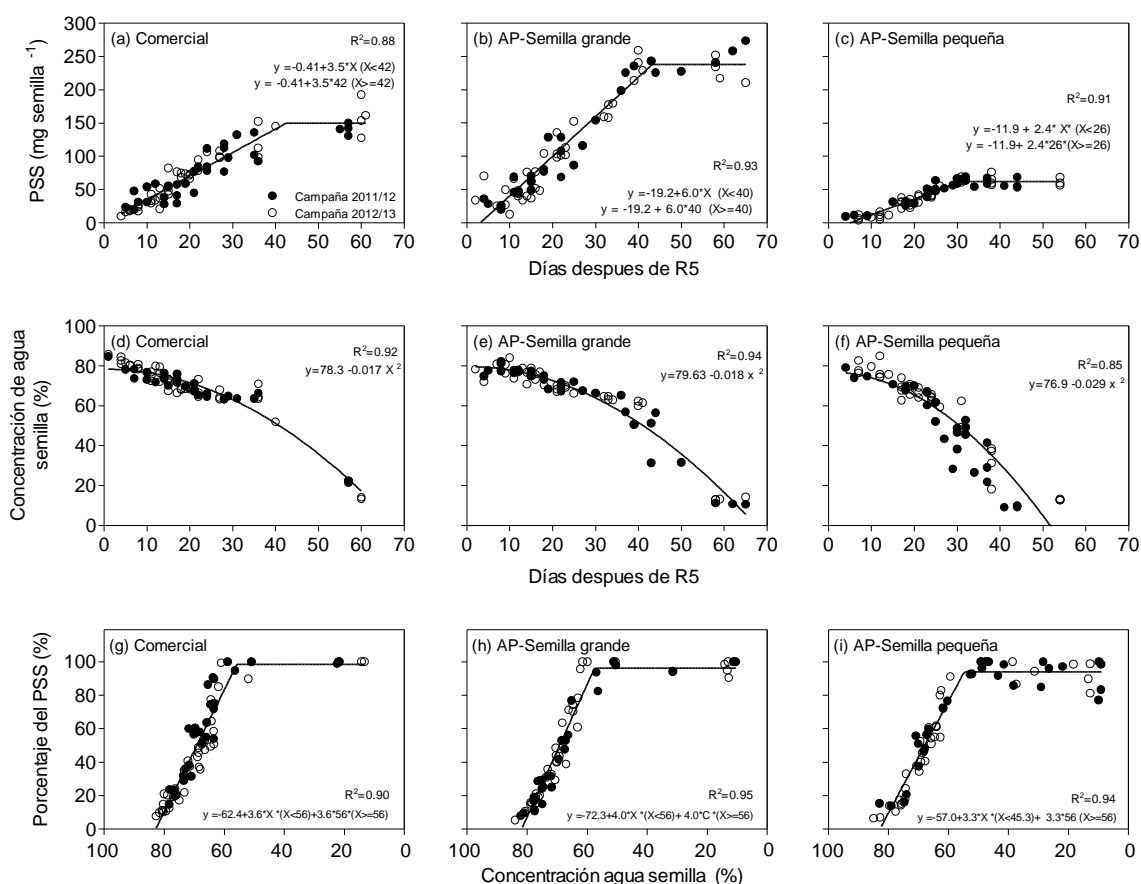


Fig. IV.1. Relación entre el peso seco de los granos y los días (a-c), la concentración de agua y los días (d-f), y el peso seco relativo de las semillas y la humedad del grano (g-i) para un genotipo Comercial, y dos genotipos con diferente estrategia para generar alta concentración de proteína (AP-Semilla grande, AP-Semilla pequeña) evaluados en dos campañas agrícolas (2011/12 y 2012/13)

La tasa de desecación de los granos difirió entre los genotipos (Fig. IV1, d-f). El genotipo AP-Semilla pequeña presentó la tasa más rápida de pérdida de humedad (-0.029 %CAS día⁻¹ x100) en comparación con los otros genotipos ($P < 0.05$); el AP-Semilla grande y el comercial no fueron significativamente diferentes entre ellos (promedio -0.018 %CAS día⁻¹ x100).

A pesar de los patrones contrastantes de crecimiento de la semilla y de la dinámica de pérdida de humedad, fue posible normalizar el desarrollo de la semilla entre genotipos muy disimiles (Fig. IV1, g-i). El parámetro c de la ecuación [5] (CAS en madurez fisiológica) fue 56 % CAS y no difirió entre los genotipos evaluados ($P > 0.05$). Además, no hubo diferencias significativas en la tasa de incremento del peso del grano (porcentaje del PSS final) entre los genotipos ($P > 0.05$).

Características del desarrollo relacionadas a la acumulación de cada constituyente de la semilla

Los principales constituyentes químicos de los granos pueden ser analizados independientemente en términos de tasa y duración de la acumulación (Poeta et al, 2014). Las diferencias en el contenido de proteína (mg semilla⁻¹) a madurez estuvieron linealmente muy relacionadas con la tasa de acumulación de los genotipos pero no con la duración ($R^2 = 0.87$, $P < 0.05$) (Fig. IV.2a). No hubo relación entre la tasa de acumulación y la concentración de proteínas ($P > 0.05$, Fig. IV. 2a); el genotipo AP-Semilla grande mostró la mayor tasa de acumulación de proteína (~ 2.65 mg día⁻¹), mientras que los genotipos AP-Semilla pequeña y Comercial tuvieron la menor tasa (~ 1 mg día⁻¹) y no difirieron estadísticamente ($P > 0.05$). Como se esperaba de los análisis de crecimiento de la semilla, los genotipos AP-Semilla grande y Comercial tuvieron el período más largo de acumulación de proteína (36 y 39 días, respectivamente) comparado con los AP-Semilla pequeña (26 días; $P < 0.05$).

El contenido de aceite de la semilla también estuvo positivamente asociado con la tasa de acumulación de aceite ($R^2 = 0.85$, $P < 0.05$) y no con el período de acumulación (Fig. IV.2b). La tasa de acumulación de aceite no se correlacionó con la concentración de proteína del grano; las estrategias AP-Semilla grande y Comercial presentaron la tasa de acumulación de aceite más rápida (1.13 y 1.29 mg aceite día⁻¹, respectivamente) en comparación con la estrategia AP-Semilla pequeña (0.46 mg aceite día⁻¹) ($P < 0.05$, Fig. IV. 2b).

La variación en el contenido de residual a madurez a través de los genotipos y los años estuvo linealmente relacionada ($R^2 = 0.71$, $p < 0.0001$) con la tasa (Fig. IV.2c). La duración, sin embargo, no explicó ninguna diferencia en el contenido de residual ($P > 0.05$). No hubo asociación entre la tasa de acumulación de residual y la concentración proteica del

grano; el genotipo comercial tuvo un valor intermedio de 1.96 mg residual día⁻¹, mientras que los genotipos AP-Semilla pequeña y grande presentaron 1.01 y 2.86 mg residual día⁻¹, respectivamente (Fig. IV.2c, P<0.05).

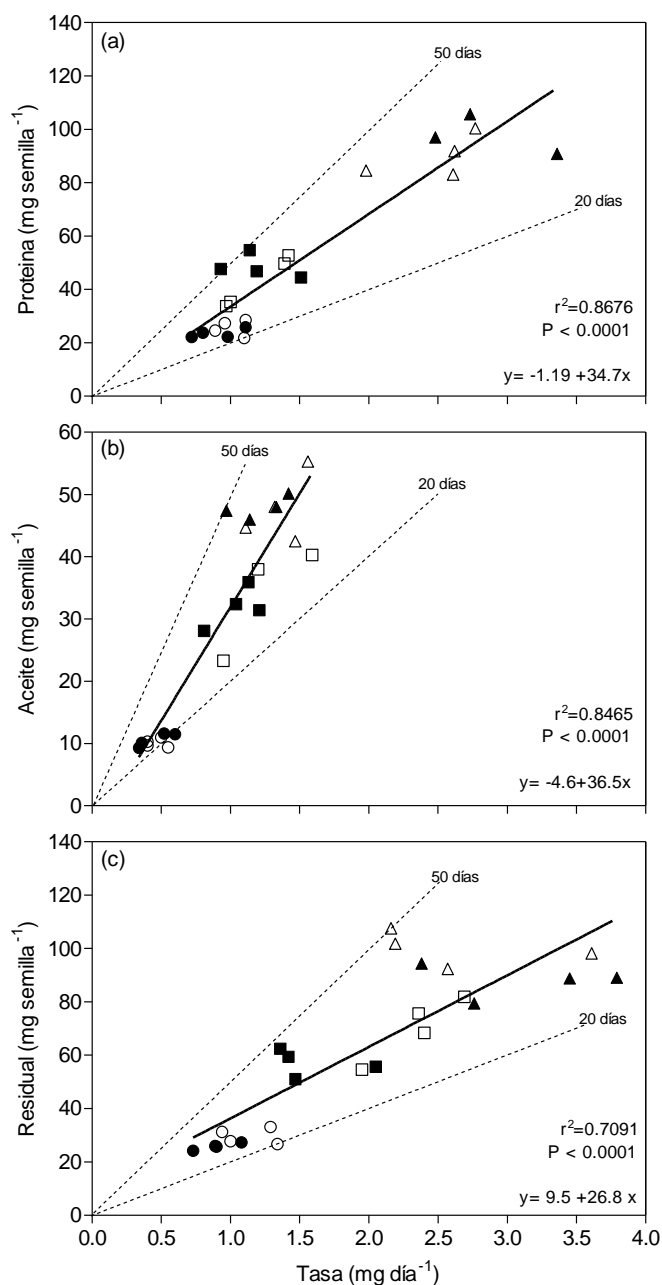


Fig. IV.2. Relación entre los contenidos de (a) proteína, (b) aceite, y (c) residual de la semilla y las tasas de acumulación de cada componente para un genotipo Comercial, y dos genotipos que expresan estrategias fisiológicas contrastantes para lograr alta concentración proteica (AP-Semilla grande y AP-Semilla pequeña) evaluados en dos campañas agrícolas (2011/12 y 2012/13). Los símbolos coloreados en negro son datos del año 2011/12, los símbolos color blanco son datos del año 2012/13. Los cuadrados refieren al genotipo Comercial; los triángulos refieren al genotipo AP-Semilla grande; y los círculos al genotipo

AP-Semilla pequeña. Las líneas punteadas representan duraciones iguales para la acumulación de los distintos componentes.

Niveles transcripcionales de los genes evaluados

Los niveles de expresión de los genes se evaluaron a través de qPCR usando como gen de referencia β -Tubulina. La estabilidad en la expresión se confirmó a través de un bajo coeficiente de variación (CV=4.8) y de diferencias no significativas entre las muestras resultantes de un ANOVA ($P>0.05$).

La expresión relativa de los genes involucrados en la acumulación de reservas fue comparada entre los genotipos que expresaban estrategias diferentes para incrementar la concentración proteica. Los niveles de expresión de los genes AAP, DGAT y FPC presentaron una interacción significativa año x estrategia. Sin embargo, esta interacción explicó una baja proporción de la variación total en los niveles de los transcritos en AAP y DGAT (11% y 7% de la suma de cuadrados, respectivamente), y 38% en los niveles de FPC. En el apéndice VI se detallan las interacciones. Debido a esta relativa baja variación explicada por la interacción entre los niveles de expresión y año, y para simplificar la explicación de los resultados, es que nos focalizamos en el efecto principal de la estrategia.

La expresión relativa de los genes AAP, FPC, DGAT y ACC mostró un comportamiento similar en el estado de desarrollo evaluado (700 g kg^{-1}), con una expresión relativa reducida en el genotipo AP-Semilla pequeña en comparación con los otros genotipos (Fig. IV. 3a-b-c-d). La mayor diferencia en expresión se observó en el gen AAP, en el cual los genotipos AP-Semilla grande y Comercial tuvieron cuatro veces mayor expresión que AP-Semilla pequeña (Fig. IV.3a). Los niveles de los transcritos en el gen FPC fueron 2.6 veces mayores en AP-Semilla grande y Comerciales en comparación con el genotipo AP-Semilla pequeña (Fig.IV.3b). Los niveles de expresión de los genes DGAT y ACC fueron dos veces mayores cuando se comparan los genotipos AP-Semilla grande y pequeña (Fig. IV.3c-d).

Contrariamente, los niveles de los transcritos en ADPGP fueron mayores en AP-Semilla pequeña y menores en Comercial (Fig. 3.e.); el cultivar Comercial no presentó diferencias en los niveles de expresión de ADPGP con respecto a AP-Semilla grande ($P>0.05$). Los niveles de expresión de TSAC no fueron significativamente diferentes para ninguno de los genotipos evaluados (Fig. IV.3f)

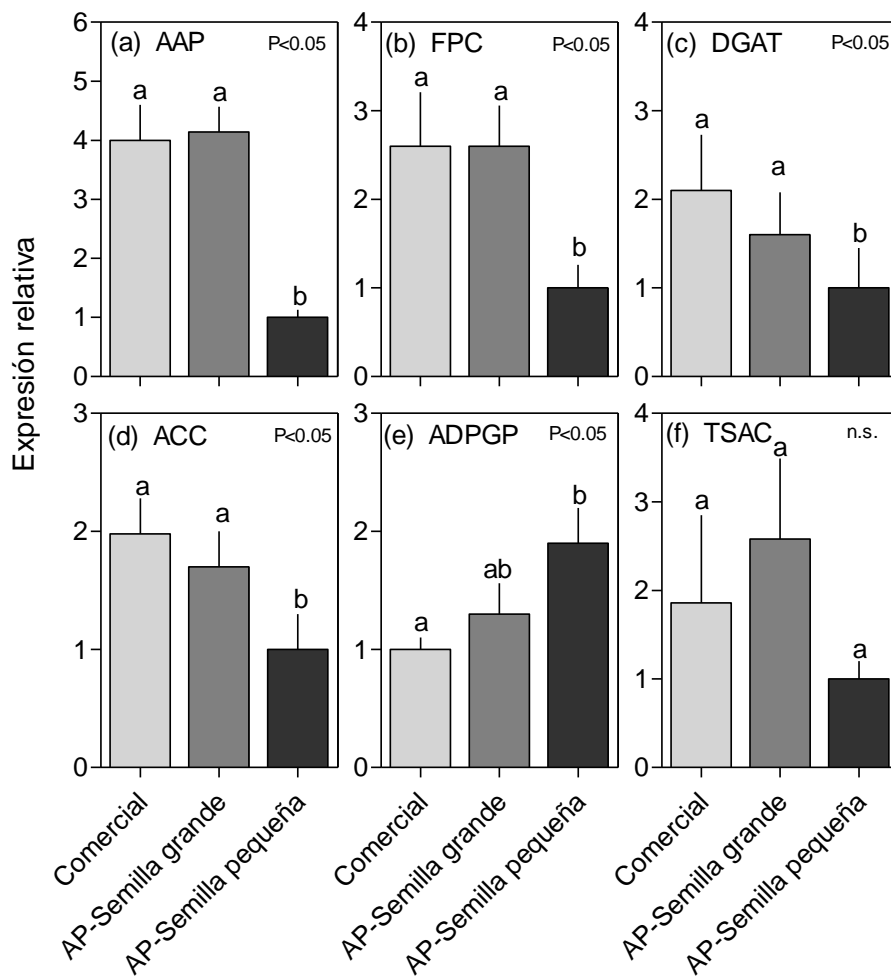


Fig. IV.3.: Expresión relativa de los genes aminoácido permeasa (AAP), fosfoenol piruvato carboxilasa (FPC), transportador de sacarosa (TSAC), ADP-glucosa pirofosforilasa (ADPGP), acetil-CoA carboxilasa (ACC) y diacilglicerol acil transferasa (DGAT) para un genotipo Comercial, y dos genotipos con estrategia contrastante para generar alta concentración de proteína de las semillas (AP-Semilla grande y AP-Semilla pequeña) evaluados en dos campañas agrícolas (2011/12 y 2012/13) en un mismo estado del desarrollo (700 g kg^{-1} humedad). Medias con diferente letra son significativamente diferentes con un nivel de probabilidad del 0.05 (Test de comparaciones múltiples de Fisher corregido por el método de Bonferroni). Barras verticales indican el EE de la media.

DISCUSION

En este capítulo presentamos los resultados de un experimento tendiente a entender el desarrollo de la semilla, la acumulación de reservas, y la expresión de genes de algunas enzimas clave, en genotipos de soja con diferente composición de la semilla. Estos genotipos se evaluaron en ensayos de campo replicados, bajo condiciones de manejo agronómico convencionales, y en dos años diferentes. Los resultados de este experimento avalan el concepto de que una alta concentración de proteína en las semillas de soja puede impactar de manera diferencial sobre el desarrollo de la semilla y sobre la expresión de los genes, dependiendo de la estrategia fisiológica que esté rigiendo éste carácter. Muchos trabajos han estudiado aspectos moleculares (ej. Golombek et al., 2001; Miranda et al., 2001; Rolletschek et al., 2004; Götz et al., 2007) y procesos del desarrollo en la semilla (ej. Rotundo et al., 2011; Poeta et al., 2014) que están involucrados en la deposición de proteína en las semillas de leguminosas; sin embargo ninguno de éstos ha considerado las estrategias fisiológicas propuestas en el capítulo II (Poeta et al., 2016) y evaluadas en éste capítulo. El entendimiento de los procesos involucrados en la acumulación de las principales reservas del grano durante el desarrollo de la semilla y de los genes (asociados a la acumulación de proteína y aceite) que intervienen en estos procesos es crítico para identificar objetivos específicos para el mejoramiento de la calidad de las semillas.

Como fuera reportado en otros trabajos, el incremento en la concentración de proteína podría lograrse por aumentos más que proporcionales en el contenido de proteína (mg semilla^{-1}) o por reducciones más que proporcionales en los contenidos de los otros componentes de la semilla (Rotundo y Westgate, 2009; Ishii et al., 2010). Cambios en los contenidos de los componentes de la semilla han sido determinados por diferentes combinaciones de tasa y duración de su acumulación (Munier-Jolain et al., 1998; Egli y Bruening, 2007; Rotundo y Westgate, 2009). Los resultados de este capítulo muestran que patrones de desarrollo contrastantes relacionados a la tasa y duración de la deposición de las reservas emergen de las estrategias evaluadas. Estos resultados están en línea con la idea de que la acumulación de los diferentes constituyentes químicos de la semilla están controlados de manera independiente (Jenner et al., 1991; Poeta et al., 2014). Por ejemplo, el genotipo AP-Semilla grande (asociado a incremento en la concentración de proteína por un mayor contenido de proteína *per se*) exhibió la mayor tasa y duración de acumulación de todos los constituyentes. Éstos resultados están en línea con Rotundo y Westgate (2009) y Rotundo et al. (2011) en los cuales se comparan cultivares comerciales en contra de un set de genotipos AP-Semilla grande. El genotipo AP-Semilla pequeña (asociado a incrementos en la concentración de proteína basados en reducciones en los contenidos de aceite/carbohidratos) mostró un patrón opuesto; presentó la menor tasa y duración del

llenado de todos los componentes. El genotipo Comercial, fue similar a AP-Semilla pequeña en la acumulación de proteína, pero fue más parecido a AP-Semilla grande en la tasa y acumulación de aceite. Esto es un claro indicio de que los procesos del desarrollo de la semilla que determinan la composición no están asociados a la concentración de proteína *per se*, como fue previamente sugerido (Sinclair y De Wit 1975; Salado-Navarro et al., 1985). En este sentido, un mejor entendimiento de los procesos de desarrollo que determinan la composición de la semilla requiere que se reconozcan estas estrategias fisiológicas contrastantes en término de tamaño de grano para alcanzar alta concentración de proteína en los granos.

El uso de la pérdida de humedad de los granos como marco teórico hizo posible normalizar el desarrollo de las semillas en genotipos con diferencias contrastantes en composición y tamaño de la semilla. Se ha demostrado que este tipo de procedimientos es adecuado en diferentes genotipos, ambientes y especies (Swank et al., 1987; Calderini et al., 2000; Borrás y Westgate, 2006). Aquí proponemos que éste paso es crítico para comparar correctamente los niveles de expresión durante el desarrollo de la semilla. El uso de días calendarios en lugar de la concentración de humedad de las semillas para referirse al desarrollo de la semilla hubiera sido erróneo para comparar los genotipos, debido a que difieren en la duración final del ciclo.

Cuando se compara la expresión relativa de genes, en semillas con $70 \text{ mg mg}^{-1} \times 100$ de humedad (lo que equivale a 50% del peso final de los granos en todos los genotipos), se descubre que es posible tener el mismo nivel de concentración de proteína en genotipos que tienen patrones contrastantes de expresión génica. Específicamente, encontramos niveles elevados de transcritos de algunos genes involucrados directamente (AAP) o indirectamente (FPC) en la síntesis de proteína en genotipos con alta concentración de proteína y granos grandes. Por otro lado, encontramos que la alta concentración de proteína en el genotipo AP-Semilla pequeña estuvo relacionado con un bajo nivel de expresión de genes involucrados en la síntesis de aceite (DGAT y ACC). Éstos resultados concuerdan con los de Lardizabal et al. (2008) y Roesler et al. (1997) en los cuales altos contenidos de aceite fueron logrados por la sobreexpresión de DAGT o ACC respectivamente. Para entender mejor los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de acumulación de reservas en los granos es necesaria más información sobre las regulaciones post-transcripcionales y post-trasduccionales (Hills, 2004).

En base a estudios previos de sobreexpresión de los genes FPC (Rolletschek et al., 2004; Radchuk et al., 2007), TSAC (Rosche et al., 2002), y AAP (Miranda et al., 2001; Rolletschek et al., 2005) en leguminosas, se esperaba una mayor expresión de alguno de éstos genes en la estrategia AP-Semilla grande en comparación con el genotipo Comercial. Sin embargo, esta expectativa se basa en el preconcepto de que la composición de los

granos es determinada por el embrión. Evidencias recientes en soja muestran que hay un fuerte control de la planta madre en la expresión de alta concentración de proteína en las semillas cuando ésta es determinada por la estrategia AP-Semilla grande (Rotundo et al., 2009, 2011). Este control materno ocurre cuando los asimilados (sacarosa y aminoácidos) alcanzan el apoplasto de la semilla (Hanson, 1986, 1991). En efecto, los genotipos comerciales que tienen concentración de proteína estándar pueden ser “convertidos” en genotipos alta proteína a través del incremento en la cantidad de asimilados vía tratamientos manipulativos de desvainado (Rotundo et al., 2009, 2011). Debido a que no hubo diferencias en expresión entre el genotipo AP-Semilla grande y el cultivar Comercial, una posible explicación podría ser que para estas estrategias el suministro de asimilados a los granos fue la característica importante, y no el nivel de expresión de los genes bajo estudio.

CONCLUSIÓN

Este trabajo provee un enfoque novedoso para estudiar la concentración de proteína, enfatizando (i) la importancia de analizar la acumulación de los constituyentes químicos del grano de manera independiente durante el llenado, (ii) la existencia de dos estrategias fisiológicas para lograr alta concentración de proteína, (iii) el uso de la humedad del grano para normalizar el desarrollo de la semilla en experimentos de expresión génica, y (iv) el concepto de que alta concentración proteica puede ser lograda a través de diferentes patrones de expresión de algunos genes asociados a la acumulación de reserva. El paso siguiente incluye una caracterización de una mayor cantidad de genes y genotipos de modo de poder extrapolar estos resultados a otros cultivares.

CAPÍTULO V

DESARROLLO DE POBLACIONES SEGREGANTES DE ALTA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA A PARTIR DE PARENTALES DE SOJA CON ESTRATEGIAS FISIOLÓGICAS CONTRASTANTES

INTRODUCCIÓN

Los cultivares de soja más difundidos en Argentina se caracterizan por presentar alto rendimiento y alta concentración de aceite pero baja concentración de proteínas (Cuniberti y Herrero, 2006). Debido a esto, existe gran interés por el desarrollo de líneas con alta proteína y alto rendimiento. A pesar de que la selección por alta concentración proteica en soja es factible (Cober y Voldeng 2000, Orf et al. 2004), los incrementos están asociados con bajo rendimiento (Hartwig y Hinson 1972; Brim y Burton 1979; Helms y Orf 1998). La respuesta a la selección para estos caracteres dependerá en gran medida de su heredabilidad y del grado de correlación que exista entre estos. El carácter concentración de proteína de las semillas es altamente heredable (H^2 : 0.80; Burton, 1985), mientras que el rendimiento en grano tiene una heredabilidad menor (H^2 : 0.40; Burton, 1987). Por otro lado, ambos caracteres son muy afectados por el ambiente y por las condiciones de manejo (Medic et al., 2014). Por lo tanto, entender los mecanismos genéticos y fisiológicos que están involucrados en la correlación negativa entre ambos caracteres es clave para tener éxito en el proceso de mejora.

Numerosos estudios se llevaron a cabo con el fin de entender mejor las bases genéticas que determinan la concentración de proteínas y el rendimiento. Algunos, sugieren que la correlación negativa entre rendimiento y proteína podría deberse a ligamientos genéticos o a efectos pleiotrópicos (Nichols et al., 2006). En trigo, varios autores señalan que sería poco probable que dicha correlación esté regida por efectos pleiotrópicos. Si esto fuera así, no sería posible mejorar ambos caracteres a través de hibridación y selección deliberada (Middlenton et al., 1954; Stuber et al., 1962). En soja, se ha intentado eliminar o disminuir las correlaciones debidas a ligamientos vía recombinación, sin embargo, los resultados han sido inconsistentes. Por ejemplo, Cober y Voldeng (2000) lograron poblaciones con correlaciones negativas muy bajas o nulas entre rendimiento y proteína mientras que en otras no fue posible romper dicha correlación. Leffel y Rhodes (1993) usaron cruzamientos biparentales entre padres alta proteína seguido de selección de semilla

individual y lograron líneas con 446 a 545 g kg⁻¹ de proteína. Sin embargo, las líneas AP presentaron menor rendimiento y peor comportamiento cuando las condiciones ambientales eran favorables, en comparación con los genotipos comerciales.

Otros autores intentaron explicar las causas de esta correlación negativa desde el punto de vista bioenergético. Se basaron en que aumentar tanto la concentración de proteína como el rendimiento (más carbohidratos en los granos o más número de granos) requiere de una mayor disponibilidad de fotoasimilados o una mayor eficiencia en la utilización de los mismos (Sinclair y de Wit, 1975). Según estos autores, el mejoramiento de ambos caracteres simultáneamente conlleva a una competencia por esqueletos carbonados y por la energía derivada de los fotoasimilados requeridos tanto en la síntesis de proteínas como en la de carbohidratos (Sinclair y de Wit, 1975; Bhatia y Rabson, 1976). Sin embargo, otros afirman que, en general, los aumentos en el porcentaje de proteínas reducen la concentración de aceite de los granos (Wilson, 2004) cuyo costo energético es aún mayor que el de la síntesis proteica o de carbohidratos. Por lo tanto, el costo de producir una unidad de tejido de semilla con más proteína, en unidades glucosa, debería ser menor (Egli y Bruening, 2007). Debido a que los mecanismos que gobiernan dicha correlación negativa siguen sin ser esclarecidos, el desafío de los mejoradores radica en identificar la variabilidad genética adecuada y seleccionar genotipos con las combinaciones genéticas correctas.

El mejoramiento orientado al incremento de la concentración de proteína en grano se ha focalizado (consciente o inconscientemente) en la estrategia de aumento de contenido de proteína (AP-Semilla grande; Rotundo et al., 2009). En el capítulo II de ésta tesis, se sugirió que una alternativa a esta estrategia consiste en lograr alta concentración de proteína a través de reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y/o carbohidratos en semillas pequeñas. Los resultados mostraron que es necesario considerar el impacto diferencial del tamaño de la semilla sobre el funcionamiento del cultivo al momento de seleccionar donantes AP (Poeta et al., 2016). Por ejemplo, se propuso que la selección de un donante AP de grano pequeño sería, hipotéticamente, beneficioso, en relación a parentales con mayor tamaño de grano, debido a que los primeros producen mayor área foliar, mayor contenido de N vegetativo al comienzo de llenado de granos (mayor reservorio de N), mayor biomasa, mayor fijación de granos, y menor requerimiento de asimilados por semilla. Para testear esta hipótesis, en este capítulo se propone cuantificar la correlación existente entre rendimiento y porcentaje de proteína en poblaciones construidas a partir de padres que aumentan la concentración de proteína a partir de estrategias distintas.

Hipótesis específica

El grado de correlación negativa entre rendimiento y concentración de proteína de una población segregante derivada de la cruce entre un cultivar estándar de alto rendimiento y un donante de alta concentración de proteína depende de la estrategia que posee el donante de alta proteína

Objetivos específicos

Cuantificar la correlación existente entre rendimiento y porcentaje de proteína en poblaciones de líneas segregantes construidas a partir de padres de alta proteína generada a partir de estrategias distintas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron nueve genotipos de soja con diferente composición y peso de grano: tres cultivares alta proteína de semilla grande (AP-Semilla grande), tres cultivares alta proteína de semilla pequeña (AP-Semilla pequeña) y tres cultivares comerciales nacionales de alto rendimiento pero con tamaño de grano y concentración de proteína promedio. Un mayor detalle de las características de los genotipos se encuentra en la sección Materiales y Métodos en el capítulo II de esta tesis.

El esquema de generación de poblaciones consistió en cruzamientos biparentales entre un genotipo Comercial de alto rendimiento y, un donante alta proteína (AP-Semilla pequeña; y AP-Semilla grande). En la tabla V.1. se detallan los cruzamientos. Posteriormente, para avanzar las líneas hasta una generación F6 (semillas) se utilizó la metodología de descendiente de semilla individual (“single pod descend”) (Funada et al., 2013). Se recurrió a un avance generacional en contra estación.

Tabla V.1.: *Esquema de cruzamientos para la generación de seis poblaciones. Los parentales que se utilizaron fueron: tres genotipos Comerciales, con tamaño de grano y proteína promedio; tres genotipos AP-Semilla grande, con alta concentración de proteína debido a alto contenido de proteína; tres genotipos AP-Semilla pequeña, con alta concentración de proteínas por reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y carbohidratos. Se adjunta en la tabla el número de líneas F5 logradas y, cuyas semillas F6 se utilizaron en evaluaciones de rendimiento y concentración proteica.*

Población	Cruzamiento	Parental alto rendimiento	Parental alta proteína	Nº de líneas
1	Comercial x AP-Semilla pequeña	NK34	PI196177	106
2	Comercial x AP-Semilla grande	NK34	PI555396	128
3	Comercial x AP-Semilla pequeña	DM 3100	PI518757	129
4	Comercial x AP-Semilla grande	DM 3100	PI538376	89
5	Comercial x AP-Semilla pequeña	SPS 3X1	PI398970	93
6	Comercial x AP-Semilla grande	SPS 3X1	IA3011	97

Experimento de campo

Individuos F5 se sembraron durante la campaña 2015-2016 en el Campo Experimental Villarino, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, en Zavalla, Argentina. Las fechas de siembra fueron 24 de Noviembre y 28 de Diciembre. Las fechas de siembra fueron utilizadas como repetición ambiental para testear las diferencias genotípicas bajo condiciones ambientales que influyen en la concentración de proteínas (Medic et al., 2014). Debido a la cantidad de semillas limitada, las parcelas consistieron en 1 surco, de 3.5 metros de largo y el espacio entre surcos fue de 0.52 metros. La densidad de plantas a cosecha promedio fue de 25 plantas m⁻². Las semillas se inocularon con *Bradyrhizobium* previo a la siembra. Se realizaron controles químicos de plagas y enfermedades y malezas según recomendaciones.

Variables medidas

Los estadios reproductivos (Fehr y Caviness, 1977) se determinaron dos veces por semana sobre 2 metros lineales en cada parcela. Los estadios relevados fueron R1 (comienzo de floración), R5 (comienzo de llenado de granos) y, R7 (madurez fisiológica). En R8 (madurez comercial), se cosecharon a mano 2 metros y se trillaron con maquina estática. El período de llenado de granos efectivo (PLLG) fue determinado por los días transcurridos entre R5 y R7 (Egli et al., 1981).

El rendimiento en grano (peso de las semillas por unidad de área en R7) fue expresado en base seca. Los componentes numéricos del rendimiento se determinaron usando la muestra en R8. Se contaron y pesaron cien semillas para determinar el peso individual de las mismas. El número total de semillas fue calculado como la relación entre el rendimiento y el peso individual de la semilla.

La concentración de proteína fue estimada por medio de NIRS (Espectroscopia de infrarrojo cercano, Infratec 1241, Foss, Denmark) y expresada en base seca. El equipo de NIRS tiene ecuaciones de calibración desarrolladas por la Universidad Nacional de Rosario en cooperación con Foss Argentina. La calibración del NIR contempla genotipos de tegumento verde. El contenido o rendimiento de proteína (kg ha⁻¹) se calculó como el producto entre el rendimiento y la concentración de proteína.

Análisis estadístico

Para este experimento el diseño experimental consistió en un diseño en bloques completos aleatorizados con dos repeticiones. La información fue analizada usando un modelo lineal generalizado (GLM) con el programa SAS 9.1 (SAS Institute, 1999). El modelo incluyó bloque, tamaño de la semilla (AP-Semilla pequeña, AP- Semilla grande y Comercial), y

genotipo anidado dentro de la categoría “tamaño de semilla” como factores principales. Se consideraron diferencias significativas con un nivel de probabilidad del 5%. Las medias individuales fueron comparadas con una prueba de diferencia mínima significativa (DMS).

Para investigar la relación entre la concentración de proteína y el rendimiento se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para cada población.

La estimación de heredabilidad en sentido estricto (h^2) para cada una de las seis poblaciones se hizo a partir de los cuadrados medios resultantes de un análisis de la variancia (ANOVA) según Hallauer y Miranda Filho (1988):

$$h^2 = (\sigma_G^2) / (\sigma_G^2 + \sigma_E^2) \quad [6]$$

$$\sigma_G^2 = (CME - CMD) / R \quad [7]$$

donde σ_G^2 es la varianza genética, σ_E^2 es la varianza ambiental, CME es el cuadrado medio entre las líneas y equivale a la varianza fenotípica ($\sigma_E^2 + \sigma_G^2 + R$), CMD es el cuadrado medio dentro de la línea y equivale a la varianza ambiental, y R es el número de repeticiones. La heredabilidad en sentido estricto (h^2) pudo ser estimada por medio de la ecuación [6] debido a que las líneas evaluadas de cada población provienen de una población original F2 (donde la dominancia se considera ausente o muy pequeña ya que se trata de cruzamientos bi-parentales en plantas autógamias) por lo que se asume que las frecuencias Hardy-Weinberg son $p=q= \frac{1}{2}$. A su vez, la generación filiar evaluada (semillas F6) presenta un nivel de consanguinidad cercano a 1 ($F \sim 1$), por lo que $\sigma_G^2 = \sigma_A^2$ (varianza aditiva) (Hallauer y Miranda Filho ;1988).

RESULTADOS

En este capítulo evaluamos seis poblaciones construidas a partir de la cruce de genotipos de alto rendimiento (Comerciales), con donantes de alta concentración de proteína con diferente tamaño de semilla (AP-Semilla grande y AP-Semilla pequeña). Las seis poblaciones presentaron un amplio rango de variación en relación a la concentración de proteínas (g kg^{-1}), el rendimiento en grano (kg ha^{-1}) y, el rendimiento de proteína de los granos (kg ha^{-1}) (Fig. V.1.).

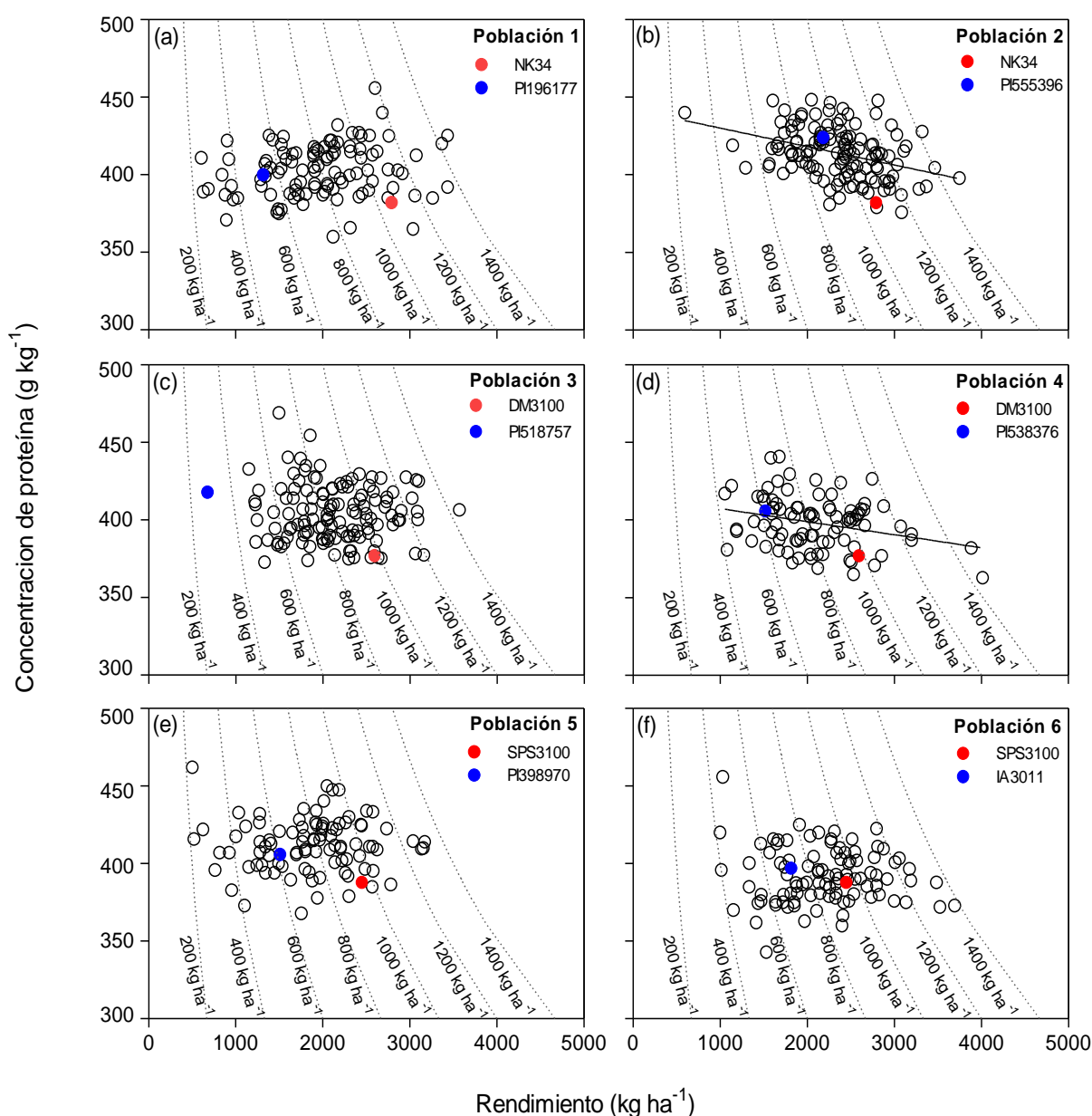


Fig.V.1: Concentración de proteína en función del rendimiento para líneas F5 correspondientes a cada una de las seis poblaciones evaluadas. Las líneas punteadas indican combinaciones de concentración de proteína y rendimiento para un mismo

rendimiento de proteína en las semillas a madurez. Poblaciones 1, 3 y 5 hacen referencia a la cruce de un parental Comercial con un parental de alta concentración de proteína y semilla pequeña; las poblaciones 2, 4 y 6 hacen referencia al cruzamiento de un parental Comercial y un parental alta proteína de semilla grande. Círculos rojos y azules refieren a los parentales de alto rendimiento y alta proteína respectivamente. Cada valor es un promedio de dos repeticiones.

La concentración de proteína varió desde 343 a 469 g kg⁻¹ (Fig.V.1.). Las poblaciones pertenecientes al cruzamiento Comercial x AP-Semilla grande presentaron menor concentración que las del cruzamiento Comercial x AP-Semilla pequeña (403 y 405 g kg⁻¹ respectivamente; P < 0.05; Tabla V.2.). Comercial x AP-Semilla grande presentó un 3% de líneas con significativamente más concentración proteica que el donante AP, y Comercial x AP-Semilla pequeña un 5%. Cuando se toman en consideración las poblaciones de manera individual, la concentración de proteína promedio fue 403, 414, 404, 398, 412 y 392 g kg⁻¹ para la población 1 a 6 respectivamente. La población 1 presentó 2% de líneas con significativamente mayor concentración de proteína que su parental AP; la población 3 un 1%; la población 4 un 2%; la población 5 un 13% y la población 6 un 7 %. La población 2, perteneciente al cruzamiento de un genotipo comercial por semilla grande, no presentó ninguna línea con mayor concentración proteica que su parental AP.

Tabla V.2.: Análisis de varianza para concentración de proteína, rendimiento en grano y rendimiento de N para las dos categorías de cruce y genotipos evaluados.

	GL	Concentración de proteína	Rendimiento en grano	Contenido de proteína
		(g kg ⁻¹)	(kg ha ⁻¹)	(kg ha ⁻¹)
Significancia estadística		Valor P (DMS)	Valor P (DMS)	Valor P (DMS)
Bloque	1	***	***	***
Tipo de cruce	1	** (2)	***(58)	***(23)
Genotipo (Tipo de cruce)	653	***(32)	***(1003)	***(406)

* Significativo al 0.05 nivel de probabilidad.

** Significativo al 0.01 nivel de probabilidad.

***Significativo al 0.001 nivel de probabilidad.

El rendimiento en grano presentó una variación de 3500 kg ha⁻¹ entre todas las poblaciones estudiadas. Cuando se comparan los dos tipos de cruzamientos, la cruza Comercial x AP-Semilla grande presentó 187 kg ha⁻¹ mayor rendimiento que Comercial x AP-Semilla pequeña (P < 0.001; Tabla V.2.). Únicamente el 1% de líneas presentó un rendimiento en grano significativamente mayor que su donante de alto rendimiento (P < 0.001; Tabla V.2.). Las líneas que más rindieron fueron las que cosecharon mayor cantidad de proteína (kg ha⁻¹) a madurez. Un total de seis líneas presentaron significativamente más contenido de proteína que su progenitor de alto rinde.

Sin embargo, de un total de 642 líneas evaluadas, ninguna línea presentó simultáneamente más rendimiento y más concentración de proteína que su donante alto rendimiento y alta proteína respectivamente.

Por otro lado, se calcularon los coeficientes de correlación entre el rendimiento en grano y la concentración de proteína a cosecha para cada una de las poblaciones evaluadas. Los resultados muestran que no hubo asociación entre la concentración de proteína y el rendimiento en cuatro de las seis poblaciones bajo estudio (P > 0.05; Tabla V.3.). De estas cuatro poblaciones, tres correspondieron a la cruza AP-Semilla pequeña. Las poblaciones 2 y 4 presentaron una correlación estadísticamente significativa y negativa entre ambos caracteres (P < 0.001 y P < 0.01 respectivamente; Tabla V.3.)

Tabla V.3.: Análisis de correlación de Pearson entre concentración de proteína y rendimiento para cada una de las seis poblaciones evaluadas.

Población	Cruzamiento	Parental alto rendimiento	Parental alta proteína	Coefficiente de Pearson	R ²	Valor P
1	Comercial x AP-Semilla pequeña	NK34	PI196177	0.1727	0.02980	n.s.
2	Comercial x AP-Semilla grande	NK34	PI555396	-0.3643	0.13270	***
3	Comercial x AP-Semilla pequeña	DM 3100	PI518757	-0.0559	0.00310	n.s.
4	Comercial x AP-Semilla grande	DM 3100	PI538376	-0.2834	0.08030	**
5	Comercial x AP-Semilla pequeña	SPS 3X1	PI398970	0.0044	0.00001	n.s.
6	Comercial x AP-Semilla grande	SPS 3X1	IA3011	-0.0625	0.00390	n.s.

* Significativo al 0.05 nivel de probabilidad.

** Significativo al 0.01 nivel de probabilidad.

***Significativo al 0.001 nivel de probabilidad.

La heredabilidad en sentido estricto promedio (h^2) para la concentración de proteína fue mayor para el cruzamiento Comercial x AP-Semilla pequeña (0.32 vs.0.28). La población 5 fue la que presentó la mayor h^2 (0.38), y la población 2 la menor (0.20) (Tabla V.4.).

Tabla V.4.: Estimación de la heredabilidad en sentido estricto (h^2) para rendimiento y concentración de proteína en las seis poblaciones de soja evaluadas. Las poblaciones 1, 3 y 5 pertenecen a la cruce Comercial x AP-Semilla pequeña; las poblaciones 2, 4 y 6 pertenecen a la cruce Comercial x AP-Semilla grande.

	Población 1	Población 2	Población 3	Población 4	Población 5	Población 6
h^2 concentración proteica	0.24	0.20	0.35	0.36	0.38	0.29
h^2 rendimiento	0.36	0.28	0.30	0.22	0.30	0.30

Para el carácter rendimiento, la h^2 promedio fue también mayor en las poblaciones del cruzamiento Comercial x AP-Semilla pequeña. La población 1 fue la que presentó mayor heredabilidad y la 4 la menor (0.36 y 0.22, respectivamente). Estos valores de h^2 son menores a otros previamente reportados (Burton, 1985).

DISCUSION

En este capítulo se evaluó la correlación existente entre rendimiento y porcentaje de proteína de las semillas de soja en poblaciones construidas a partir de padres que aumentan la concentración de proteína a partir de estrategias distintas (ej. semilla grande vs. semilla pequeña). Los resultados de este trabajo aportan evidencias a favor de la idea de que la inclusión de parentales AP con semillas pequeñas (AP-Semilla pequeña) a esquemas de mejoramiento tradicionales podría abrir la posibilidad de romper la correlación entre rinde y proteína. Muchos estudios han tenido como objetivo el mejoramiento simultáneo de la concentración proteica de las semillas y del rendimiento, sin embargo los resultados han sido inconsistentes. Por ejemplo Brim y Burton (1979) y Cober y Voldeng (2000) lograron disminuir el grado de correlación negativa entre proteína y rendimiento en algunas poblaciones, mientras que en otras no fue posible romper dicha correlación. Leffel y Rhodes (1993) lograron seleccionar líneas con alta concentración de proteína, pero éstas presentaron menor rendimiento y peor aptitud ante condiciones ambientales favorables en comparación con los genotipos comerciales. Por lo tanto, reconocer la existencia de diferentes estrategias (ej.: semillas grandes vs. semillas pequeñas) al momento de seleccionar por rinde y concentración proteica sería relevante para llevar a cabo una mejora genética más eficiente y rápida.

El ritmo de mejora o progreso genético de una población depende de la exactitud con la que se puedan identificar a los parentales superiores (Falconer y Mackay, 1996). A pesar de esto, muchos de los estudios tendientes a desarrollar cultivares de alta proteína y alto rendimiento se focalizaron en la evaluación de diferentes metodologías de mejora genética pero no hicieron hincapié en los criterios de selección de los parentales AP (Cober y Voldeng, 2000; Wilcox y Cavins, 1995; Brim y Burton, 1979; Xu y Wilcox, 1992). En general, estos trabajos han seleccionado indirectamente parentales con alta concentración y alto contenido de proteína en las semillas (AP-Semilla grande) y no han considerado la alternativa que fuera propuesta en el capítulo II (AP-Semilla pequeña) y testeada aquí. Los resultados muestran que la correlación entre rendimiento y concentración proteica fue nula (estadísticamente no significativa) cuando los donantes AP eran genotipos AP-Semilla pequeña (genotipos con alta concentración de proteína debido a reducciones más que proporcionales en aceite y carbohidratos). Sin embargo, cuando el donante era un genotipo AP-Semilla grande (genotipos con alta concentración de proteína por aumentos en el contenido de proteína *per se*) la correlación entre ambos caracteres fue estadísticamente significativa y negativa en dos de las tres poblaciones evaluadas. Algunos trabajos sugieren que la utilización de un gran número de parentales y de poblaciones más grandes es mejor al momento de mejorar caracteres de herencia cuantitativa (Ladejobi et al, 2016). Según

éstos resultados, sería más importante reconocer primero que estrategias fisiológicas son las que gobiernan el carácter de interés entre los parentales a utilizar.

Por otro lado, la respuesta a la selección está directamente relacionada con la heredabilidad del carácter que se quiere mejorar, por lo que es relevante su estimación (Falconer y Mackay 1996). En un estudio genético la función de la heredabilidad (h^2) radica en su rol predictivo, es decir cuan confiable es el valor fenotípico en la predicción del valor aditivo de un carácter. El valor fenotípico es el que puede medirse directamente, pero es el valor aditivo el que determina su influencia en la generación siguiente (Falconer y Mackay 1996). Debido a esto, el mejorador debería elegir parentales con alta h^2 para tener éxito en el cambio de alguna característica de una población. En este trabajo, la h^2 para la concentración de proteína y el rendimiento en las poblaciones pertenecientes al cruzamiento Comercial x AP-Semilla pequeña fue alta (~ 0.32) según la escala propuesta por Dabholkar (1992). En el caso de las poblaciones resultantes del cruzamiento Comercial x AP-Semilla grande la h^2 fue más baja para ambos caracteres (~ 0.28 proteína y ~ 0.26 rendimiento; Dabholkar, 1992). Estos valores de h^2 son menores a otros previamente reportados (Burton, 1985; Panthee, 2004; Cober y Voldeng, 2000). Sin embargo, estos autores en general refieren a estimaciones de heredabilidad en sentido amplio (H^2) las cuales en general son mayores que estimaciones de la heredabilidad en sentido estricto (h^2). Según estos resultados, la utilización de parentales AP con semilla pequeña podría generar una mayor respuesta a la selección para concentración de proteína de las semillas y rinde en comparación con la utilización de parentales con la estrategia opuesta (AP-Semilla grande). La h^2 es una propiedad del carácter, de la población y del ambiente bajo el cual el fenotipo del carácter fue medido, y su estimación variará según la magnitud de cada uno de los componentes de la varianza (Falconer y Mackay 1996). La variabilidad fenotípica de los caracteres evaluados en este capítulo (caracteres cuantitativos) tiene un componente ambiental relativamente grande en comparación con el componente genético correspondiente. Debido a esto entendemos que es necesario testear la consistencia de éstos resultados en un mayor número de ambientes y repeticiones.

CONCLUSIONES

Este trabajo se testeó un nuevo enfoque para estudiar la correlación negativa entre rendimiento y proteína haciendo hincapié en la existencia de dos estrategias fisiológicas para lograr alta concentración proteica (AP-Semilla grande y AP-Semilla pequeña).

En base a éstos resultados podemos concluir que el grado de correlación negativa entre rendimiento y concentración de proteína de una población derivada de la cruce entre un cultivar estándar de alto rendimiento y un donante de alta concentración de proteína dependería de la estrategia que posee el donante de alta proteína.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN GENERAL

Numerosos estudios se han llevado a cabo con el fin de dilucidar los mecanismos que rigen la composición de los granos y el rendimiento. Un aspecto hasta ahora ignorado en este tipo de trabajos es que aumentos en la concentración de proteína pueden lograrse a partir de dos estrategias fisiológicas contrastantes: **(1) AP-Semilla grande** basada en aumentos en contenido (mg semilla^{-1}) de proteína en la semilla manteniendo constante los contenidos de aceite y carbohidratos; **(2) AP-Semilla pequeña** que consiste en reducciones en los contenidos de aceite y/o carbohidratos manteniendo constante el contenido de proteína.

Estudios tendientes a investigar las bases fisiológicas que rigen el carácter concentración de proteína en los granos, y su relación con el crecimiento y el desarrollo del cultivo han evidenciado que la composición de la semilla tiene una gran influencia sobre el funcionamiento del cultivo (Egli., 1998). Sinclair y de Wit (1975, 1976) han hipotetizado que los altos requerimientos de nitrógeno de la semilla generan una senescencia acelerada debido a la removilización de nitrógeno foliar. Esta senescencia acelerada reduce el período de llenado de los granos, y repercute, en última instancia, negativamente sobre el rendimiento. Salado-Navarro et al., (1985) testeó ésta hipótesis en cultivares de soja que diferían en concentración de proteína y demostró que los genotipos con mayor concentración presentaban una senescencia foliar acelerada y un período de llenado más acotado. Un aspecto clave es que estos trabajos ignoraron la existencia de las diferentes estrategias determinantes de alta concentración de proteína. Por ejemplo, *¿se produce una senescencia foliar acelerada en cultivares de alta proteína determinada sólo por la estrategia AP-Semilla grande, o es algo común a ambas estrategias?* A pesar de que las investigaciones de Salado-Navarro et al. (1985) son consistentes con la hipótesis de Sinclair y de Wit (1975, 1976), otras no han encontrado relación entre la proteína de las semillas y N redistribuible durante el desarrollo de las semillas. Egli y Bruening (2007b) plantearon que altas concentraciones proteicas no reducen la tasa de crecimiento individual de las semillas de soja ni acortan el período de llenado *¿serán éstos resultados consistentes con las dos estrategias AP planteadas en ésta tesis?* En base a las experimentaciones llevadas a cabo en ésta tesis, encontramos que la selección por alta concentración de proteínas en la semilla impactaría de manera diferencial sobre el crecimiento y el desarrollo del cultivo dependiendo del mecanismo que esté rigiendo al carácter de interés. Los resultados del capítulo II muestran que los genotipos AP de semillas grandes se asociaron con un período de llenado de granos más largo, tasas de crecimiento de las semillas más aceleradas y mayor cantidad de asimilados disponibles por grano comparado con la otra estrategia AP. En cambio, la

estrategia AP-Semilla pequeña presentó mayor área foliar a comienzos de llenado, y una tasa de senescencia más acelerada (en relación a la pérdida de área foliar y del contenido de N por unidad de superficie), en comparación con la primera estrategia, y produjo el mismo rendimiento biológico que los genotipos comerciales.

Por otro lado, evidencias previas en trigo sugieren que seleccionar cultivares con mayor capacidad de almacenamiento de N en órganos no fotosintéticos, como los tallos, permitiría traslocar mayores cantidades de N hacia los granos sin reducir la capacidad fotosintética de la planta (Bertheloot et al., 2008). En base a éstas investigaciones cabe preguntarse, *¿habrán diferencias en partición de N en genotipos que expresan distintas estrategias (AP-Semilla grande o pequeña)?* Los resultados del capítulo III de esta tesis muestran que no hubo diferencias en cuanto al índice de cosecha de nitrógeno entre las estrategias evaluadas. Sin embargo, los genotipos AP-Semillas pequeñas presentaron mayores aportes de nitrógeno en los granos provenientes de removilización del N foliar, en comparación con la categoría AP de granos grandes. Además, la estrategia de granos pequeños, se asoció con un mayor reservorio de N vegetativo a inicios de llenado pero no la otra estrategia AP. Los genotipos de alto rendimiento evaluados fueron los que cosecharon mayor contenido de N en los granos maduros.

Estudios bioquímicos relacionados a la composición de los granos en leguminosas sugieren que la sobre-expresión de transportadores de sacarosa y aminoácidos es importante para determinar aumentos en concentración de proteína debidos a mayor contenido de proteína (AP-Semilla grande). *¿Sería esperable que genotipos que expresen la estrategia AP-Semilla pequeña tengan una menor expresión de transportadores sacarosa y aminoácidos?* Efectivamente, en el experimento correspondiente al capítulo IV de esta tesis (Poeta et al., 2017), se encontraron niveles bajos de transcritos del transportador de aminoácidos (AAP) en la estrategia AP-Semilla pequeña. En cuanto al transportador de sacarosa evaluado (TSAC), no se encontraron diferencias significativas entre las estrategias evaluadas. Otros estudios sugieren la importancia de algunas enzimas claves involucradas en el metabolismo de carbohidratos para incrementar la concentración de proteínas. Por ejemplo en *Vicia narbonensis* la concentración de proteína en la semillas se ha incrementado a partir de la sobreexpresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (FPC; Rolletschek et al., 2004) por una mayor disponibilidad de esqueletos carbonados para la síntesis de proteínas. A su vez, la inhibición de la expresión de la enzima ADP-Glucosa pirofosforilasa resultó en un aumento de concentración de proteína en esta especie (ADPGP; Weber et al., 2000; Rolletschek et al., 2002). *¿Sería esperable que los cultivares de soja que presentan una estrategia AP-Semilla pequeña presenten una menor expresión de genes que codifican para enzimas que intervienen en la determinación del contenido de carbohidratos?* La misma pregunta podría hacerse para la expresión de genes que

intervienen en el metabolismo de lípidos, como por ejemplo ACC y DGAT. Nuestros resultados arrojaron que los niveles de los transcriptos del gen FPC fueron 2.6 veces mayor en AP-Semilla grande en comparación con el genotipo AP-Semilla pequeña. Contrariamente a lo esperado, los niveles de los transcritos en ADPGP fueron más elevados en AP-Semilla pequeña. Por otro lado, encontramos que alta concentración de proteína en genotipos AP-Semilla pequeña estuvieron relacionados con bajo nivel de expresión de genes involucrados en la síntesis de aceite (DGAT y ACC). Los resultados de éste experimento corresponden a un análisis de seis genes y tres genotipos de soja con diferente composición y peso de grano. Para poder extrapolar las conclusiones de éste experimento a otros cultivares sería necesario llevar a cabo un análisis más robusto de genes y genotipos. Por ejemplo, esto podría llevarse a cabo mediante la técnica de RNA seq (secuenciación masiva del transcriptoma) y una posterior disección de las rutas metabólicas asociadas al llenado de los granos según las diferentes estrategias propuestas.

El objetivo final de éstos estudios reside en conocer los mecanismos involucrados en la correlación negativa entre concentración de proteína y rendimiento para poder llevar a cabo un proceso de mejora genética eficaz. Es sabido que la selección por alta concentración proteica en soja es factible (Cober y Voldeng 2000, Orf et al. 2004), sin embargo los incrementos están usualmente negativamente correlacionados con el rendimiento (Hartwig y Hinson 1972; Brin y Burton 1979; Helms y Orf 1998). En algunos estudios genéticos se evaluó si ésta correlación se debía a ligamientos genéticos o a efectos pleiotrópicos (Nichols et al., 2006). Sin embargo, los resultados han sido inconsistentes. En algunas poblaciones se han logrado correlaciones negativas muy bajas o nulas entre rendimiento y proteína mientras que en otras no fue posible romper dicha correlación (Cober et al. 2000). En estas evaluaciones, sin embargo, no se tuvo en cuenta la posible existencia de las estrategias arriba mencionadas. En relación a esto surge la pregunta: *¿Es posible eliminar la correlación negativa entre rinde y concentración de proteína cuando esta última está controlada por la estrategia AP-Semilla pequeña, pero no cuando está determinada por la estrategia AP-Semilla grande?* En el capítulo V de ésta tesis se evaluaron seis poblaciones construidas a partir de la cruce de genotipos de alto rendimiento (Comerciales), con donantes de alta concentración de proteína con diferente tamaño de semilla (AP-Semilla grande y AP-Semilla pequeña). Se encontró que la correlación entre rendimiento y concentración proteica fue nula (estadísticamente no significativa) cuando los donantes AP fueron genotipos AP-Semilla pequeña. Sin embargo, cuando el donante fue un genotipo AP-Semilla grande, la correlación entre ambos caracteres fue estadísticamente significativa y negativa en dos de las tres poblaciones evaluadas. Estos resultados son consecuencia de un experimento en microparcels llevado a cabo bajo condiciones de manejo convencionales, en dos fechas de siembra, en una misma localidad y año, por lo que es

necesario testear la consistencia de los mismos en un mayor tamaño de parcela, mayor número de ambientes y repeticiones.

La realización del presente proyecto aporta nuevos conocimientos acerca de los controles que rigen sobre la composición de los granos de soja. La identificación de las estrategias propuestas y su impacto en el funcionamiento del cultivo constituyen aportes novedosos a un área de estudio importante (la interrelación entre la economía del N y el rendimiento) que incorpora un aspecto ignorado en la bibliografía hasta la actualidad. Estos resultados proveen además información útil para futuros análisis de QTL y para intentos de modelización estudiando la influencia del ambiente sobre la composición final del grano con una base fisiológica más realista.

CONTRASTE DE HIPÓTESIS PLANTEADAS

Hipótesis específicas

- *Es posible lograr aumentos en la concentración de proteína en semillas de soja mediante aumentos en el contenido de proteína per se (AP semillas grandes) o a través de reducciones en el contenido de aceite y carbohidratos (AP semillas pequeñas).*

En el capítulo II de ésta tesis se comprobó que alta concentración de proteína puede ser obtenida por incrementos más que proporcionales en el contenido de proteína (mg semilla^{-1}) en relación a los contenidos de aceite y carbohidratos en semillas grandes, o por reducciones más que proporcionales en los contenidos de aceite y/o carbohidratos en relación a la reducción en el contenido de proteína en semillas pequeñas. En la tabla II.1 se puede observar que la concentración de proteínas (g kg^{-1}) y el contenido de proteínas (mg semilla^{-1}) de las semillas mostraron una variación significativa entre los 97 genotipos fenotipados en las dos fechas de siembra.

Las evidencias que se describen en mi tesis me permiten aceptar la primera hipótesis de la tesis.

- *Los impactos fisiológicos a nivel de cultivo debido a aumentos en la concentración de proteína dependen de la estrategia que expresen los genotipos evaluados. Esta hipótesis fue desglosada en dos sub-hipótesis:*

- *La selección para un mismo carácter (ej.: alta concentración de proteínas en la semilla) puede impactar de manera diferencial sobre el crecimiento y el desarrollo dependiendo del mecanismo que esté rigiendo al carácter de interés.*

A partir de esta caracterización inicial que se llevó a cabo en el Experimento I del Capítulo II de ésta tesis, seleccionamos seis genotipos con alta concentración de proteínas (g kg^{-1}) asociados con las estrategias (i) alto contenido de proteína y alto peso de grano (AP- Semilla grande) y (ii) bajo contenido de proteínas, aceite, y residual y semillas pequeñas (AP- Semilla pequeña). Estos genotipos fueron testeados en el experimento II descrito en el Capítulo II y concluimos que una alta concentración de proteína en genotipos de semillas grandes estuvo asociada con un período de llenado de granos más largo, tasas de crecimiento de las semillas más aceleradas y mayor cantidad de asimilados disponibles por grano comparado con la otra estrategia AP. Esta última presentó mayor área foliar a comienzos de llenado,

una tasa de senescencia más acelerada en comparación con la primera estrategia, y produjo el mismo rendimiento biológico que los genotipos comerciales.

Las evidencias que se describen en mi tesis me permiten aceptar la segunda hipótesis de la tesis.

- *La selección para un mismo carácter (ej.: alta concentración de proteínas en la semilla) puede impactar de manera diferencial sobre la economía del N dependiendo del mecanismo que esté rigiendo al carácter de interés.*

Los resultados del el capítulo III muestran patrones de removilización de N contrastantes en las estrategias evaluadas. Una alta concentración de proteína en genotipos de semillas pequeñas estuvo asociada a un mayor área foliar y contenido de N por unidad de superficie a inicios de llenado de granos y, a una mayor removilización del N en los granos maduros, en comparación con la otra estrategia AP. Esta última presentó mayor contenido de N por unidad de área foliar a inicios de llenado y menor pérdida de éste a lo largo del PLLG.

Los resultados que se describen en mi tesis me permiten aceptar la tercera hipótesis planteada.

- *Un mismo nivel de concentración proteica en los granos puede alcanzarse a través de patrones de acumulación de reserva contrastantes.*

Alta concentración de proteína en las semillas mediante la estrategia “AP-Semilla grande” depende de una mayor expresión de genes involucrados en la síntesis proteica, mientras que aumentos mediante la estrategia “AP-Semilla pequeña” dependen de una menor expresión de genes involucrados en la síntesis de aceite y carbohidratos.

Cuando se comparó la expresión relativa de genes, en el Capítulo IV, en semillas con 700 g kg⁻¹ de humedad (lo que equivale a 50% del peso final de los granos en todos los genotipos), descubrimos que es posible tener el mismo nivel de concentración de proteína en genotipos que tienen patrones contrastantes de expresión génica. Específicamente, encontramos niveles elevados de transcritos de algunos genes involucrados directamente (AAP) o indirectamente (FPC) en la síntesis de proteína en genotipos con alta concentración proteica. Por otro lado, encontramos que alta concentración de proteína en genotipos AP-Semilla pequeña estuvieron relacionados con bajo nivel de expresión de genes involucrados en la síntesis de aceite (DGAT y ACC).

Estos resultados nos permiten aceptar solo en forma parcial la cuarta hipótesis de esta tesis, ya que se requiere una caracterización de más cantidad de genes y genotipos de modo de poder extrapolar estos resultados a otros cultivares.

- *El grado de correlación negativa entre rendimiento y concentración de proteína de una población segregante derivada de la cruce entre un cultivar estándar de alto rendimiento y un donante de alta concentración de proteína depende de la estrategia que posee el donante de alta proteína.*

En el capítulo V evaluamos seis poblaciones construidas a partir de la cruce de genotipos de alto rendimiento (Comerciales) con donantes de alta concentración de proteína con diferente tamaño de semilla (AP-Semilla grande y AP-Semilla pequeña). En la tabla V.II se puede observar que la correlación entre rendimiento y concentración de proteína fue nula (estadísticamente no significativa) cuando los donantes AP son genotipos AP-Semilla pequeña. Sin embargo, cuando el donante fue un genotipo AP-Semilla grande la correlación entre ambos caracteres fue estadísticamente positiva en dos de las tres poblaciones evaluadas.

Las evidencias de ésta tesis me permiten aceptar parcialmente la quinta hipótesis de la tesis.

CONCLUSIONES FINALES

- Se describieron dos alternativas para incrementar la concentración de proteína en las semillas de soja basadas en el tamaño de grano: (i) genotipos de semilla grande y de alto contenido de proteína y, (ii) genotipos de semilla pequeña y con reducido contenido de aceite y carbohidratos.
- Se encontró que la selección por alta concentración de proteínas en la semilla impacta de manera diferencial sobre el crecimiento y el desarrollo dependiendo de la estrategia que esté rigiendo al carácter de interés.
- Se estudió la expresión de seis genes asociados en la acumulación de reservas y se encontraron patrones contrastantes entre las estrategias descritas.
- Fue posible utilizar la humedad del grano para normalizar el desarrollo de la semilla en experimentos de expresión génica.
- Los resultados de esta tesis se alinean a la idea de que la acumulación de los diferentes constituyentes químicos de la semilla están controlados de manera independiente .
- Se corroboró, parcialmente, que el grado de correlación negativa entre rendimiento y concentración de proteína de una población derivada de la cruce entre un cultivar estándar de alto rendimiento y un donante AP depende de la estrategia que posee el donante de alta proteína.
- Los resultados de la presente tesis constituyen un importante aporte acerca de los controles que rigen sobre la composición de los granos de soja.

REFERENCIAS

- Alt, B.J., Fehr W.R., Welke G.A.. 2002. Selection for large seed and high protein in two- and three-parent soybean populations. *Crop Sci.* 42(6): 1876–1881.
- AOAC Method 988.05. "Protein (crude) in animal feed, CuSO₄/ TiO₂ mixed catalyst Kjeldahl method." 1990. In *AOAC Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA.
- Barbottin, A., Lecomte C, Bouchard C, Jeuffroy M. H. Nitrogen Remobilization during Grain Filling in Wheat. *Crop Sci.* 2005;45: 1141.
- Bastidas, A.M., Setiyono T.D., Dobermann A., Cassman K.G., Elmore R.W., Graef G.L., and Specht J.E.. 2008. Soybean sowing date: The vegetative, reproductive, and agronomic impacts. *Crop Sci.* 48:727–740.
- Beaver, J.S., and R.R. Johnson. 1981. Response of determinate and indeterminate soybeans to varying cultural practices in the northern USA. *Agron. J.* 73:833–838.
- Bellaloui, N., Reddy K.N., Bruns H.A., Gillen A.M., Mengistu A., Zobiolo L.H.S, Fisher D.K., Abbas H.K., Zablutowicz R.M., Kremer R.J. 2011. Soybean seed composition and quality: Interactions of environment, genotype, and management practices In: J.E. Maxwell, editor, *Soybeans: Cultivation, Uses and Nutrition*. 2011. Nova Science Publishers, New York. p. 1–42.
- Bennett, J., Hondred D., and Register J.C.. 2015. Keeping qRT-PCR rigorous and biologically relevant. *Plant Cell Rep.* 34: 1–3.
- Bernard, R.L. 1972. Two genes affecting stem termination in soy- beans. *Crop Sci.* 12:235–239. doi:10.2135/cropsci1972.0011183X
- Bertheloot, J., Martre P., Andrieu B. 2008. Dynamics of light and nitrogen distribution during grain filling within wheat canopy. *Plant Physiology* 2008;148:1707-1720
- Bhatia, C. R., Rabson, R. 1976. Bioenergetic considerations in cereal breeding for protein improvement. *Science* 194:1418.
- Board, J.E., and Q. Tan. 1995. Assimilatory capacity effects on soy- bean yield components and pod number. *Crop Sci.* 35:846–851
- Bolon, Y., Joseph, B., Cannon, S.B., Graham, M.A., Diers, B.W., Farmer, A.D., May, G.D., Muehlbauer, G.J., Specht, J.E., Tu, Z.J., Weeks, N., Xu, W.W., Shoemaker, R.C., Vance C.P. 2010. Complementary genetic and genomic approaches help characterize the linkage group I seed protein QTL in soybean. *BMC Plant Biol.* 10, 41.
- Bonferroni, C. E. 1936. *Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità*. Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze 8, 3-62.

- Borrás, L., G.A. Slafer, and M.E. Otegui. 2004. Seed dry weight response to source-sink manipulations in wheat, maize and soybean: A quantitative reappraisal. *Field Crops Res.* 86:131–146.
- Borrás, L., Westgate M.E., 2006. Predicting maize kernel sink capacity early in development. *F. Crop. Res.* 95: 223–233.
- Brim, C.A., Burton, J.W. 1979. Recurrent selection in soybeans .2.selection for increased percent protein in seeds. *Crop Sci.* 19, 494–498.
- Brumm, T.J., Hurburgh C.R. 2006. Changes in long-term soybean compositional patterns. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 981–983.
- Burton, J.W. 1985. Breeding soybeans for improved protein quantity and quality. p. 361–367. In R. Shibles (ed.) *Proc. World Soybean Research Conf. III*, Westview Press, Boulder, CO.
- Burton, J.W. 1987. Quantitative genetics: Results relevant to soybean breeding. p. 211–247. In J.R. Wilcox (ed.) *Soybeans: Improvement production and uses*, Second Edition. ASA, Madison, WI.
- Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29: 23–39.
- Bustin, S.A., Beaulieu J., Huggett J., Jaggi R., Kibenge F.S.B., Olsvik P.A., Penning L.C., Toegel S. 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence- based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol. Biol.* 11:74
- Calderini, D.F., Abeledo L.G., Slafer G.A.. 2000. Physiological maturity in wheat based on kernel water and dry matter. *Agron. J.* 92: 895–901.
- Carter, T.E., Burton J.W., Brim C.A. 1982.Recurrent selection for percent protein in soybean seed - Indirect effects on plant-N accumulation and distribution. *Crop Sci.* 22, 513–519.
- Chapin, F.S., Schulze, E.D., Mooney, H.A. 1990. The Ecology and Economics of Storage in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21, 423- 447.
- Cheftel J.C, Cuq J.L., Lorient D. 1985). *Protéines alimentaires. Biochimie propriétés fonctionnelles – valeur nutritionnelle modifications chimiques.* Paris: Technique et documentation . Lavoisier, pp. 1 - 295.
- Christensen, L.E., Below F.E., Hageman R.H., 1981. The effects of ear removal on senescence and metabolism of maize. *Plant Physiology* 68, 1180–1185.
- Chung, J., Babka H.L., Graef G.L., Staswick P.E., Lee D.J., Cregan P.B., Shoemaker R.C., Specht J.E. 2003. The seed protein, oil, and yield QTL on soybean linkage group I. *Crop Sci.* 43, 1053–1067.

- Cober, E.R., Voldeng H.D. 2000. Developing high-protein, high-yield soybean populations and lines. *Crop Sci.* 40, 39–42.
- Csanadi, G., Vollmann J., Stift G., Lelley T. 2001. Seed quality QTLs identified in a molecular map of early maturing soybean. *Theor. Appl. Genet.* 103, 912–919.
- Cuniberti, M., Herrero, R. 2006. Evolucion del contenido de proteína y aceite en la región sojera argentina. *Lab. de Calidad Industrial de Cereales y Oleaginosas de la EEA-INTA Marcos Juárez*
- Cuniberti, M., Herrero, R., Masiero, B. 2011. Variación de la calidad industrial de la soja por efectos ambientales y genéticos. *Mercosoja 2011*. Septiembre. Rosario.
- Cuniberti, M., Herrero, R. 2013. Caída en la proteína de la soja argentina. *Rev. INTA Actualización 2013*. Informe de actualización técnica N°2. Pag. 65-66.
- Dabholkar, A. R. 1992. *Elements of Biometrical Genetics*. New Delhi, India: Concept Publishing Company. PMCID:PMC1519597
- Dardanelli, J.L., Balzarini, M., Martinez, M.J., Cuniberti, M., Resnik, S., Ramunda, S.E., Herrero, R., Baigorri, H. 2006. Soybean maturity groups, environments, and their interaction define mega-environments for seed composition in Argentina. *Crop Sci.* 46, 1939-1947.
- Diers, B.W., Keim P., Fehr W.R., Shoemaker R.C. 1992. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. *Theor. Appl. Genet.* 83, 608–612.
- Donald C.M., Hamblin J. 1976. Biological yield and harvest index of cereals as agronomic and plant breeding criteria. *Adv. Agron.* 28, 361–405.
- Egli, D.B., Leggett J.E., Duncan W.D. 1978. Influence of N stress on leaf senescence and N redistribution in soybean. *Agron J* 74:375–379
- Egli, D.B., Fraser, Leggett, J.E., Poneleit, C.G. 1981. Control of seed growth in soya beans [*Glycine max* (L) Merr.]. *Ann. Bot.* 48, 171–176.
- Egli, D.B., Meckel L., Phillips, R.E., Radcliffe, D., Leggett, J.E., 1983. Moisture stress and N redistribution in soybean. *Agron. J.* 75, 1027–1031.
- Egli, D.B. 1998. *Seed biology and the yield of grain crops*. CAB International.
- Egli, D.B., Bruening, W.P. 2007a. Accumulation of nitrogen and dry matter by soybean seeds with genetic differences in protein concentration. *Crop Sci.* 47, 359–366.
- Egli, D.B., and Bruening W.P.. 2007b. Nitrogen accumulation and redistribution in soybean genotypes with variation in seed protein concentration. *Plant Soil.* 301, 165–172.
- Escalante, E.E., Wilcox J.R. 1993. Variation in seed protein among nodes of determinate and indeterminate soybean near-isolines. *Crop Sci.* 33: 1166–1168.
- Falconer, D.S., Mackay T.F.C. 1996. *Introduction to quantitative genetics*. Ed. 4. Longmans Green/John Wiley y Sons, Harlow, Essex, UK/New York.

- Fehr, W.R., Caviness, C.E. 1977. Stages of soybean development. Iowa Agricultural and Home Economics Experiment Station Special Report 80, 3–11. Ames.
- Frederick, J.R., Hesketh J.D. 1994. Genetic improvement in soybean: physiological attributes. In: Slafer GA (ed) Genetic improvement of field crops. Marcel Dekker Inc., New York, pp 237–286
- Funada M., Helms • T. C., Hammond • J. J., Hossain •K., Doetkott C. 2013. Single-seed descent, single-pod, and bulk sampling methods for soybean. *Euphytica*. 192:217–226
- Gaju, O. , Allard V., Martre P., Snape J.W., Heumez E., LeGouis J., et al. 2011 Identification of traits to improve the nitrogen-use efficiency of wheat genotypes. *Field Crops Res.* 123: 139–152.
- Gambín, B.L., Borrás L., Otegui M.E. 2006. Source–sink relations and kernel weight differences in maize temperate hybrids. *F. Crop. Res.* 95: 316–326.
- Golombek, S., Rolletschek H., Wobus U., Weber H. 2001. Control of storage protein accumulation during legume seed development. *J. Plant Physiol.* 158: 457–464.
- Götz, K.P., Staroske N., Radchuk R., Emery R.J.N., Wutzke K.D., Herzog H., Weber H.. 2007. Uptake and allocation of carbon and nitrogen in *Vicia narbonensis* plants with increased seed sink strength achieved by seed-specific expression of an amino acid permease. *J. Exp. Bot.* 58: 3183–95.
- Hallauer, A.R.; Miranda Filho, J.B. 1988. Quantitative genetics in maize breeding. Second edition. Ames: Iowa State University Press, p.89-204.
- Hanson, W.D., Leffel R.C., Howell R.W.1961. Genetic analysis of energy production in the soybean 1. *Crop Sci.* 1: 121–126.
- Hanson, W.D. 1986. Rates of sucrose release from opened seed coats of soybean as affected by genotypes: Relation with rate of seed development. *Crop Sci.* 26: 301–307.
- Hanson, W.D. 1991. Seed Protein-content and delivery of assimilates to soybean seed embryos. *Crop Sci.* 31: 1600–1604.
- Hanway, J.J., E.J. Dunphy, G.L. Loberg, and R.M. Shibles. 1984. Dry weights and chemical composition of soybean plant parts throughout the growing season. *J. Plant Nutr.* 7:1453–1475.
- Hanway, J.J., Weber C.R. 1971. N, P, and K percentages in soybean (*Glycine max* (L.)) plant parts. *Agron J* 63: 286–290
- Harper, J.E. 1987. Nitrogen metabolism. In: Wilcox JR (ed) Soybeans: improvement, production and uses. ASA- CSSA-SSSA, Madison, WI, pp 497–523
- Hartwig, E.E., Hinson K. 1972. Association between chemical composition of seed and seed yield of soybeans. *Crop Sci* 12:829–830

- Helms, T.C., Orf J.H. 1998. Protein, oil and yield of soybean lines selected for increased protein. *Crop Sci* 38:707–711
- Hills, M.J. 2004. Control of storage-product synthesis in seeds. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 302–308.
- Hurburgh, C.R. 1994. Identification and segregation of high-value soybeans at a country elevator. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 1073–1078.
- Ishii, T., Hayashi, T., Yonezawa, K. 2010. Categorization of quantitative trait loci by their functional roles: QTL analysis for chemical concentration in seed grains. *Crop Sci.* 50, 784–793.
- Jako, C., Kumar A., Wei Y., Zou J., Barton D.L., Giblin E.M., Covello P.S., Taylor D.C. 2001. Seed-specific over-expression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol.* 126: 861–874.
- Jenner, C.F., Ugalde T.D., Aspinall D. 1991. The Physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. *Funct. Plant Biol.* 18: 211–226.
- Jeppsen, R.G., Johnson R.R., Hadley H.H. 1978. Variation in mobilization of plant nitrogen to the grain in nodulating and non-nodulating soybean genotypes. *Crop Sci* 18: 1058–1062
- Jiang, H.F., and D.B. Egli. 1995. Soybean seed number and crop growth-rate during flowering. *Agron. J.* 87:264–267.
- Kichey, T., Hirel B., Heumez E., Dubois F., Le Gouis J. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Res.* 2007;102: 22–32.
- Ladejobi O., b, Elderfieldb J, Gardnera K.A., Gaynorc R.C., Hickeyc J., Hibberdb J.M. , Mackaya I.J., Bentleya A.R. 2016. Maximizing the potential of multi-parental crop populations. *App. y Trans. Genomics. Article in press*
- Lardizabal, K., Effertz R., Levering C., Mai J., Pedroso M.C., Jury T., Aasen E., Gruys K., Bennett K.. 2008. Expression of *Umbelopsis ramanniana* DGAT2A in seed increases oil in soybean. *Plant Physiol.* 148: 89–96.
- Lawlor, D.W. 2002. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *J Expt Bot* 53:773–787
- Leffel, R.C., Cregan, P.B., Bolgiano, A.P., Thibeau, D.J. 1992. Nitrogen-metabolism of normal and high-seed-protein soybean. *Crop Sci.* 32, 747–750.
- Leffel, B.C. , Rhodes, W.K. 1993. Agronomic performance and economic value of high-seed-protein soybean. *J. Prod. Agrie.* 6: 365-368.

- Li, W.B., Sun, D.S., Du, Y.P., Chen, Q.S., Zhang, Z.C., Qiu, L.J., Sun, G.L. 2007. Quantitative trait loci underlying the development of seed composition in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Genome*. 50, 1067–1077.
- Ludueña, R.F. 1997. Multiple forms of tubulin: Different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* 178: 207–275.
- Lusas, E.W. 2004. Soybean processing and utilization. P. 949–1045. In *Agronomy Monograph, Soybeans: Improvement, production, and uses*. ASA-CSSA-SSSA.
- Medic, J., Atkinson, C., Hurburgh, C.R. 2014. Current knowledge in soybean composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91, 363–384.
- Middlenton, G. K., Bode C.E., Boyles B.B., 1954. A comparison of the quantity and quality of protein in certain wheat varieties of soft wheat. *Agron. J.* 46:500-502.
- Miranda, M., L. Borisjuk, A. Tewes, U. Heim, N. Sauer, U. Wobus, H. Weber. 2001. Amino acid permeases in developing seeds of *Vicia faba* L.: Expression precedes storage protein synthesis and is regulated by amino acid supply. *Plant J.* 28: 61–71.
- Munier-Jolain, N.G., Ney, B. and Duthion, C. 1996. Termination of seed growth in relation to nitrogen content of vegetative parts in soybean plants. *Eur. J. Agron.* 5: 219-225.
- Munier-Jolain, N.G., N.M. Munier-Jolain, R. Roche, B. Ney, C. Duthion. 1998. Seed growth rate in grain legumes I. Effect of photoassimilate availability on seed growth rate. *J. Exp. Bot.* 49: 1963–1969.
- Naeve, S.L., Huerd S.C.. 2008. Year, region, and temperature effects on the quality of Minnesota's soybean crop. *Agron. J.* 100: 690–695.
- Nichols, D.M., Glover K.D., Carlson S.R., Specht J.E., Diers B.W.. 2006. Fine mapping of a seed protein QTL on soybean linkage group I and its correlated effects on agronomic traits. *Crop Science* 46, 834–839.
- Ohlrogge, J.B., Jaworski J.G.. 1997. Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 109–136.
- Okumoto, S., Schmidt R., Tegeder M., Fischer W.N., Rentsch D., Frommer W.B., Koch W.. 2002. High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277: 45338–45346.
- Orf J.H., Diers B.W., Boerma H.R. 2004. Genetic improvement: conventional and molecular based strategies. In: Boerma HR, Specht JE (eds) *Soybeans: improvement, production and uses*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp 417–450
- Panthee, D.R., Kwanyuen P., Sams C.E., West D.R., Saxton A.M., Pantalone V.R. 2004. Quantitative trait loci for β -conglycinin (7S) and glycinin (11S) fractions of soybean storage protein. *JAOCS* 1005-1012.

- 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 Sci.* 45, 2015–2022.
- 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 Sci.* 54: 2752-2759.
- Poeta, F.B., Borrás L., Rotundo J.L.. 2016. Variation in seed protein concentration and seed size affects soybean crop growth and development. *Crop Sci.* 56: 3196-3208.
- Poeta F.B., Ochogavía A.C., Permingeat H.R., Rotundo J.L. 2017. Storage-associated genes and reserves accumulation in soybean cultivars differing in physiological strategies for attaining high seed protein concentration. *Crop Science.* 57:1-10
- Radchuk, R., Radchuk V., Götz K.P., Weichert H., Richter A., Emery R.J.N., Weschke W., Weber H. 2007. Ectopic expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Vicia narbonensis* seeds: Effects of improved nutrient status on seed maturation and transcriptional regulatory networks. *Plant J.* 51: 819–839.
- Roesler, K., Shintani D., Savage L., Boddupalli S., Ohlrogge J. 1997. Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. *Plant Physiol.* 113: 75–81.
- Rolletschek, H., Hajirezaei M.R., Wobus U., Weber H. 2002. Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in *Vicia narbonensis* seeds increases soluble sugars and leads to higher water and nitrogen uptake. *Planta* 214: 954–964.
- Rolletschek, H., Borisjuk L., Radchuk R., Miranda M., Heim U., Wobus U., Weber H. 2004. Seed-specific expression of a bacterial phosphoenolpyruvate carboxylase in *Vicia narbonensis* increases protein content and improves carbon economy. *Plant Biotechnol. J.* 2: 211–219.
- Rolletschek, H., Hosein F., Miranda M., Heim U., Gotz K., Schlereth A., Borisjuk L., Saalbach I., Wobus U., Weber H. 2005. Ectopic expression of an amino acid transporter (VfAAP1) in seeds of *Vicia narbonensis* and *Pea* increases storage proteins. *Plant Physiol.* 137: 1236–1249.
- Rosche, E., Blackmore D., Tegeder M., Richardson T., Schroeder H., Higgins T.J. V., Frommer W.B., Offler C.E., Patrick J.W. 2002. Seed-specific overexpression of a potato sucrose transporter increases sucrose uptake and growth rates of developing pea cotyledons. *Plant J.* 30: 165–175.
- Rossato, L., MacDuff J.H., Laine P., Le Deunff E., Ourry A. 2002. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1131–1141

- 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 Res.* 112, 90–96.
- Rotundo, J.L., Westgate M.E. 2009. Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. *Field Crops Res.* 110, 147-156.
- Rotundo, J.L., Borrás L., Westgate M.E. 2011. Linking assimilate supply and seed developmental processes that determine soybean seed composition. *Eur. J. Agron.* 35, 184-191.
- Rotundo, J.L., Miller-garvin J.E., Naeve S.L.. 2016. Regional and temporal variation in soybean seed protein and oil across the United States. *Crop Sci.* 56: 797–808.
- Rozen, S., Skaletsky H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, N.J. p. 365–386.
- Salado-Navarro, L.R., Hinson K., Sinclair T.R. 1985. Nitrogen partitioning and dry-matter allocation in soybeans with different seed protein-concentration. *Crop Sci.* 25, 451–455.
- Salado-Navarro, L.R., Sinclair T.R., Hinson K. 1986. Yield and reproductive growth of simulated and field-grown soybean. I. Seed-filling duration. *Crop Sci.* 26:966-970.
- Salon, C., Munier-Jolain N.G., Duc G., Voisin A.S., Grandgirard D., Larmure A., Emery R.J.N., Ney B. 2001. Grain legume seed filling in relation to nitrogen acquisition: a review and prospects with particular reference to pea. *Agronomie* 21 539–552
- Salvagiotti, F., Specht J.E., Cassman K.G., Walters D.T., Weiss A., Dobermann A. 2009. Growth and nitrogen fixation in high-yielding soybean: Impact of nitrogen fertilization. *Agron. J.* 101, 958–970.
- SAS Institute. 1999. SAS Software. SAS Institute Cary, NC.
- Settlage, S.B., Kwanyuen P., Wilson R.F. 1998. Relation between diacylglycerol acyltransferase activity and oil concentration in soybean. 75:775-781
- Sheehy, J.E. 2001. Will yield barriers limit future rice production. In: Nosberger J, Geiger HH, Struik PC (eds) *Crop science: progress and prospects*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp 281–305.
- Simon, P. 2003. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 19: 1439–1440.
- Sinclair, T. R., de Wit C.T. 1975. Photosynthate and nitrogen requirements for seed production by various crops. *Science* 189: 565–567.
- Sinclair, T.R., De Wit, C.T. 1976. Analysis of carbon and nitrogen limitations to soybean yield. *Agron. J.* 68, 319–324.
- Sinclair, T.R., Horie T. 1989. Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency:

- a review. *Crop Sci* 29:90–98
- 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, 349–353.
- Stearns, S.C. 1989. Trade-offs in life-history evolution. *Func. Ecol.* 3, 259–268.
- Struik, P.C., Yin, X.Y., de Visser, P. 2005. Complex quality traits: now time to model. *Trends Plant Sci.* 10, 513-516.
- Stuber, C.W., Johnson V.A., Schmidt J.W. 1962. Grain protein content and its relationships to other plant and seed characteristics in the parents and progeny of a cross of *Triticum aestivum* L. *Crop Sci.* 2: 506-508.
- Sugimoto, T., Tanaka, K., Monma, M., Kawamura, Y., Saio, K. 1989. Phosphoenolpyruvate carboxylase level in soybean seed highly correlates to its contents of protein and lipid. *Agricultural and Biological Chemistry* 53, 555–557.
- Swank, J.C., Egli D.B., Pfeiffer T.W. 1987. Seed growth characteristics of soybean genotypes differing in duration of seed fill. *Crop Sci.* 27: 85–89.
- Triboi, E., Triboi-Blondel, A.M. 2002. Productivity and grain or seed composition: a new approach to an old problem - invited paper. *Eur. J. Agron.* 16, 163–186.
- Turner, N.C., Davies, S.L., Plummer, J.A., Siddique, K.H.M., 2005. Seed filling in grain legumes under water deficits, with emphasis on chickpeas. *Advances in Agronomy*, Vol 87, pp. 211-250.
- Turpin, D.H., Weger H.G. 1990. Interactions between photosynthesis, respiration and nitrogen assimilation. In Dennis D T ;Turpin D H (ed.), *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Longman Scientific, Singapore. p. 422–433.
- Wang, H.W., Zhang B., Hao Y.J., Huang J., Tian A.G., Liao Y., Zhang J.S., Chen S.Y. 2007. The soybean Dof-type transcription factor genes, GmDof4 and GmDof11, enhance lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant J.* 52: 716–729.
- Wang, H.W., Zhang J.S., Gai J.Y., Chen S.Y. 2006. Cloning and comparative analysis of the gene encoding diacylglycerol acyltransferase from wild type and cultivated soybean. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1086–1097.
- Weber H, Rolletschek H, Heim U, Golombek S, Gubatz S, Wobus U. 2000. Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing seeds of *Vicia narbonensis* moderately decreases starch but increases protein content and affect maturation. *The Plant Journal* 24, 33–43.
- Weih, M. 2003. Trade-offs in plants and the prospects for breeding using modern biotechnology. *New Phytol.* 158, 7–9.
- Wilcox, J.R., Cavins J.F. 1995. Backcrossing high seed protein to a soybean cultivar. *Crop Sci.* 35: 1036-1041

- Wilcox, J. R. Zhang, G. 1997. Relationships between seed yield and seed protein in determinate and indeterminate soybean populations. *Crop Sci.* 37: 361–364.
- Wilcox, J.R. 1998. Increasing seed protein with eight cycles of recurrent selection. *Crop Sci* 38: 1536–1540
- Wilcox, J. R., Shibles, R.M. 2001. Interrelationships among seed quality attributes in soybean. *Crop Sci.* 41, 11–14.
- Wilson, R.F. 2004. Seed Composition. *Soybeans: Improvement, Production and Users* 3rd Edition. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI.
- Xu H, Wilcox J.R. .1992. Recurrent selection for maturity and percent seed protein in *Glycine max* based on S0 evaluations. *Euphytica* 62:51–57
- Yaklich, R.W., Vinyard B., Camp M., Douglass S. 2002. Analysis of protein and oil from soybean northern and southern region uniform tests. *Crop Sci.* 42: 1504 – 1515.
- Yamagata, M., Kouchi, H., Yoneyama, T. 1987. Soybean (*Glycine-Max-L Merr*) Analysis by Long-Term C-13-Labeling Experiments. *Journal of Experimental Botany* 38, 1247-1259.
- Zeihner, C., Egli D.B., Leggett J.E., Reicosky D.A. 1982. Cultivar differences in N redistribution in soybeans. *Agron J* 74:375–379
- Zhao-Ming, Q., Ya-Nan, S., Qiong, W., Chun-Yan, L., Guo-Hua, H., Qing-Shan, C. 2011. A meta-analysis of seed protein concentration QTL in soybean. *Can. J. Plant Sci.* 91, 221–230.

APÉNDICE I

Tabla A1. Condiciones ambientales para las campañas 2010/11, 2011/12, and 2012/13. Se reporta el agua total acumulada a la siembra y valores de precipitaciones y temperatura media promediados cada dos meses.

Campaña agrícola		Agua acumulada a la siembra (mm) [†]	Precipitaciones (mm)			Temperatura media (°C)		
			Oct-Nov	Dic-Ene	Feb-Mar	Oct-Nov	Dic-Ene	Feb-Mar
2010/11	Primera siembra	480	83	174	210	22.2	24.6	21.0
	Segunda siembra	614						
2011/12		382	235	114	337	19.3	23.9	21.9
2012/13		668	405	275	110	19.8	23.6	20.3

[†] at 2 m depth

APÉNDICE II

Tabla A.II. Características de los constituyentes de la semilla, peso de semilla y estadíos fenológicos para los 97 genotipos caracterizados en las dos fechas de siembra en la campaña 2010/11.

Genotipo	Grupo de Madurez	Fecha de Siembra	Concentración			Contenido			Peso semilla mg semilla-1	Días a R1	Días R1-R5	Días R5-R7	Días S-R7
			Proteína	Aceite g kg ⁻¹	Residual	Proteína	Aceite	Residual					
PI196162	III	Early	40.4	21.5	38.1	92.3	49.0	87.0	228.3	45	21	38	105
PI196162	III	Late	41.2	21.0	37.8	95.0	48.4	87.1	230.5	39	17	36	92
PI261473	III	Early	41.0	22.0	37.0	49.5	26.5	44.7	120.7	51	19	33	103
PI261473	III	Late	42.2	21.4	36.5	44.2	22.4	38.2	104.8	44	16	33	93
PI339977	III	Early	43.7	20.5	35.9	90.7	42.6	74.4	207.7	50	22	37	108
PI339977	III	Late	45.5	19.5	35.1	91.4	39.0	70.4	200.8	48	18	36	101
PI340005	III	Early	44.1	20.7	35.2	75.0	35.3	59.8	170.0	49	22	34	106
PI340005	III	Late	43.5	20.7	35.8	70.0	33.3	57.7	161.0	45	18	38	101
PI340031A	III	Early	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PI340031A	III	Late	47.6	19.5	32.9	84.0	34.3	58.0	176.3	49	23	36	108
PI342438	III	Early	42.3	20.9	36.9	95.0	46.9	82.7	224.5	47	24	36	106
PI342438	III	Late	43.0	20.9	36.1	109.0	52.8	91.4	253.3	40	19	39	97
PI360843	III	Early	43.3	21.3	35.4	64.4	31.7	52.7	148.8	40	24	37	101
PI360843	III	Late	42.3	21.6	36.2	75.0	38.3	64.0	177.3	37	24	47	108
PI393537	III	Early	43.1	20.0	36.9	46.9	21.7	39.9	108.5	53	24	30	106
PI393537	III	Late	44.7	19.2	36.1	43.0	18.5	34.7	96.3	47	21	32	99
PI398637	III	Early	46.0	19.7	34.3	84.7	36.3	63.2	184.2	49	23	38	111
PI398637	III	Late	46.3	18.9	34.9	75.0	30.7	56.6	162.3	45	20	35	99
PI398638	III	Early	45.8	20.0	34.2	87.9	38.3	65.5	191.7	49	24	38	111
PI398638	III	Late	45.6	19.5	34.9	84.4	36.1	64.6	185.0	44	20	36	100
PI398639	III	Early	46.2	19.8	34.0	90.2	38.7	66.4	195.3	51	23	40	113

PI398639	III	Late	45.9	19.2	35.0	76.6	32.1	58.6	167.3	45	20	34	98
PI398641	III	Early	45.6	19.8	34.6	81.0	35.2	61.4	177.5	51	22	36	108
PI398641	III	Late	45.1	19.4	35.5	74.6	32.1	58.8	165.5	44	19	36	99
PI398903	III	Early	41.3	21.7	36.9	78.6	41.4	70.3	190.3	47	22	38	106
PI398903	III	Late	44.7	20.2	35.1	82.9	37.5	65.1	185.5	45	19	35	98
PI404196A	III	Early	47.0	18.1	35.0	44.6	17.1	33.1	94.8	50	21	29	100
PI404196A	III	Late	47.8	18.0	34.3	47.6	17.9	34.1	99.5	49	17	31	97
PI416750	III	Early	42.5	20.9	36.6	80.7	39.8	69.4	189.8	40	31	36	107
PI416750	III	Late	44.4	20.4	35.3	96.9	44.3	76.8	218.0	35	28	37	100
PI417364	III	Early	38.1	21.2	40.7	76.8	42.7	82.2	201.7	50	21	37	108
PI417364	III	Late	40.1	20.7	39.3	82.4	42.4	80.7	205.5	45	14	41	99
PI423769A	III	Early	42.4	21.0	36.6	82.9	41.1	71.7	195.7	50	18	35	103
PI423769A	III	Late	43.4	20.3	36.4	96.9	45.2	81.1	223.3	42	19	46	107
PI437641A	III	Early	39.6	21.4	39.1	50.9	27.5	50.2	128.5	38	24	32	94
PI437641A	III	Late	43.0	20.4	36.7	59.8	28.4	51.0	139.3	35	25	34	94
PI458113	III	Early	43.7	20.4	35.9	86.2	40.4	71.0	197.7	49	22	35	106
PI458113	III	Late	41.7	20.3	38.0	78.9	38.4	71.9	189.3	46	18	36	99
PI458510	III	Early	38.5	22.4	39.1	53.3	31.1	54.1	138.5	38	27	39	105
PI458510	III	Late	38.4	21.9	39.8	49.1	28.0	50.9	128.0	36	26	38	99
PI475818	III	Early	40.7	20.8	38.4	40.4	20.7	38.0	99.0	44	25	35	104
PI475818	III	Late	44.3	20.2	35.6	50.1	22.9	40.3	113.3	40	22	37	98
PI479722	III	Early	39.4	21.8	38.8	50.8	28.1	50.1	129.0	38	25	34	97
PI479722	III	Late	41.0	21.2	37.9	54.6	28.3	50.6	133.5	35	25	37	96
PI479735	III	Early	39.7	21.4	38.9	51.2	27.7	50.1	129.0	38	29	30	97
PI479735	III	Late	41.5	21.0	37.5	62.7	31.7	56.6	151.0	37	24	38	99
PI486353	III	Early	39.8	21.9	38.2	89.5	49.2	85.7	224.3	50	21	42	113
PI486353	III	Late	39.6	21.6	38.9	91.1	49.6	89.6	230.3	44	18	49	110
PI506511	III	Early	40.8	21.6	37.6	74.1	39.2	68.2	181.5	51	20	37	108
PI506511	III	Late	41.0	21.6	37.5	77.9	41.0	71.2	190.0	45	18	41	104
PI506528	III	Early	42.0	21.2	36.8	66.4	33.7	58.7	158.7	42	24	40	106
PI506528	III	Late	41.7	20.4	37.9	65.3	31.9	59.3	156.5	35	28	30	93
PI506637	III	Early	43.9	20.7	35.5	139.9	65.9	113.1	318.8	47	23	39	108
PI506637	III	Late	43.0	20.6	36.5	97.8	47.3	83.5	228.5	42	17	35	94
PI506790	III	Early	43.1	21.0	36.0	106.0	51.5	88.5	246.0	48	24	31	102
PI506790	III	Late	43.3	20.5	36.3	98.4	46.7	82.5	227.5	44	15	34	93

PI506864A	III	Early	38.1	23.2	38.8	51.5	31.3	52.4	135.2	40	25	35	100
PI506864A	III	Late	39.2	22.0	38.8	58.7	32.9	57.9	149.5	35	23	40	98
PI506887	III	Early	44.9	19.8	35.3	31.5	13.9	24.8	70.2	51	21	22	94
PI506887	III	Late	47.3	19.1	33.6	33.2	13.4	23.6	70.2	50	16	27	93
PI507133	III	Early	44.6	19.0	36.4	46.5	19.8	37.9	104.2	54	17	27	98
PI507133	III	Late	45.5	18.9	35.7	46.0	19.1	36.1	101.3	50	15	29	94
PI507238	III	Early	46.3	19.7	34.0	76.6	32.6	56.1	165.3	51	20	37	108
PI507238	III	Late	47.0	19.0	34.0	77.1	31.2	55.8	164.0	51	20	32	99
PI507268	III	Early	38.9	22.0	39.1	68.4	38.7	68.8	175.8	52	20	39	111
PI507268	III	Late	39.0	21.5	39.6	71.2	39.3	72.5	183.0	45	19	36	99
PI507365	III	Early	42.1	20.3	37.5	90.4	43.6	80.5	214.5	46	24	46	115
PI507365	III	Late	40.6	20.1	39.4	87.4	43.2	84.9	215.5	47	20	34	100
PI507487	III	Early	42.7	21.2	36.1	119.5	59.3	101.1	279.8	46	24	37	106
PI507487	III	Late	43.5	21.1	35.5	122.2	59.3	100.0	281.5	38	20	36	93
PI518712	III	Early	40.6	21.8	37.6	79.1	42.6	73.2	194.8	43	22	39	105
PI518712	III	Late	41.0	21.6	37.5	42.2	22.2	38.6	103.0	40	18	44	101
PI518757	III	Early	45.0	19.2	35.9	28.1	12.0	22.4	62.5	56	24	33	114
PI518757	III	Late	47.8	17.7	34.6	32.2	11.9	23.4	67.5	58	21	34	112
PI538375	III	Early	44.9	18.6	36.6	37.7	15.6	30.7	84.0	52	24	29	104
PI538375	III	Late	46.1	18.2	35.8	36.4	14.4	28.3	79.0	45	22	27	94
PI548317	III	Early	40.1	21.3	38.6	48.8	25.9	47.0	121.7	45	36	32	114
PI548317	III	Late	42.2	19.9	38.0	45.2	21.4	40.7	107.3	49	20	32	100
PI548377	III	Early	37.7	22.7	39.6	42.5	25.6	44.7	112.8	43	22	29	94
PI548377	III	Late	39.9	21.7	38.4	46.1	25.1	44.4	115.5	35	25	33	93
PI548587	III	Early	39.5	22.4	38.1	90.1	51.0	86.6	227.8	49	22	33	104
PI548587	III	Late	40.1	21.9	38.1	89.6	48.9	85.1	223.5	38	25	35	98
PI548624	III	Early	40.7	21.8	37.4	102.2	54.8	94.0	251.0	47	19	47	113
PI548624	III	Late	41.6	21.5	36.9	101.9	52.7	90.3	244.9	39	19	41	99
PI555396	III	Early	45.0	20.8	34.1	76.4	35.4	57.9	169.7	43	28	37	108
PI555396	III	Late	45.8	20.5	33.7	81.7	36.6	60.2	178.5	35	29	38	101
PI567243	III	Early	42.0	20.1	37.9	27.5	13.2	24.8	65.5	54	24	20	98
PI567243	III	Late	46.2	18.8	35.0	34.4	14.0	26.1	74.5	52	21	21	94
PI567259	III	Early	44.6	19.6	35.8	44.3	19.4	35.6	99.3	55	18	30	103
PI567259	III	Late	46.9	18.5	34.6	38.0	14.9	27.8	80.7	52	16	29	97
PI567457	III	Early	38.4	22.2	39.3	45.9	26.6	47.0	119.5	52	19	31	102

PI567457	III	Late	41.9	21.2	37.0	49.9	25.2	44.1	119.3	51	16	33	99
PI567519	III	Early	43.3	20.5	36.2	51.7	24.4	43.2	119.3	50	19	38	107
PI567519	III	Late	44.6	19.7	35.8	51.7	22.9	41.5	116.0	44	21	32	96
PI567541	III	Early	41.7	20.2	38.1	37.5	18.2	34.3	90.0	52	20	32	105
PI567541	III	Late	43.0	20.0	37.0	40.9	19.0	35.2	95.0	45	22	32	99
PI567595A	III	Early	44.2	19.3	36.5	43.9	19.2	36.3	99.3	49	22	28	99
PI567595A	III	Late	46.0	18.3	35.7	43.9	17.5	34.1	95.5	46	19	29	93
PI567599	III	Early	43.2	20.6	36.2	45.7	21.7	41.5	105.5	48	23	35	106
PI567599	III	Late	44.5	20.7	34.8	56.5	26.3	44.2	127.0	42	16	37	94
PI567601	III	Early	41.9	20.9	37.2	44.5	22.2	39.6	106.3	50	22	31	103
PI567601	III	Late	43.5	20.1	36.5	49.4	22.8	41.4	113.5	48	18	35	101
PI567603	III	Early	44.3	20.7	35.1	48.1	22.5	38.2	108.8	55	22	29	106
PI567603	III	Late	45.1	19.9	35.1	45.8	20.1	35.6	101.5	51	21	40	112
PI567624	III	Early	40.0	20.6	39.4	34.9	18.0	34.3	87.2	51	22	35	108
PI567624	III	Late	40.7	20.1	39.3	35.4	17.5	34.1	87.0	46	22	34	102
PI567679A	III	Early	43.2	20.3	36.4	45.5	21.4	38.3	105.2	56	22	28	106
PI567679A	III	Late	47.5	18.7	33.8	47.4	18.7	33.7	99.8	57	16	29	101
PI567696A	III	Early	43.7	20.3	36.0	49.2	22.9	40.6	112.7	51	24	39	113
PI567696A	III	Late	46.0	18.8	35.3	51.0	20.8	39.2	111.0	45	23	41	108
PI567706A	III	Early	39.9	20.5	39.6	38.1	19.6	37.9	95.7	54	24	36	114
PI567706A	III	Late	41.8	19.6	38.7	34.9	16.4	32.3	83.5	54	19	28	101
PI567732	III	Early	45.2	19.2	35.5	43.6	18.5	34.2	96.3	53	22	30	105
PI567732	III	Late	47.0	18.6	34.5	54.1	21.6	40.1	115.8	50	17	30	97
PI567776	III	Early	43.2	19.9	37.0	51.0	23.4	43.6	118.0	53	21	31	106
PI567776	III	Late	44.3	19.1	36.7	42.7	18.4	35.4	96.5	50	17	30	97
PI583835	III	Early	38.2	22.8	39.0	28.3	16.9	28.9	74.0	45	23	32	100
PI583835	III	Late	41.9	22.1	36.0	38.2	20.2	32.9	91.3	42	20	40	101
PI594167	III	Early	41.4	20.3	38.4	88.8	43.4	82.4	214.7	49	19	43	111
PI594167	III	Late	42.4	20.0	37.7	91.1	43.0	80.9	215.0	44	19	39	102
PI594457	III	Early	42.2	20.1	37.7	51.3	24.5	45.8	121.7	54	22	34	111
PI594457	III	Late	44.4	19.0	36.7	48.7	20.9	40.2	109.8	56	17	28	100
PI603556	III	Early	42.3	19.7	38.0	41.9	19.4	37.5	98.8	42	24	33	99
PI603556	III	Late	46.3	18.9	34.8	57.4	23.4	43.2	124.0	37	26	38	101
PI603597	III	Early	44.5	20.5	35.0	47.3	21.8	37.3	106.3	52	21	33	106
PI603597	III	Late	45.1	19.6	35.4	45.6	19.7	35.5	100.8	45	24	29	97

PI603682	III	Early	40.3	20.6	39.1	44.4	22.7	43.0	110.2	55	24	26	105
PI603682	III	Late	41.0	20.1	38.9	42.0	20.6	39.9	102.5	51	16	32	99
PI603912	III	Early	41.8	21.6	36.6	95.5	49.4	83.5	228.3	51	22	40	113
PI603912	III	Late	44.9	20.5	34.7	109.5	49.9	84.3	243.8	41	20	44	105
PI68528	III	Early	39.5	21.6	38.9	47.1	25.8	46.5	119.3	48	18	34	99
PI68528	III	Late	41.8	20.3	38.0	53.0	25.7	48.1	126.8	41	24	30	94
PI85630	III	Early	40.3	21.5	38.2	54.1	28.9	51.3	134.3	49	20	34	103
PI85630	III	Late	42.9	20.6	36.5	66.4	31.7	56.3	154.3	44	15	39	97
PI86111	III	Early	40.2	20.4	39.4	43.5	22.1	42.4	108.0	43	20	33	95
PI86111	III	Late	40.6	21.7	37.7	46.7	25.0	43.4	115.0	35	17	42	94
PI86153	III	Early	41.4	21.8	36.8	89.0	46.9	79.1	215.0	44	20	39	103
PI86153	III	Late	43.0	21.0	36.0	104.4	51.0	87.4	242.8	39	17	42	98
PI89162	III	Early	39.7	22.0	38.2	78.4	43.5	75.4	197.3	42	23	35	101
PI89162	III	Late	41.7	21.2	37.1	85.1	43.3	75.7	204.0	38	21	40	99
PI92568	III	Early	39.7	21.1	39.2	53.5	28.4	52.8	134.7	40	23	32	94
PI92568	III	Late	41.5	20.9	37.6	60.3	30.4	54.6	145.3	36	26	34	96
PI96199	III	Early	42.8	19.9	37.3	50.7	23.6	44.1	118.3	47	24	29	100
PI96199	III	Late	43.2	19.2	37.6	50.0	22.2	43.5	115.8	45	19	35	99
IA2040	III	Early	40.7	22.3	37.0	85.3	46.6	77.3	209.2	40	29	47	116
IA2040	III	Late	40.7	22.1	37.3	83.9	45.4	76.7	206.0	36	27	43	106
IA3011	III	Early	41.8	22.1	36.1	78.7	41.6	68.0	188.3	38	28	43	109
IA3011	III	Late	43.3	21.7	35.1	78.2	39.1	63.3	180.5	37	23	41	100
L604	III	Early	38.1	22.3	39.7	51.7	30.2	53.9	135.8	44	25	41	111
L604	III	Late	39.7	21.8	38.5	59.8	32.8	58.0	150.5	36	31	48	115
PI340020	IV	Early	41.4	21.3	37.3	75.7	39.0	68.1	182.8	46	27	40	113
PI340020	IV	Late	42.4	21.1	36.6	86.2	42.4	73.4	202.0	40	25	50	114
PI398970	IV	Early	44.8	19.7	35.4	36.8	16.2	29.1	82.0	56	19	36	111
PI398970	IV	Late	46.4	19.0	34.7	43.4	17.7	32.2	93.3	51	17	31	98
PI407795A	IV	Early	42.8	20.4	36.7	36.4	17.4	31.2	85.0	58	22	36	116
PI407795A	IV	Late	44.5	19.8	35.8	45.7	20.3	36.8	102.8	55	15	32	102
PI407845B	IV	Early	42.0	20.8	37.2	39.6	19.7	35.1	94.3	53	20	44	118
PI407845B	IV	Late	44.4	19.7	36.0	45.9	20.4	37.3	103.5	50	22	42	114
PI407981A	IV	Early	43.4	20.6	36.1	41.8	19.8	34.7	96.3	51	25	34	110
PI407981A	IV	Late	45.6	19.3	35.2	48.8	20.6	37.5	107.0	50	23	34	107
PI536636	IV	Early	38.1	22.5	39.4	48.3	28.5	50.0	126.8	49	20	42	111

PI536636	IV	Late	38.5	22.2	39.4	54.5	31.3	55.7	141.5	45	18	45	108
PI538376	IV	Early	43.7	20.9	35.5	94.1	45.0	76.3	215.3	51	21	37	108
PI538376	IV	Late	45.8	19.7	34.6	112.3	48.2	84.8	245.3	44	18	44	106
PI548563	IV	Early	37.4	23.0	39.6	56.4	34.6	59.7	150.7	44	28	39	111
PI548563	IV	Late	39.3	21.9	38.8	61.9	34.5	61.1	157.5	44	26	39	108
PI548619	IV	Early	38.2	22.3	39.5	57.6	33.6	59.5	150.7	38	33	42	113
PI548619	IV	Late	38.7	22.2	39.2	63.0	36.1	63.7	162.8	35	28	47	109
PI594022	IV	Early	39.7	21.7	38.6	56.4	30.9	54.9	142.2	46	24	39	108
PI594022	IV	Late	39.5	21.9	38.7	58.0	32.1	56.8	146.8	44	23	41	108
PI599509	IV	Early	41.4	21.3	37.3	77.0	39.5	69.2	185.7	51	24	39	114
PI599509	IV	Late	42.0	20.8	37.2	69.8	34.6	61.9	166.3	45	25	41	110
BCO-10	IV	Early	43.0	20.1	36.9	59.6	29.6	53.3	142.5	38	21	29	88
BCO-10	IV	Late	43.3	20.7	36.1	64.2	30.7	53.6	148.5	35	22	36	92
PI196177	V	Early	44.5	19.8	35.8	22.2	9.9	17.9	50.0	43	37	31	110
PI196177	V	Late	46.4	19.6	34.1	33.2	14.0	24.3	71.5	54	17	33	103
PI417073	V	Early	40.7	21.2	38.1	85.9	44.7	80.3	210.8	61	21	42	124
PI417073	V	Late	42.1	20.0	38.0	84.2	40.0	76.1	200.3	57	16	40	112
PI471938	V	Early	37.6	22.2	40.2	54.8	32.4	58.8	146.0	70	19	53	142
PI471938	V	Late	40.7	21.2	38.2	61.6	32.1	58.1	151.8	61	17	61	139
PI548654	V	Early	36.9	22.3	40.8	47.7	28.8	52.7	129.2	66	21	48	135
PI548654	V	Late	39.9	20.8	39.4	47.7	24.9	47.2	119.8	59	20	48	127
PI548987	V	Early	37.2	22.6	40.2	45.4	27.5	48.9	121.8	41	45	50	135
PI548987	V	Late	39.4	21.5	39.2	50.4	27.5	50.2	128.0	59	17	51	127
PI592906	V	Early	39.4	21.2	39.4	94.2	50.7	94.0	238.8	58	22	51	131
PI592906	V	Late	43.5	19.1	37.4	113.3	49.8	97.4	260.5	56	21	44	121
PI594922	V	Early	37.8	22.8	39.4	51.8	31.3	54.1	137.2	59	22	58	140
PI594922	V	Late	40.8	21.4	37.9	59.9	31.4	55.7	147.0	57	16	70	143
R95-1705	V	Early	43.9	20.9	35.3	68.3	32.5	54.9	155.7	50	35	50	135
R95-1705	V	Late	43.9	20.7	35.4	69.9	33.0	56.4	159.3	52	20	55	126
PI416937	VI	Early	40.2	21.0	38.8	58.5	30.5	56.4	145.3	60	24	60	144
PI416937	VI	Late	43.0	20.2	36.9	70.1	32.8	59.9	162.8	56	17	49	121
FC31572	V	Early	41.2	21.1	37.7	58.4	29.9	53.5	141.8	49	33	64	146
FC31572	V	Late	45.1	19.3	35.6	59.1	25.3	46.6	131.0	58	19	69	146

APÉNDICE III

Tabla A.III. Estadios fonológicos evaluados durante las campañas 2011/12 and 2012/13. “Comerciales” son genotipos con tamaño de grano y proteína promedio, “AP-Semilla grande” tienen alta concentración de proteína debido a alto contenido de proteína, y “AP-Semilla pequeña” son genotipos con alta concentración de proteínas por reducciones en los contenidos de aceite y carbohidratos. Los genotipos del 1 al 3 son “Comerciales”, desde el 4 al 6 son “AP semillas grandes” y del 7 al 9 son “AP semillas pequeñas”. El valor de DMS0.05 y el porcentaje de la suma de cuadrados total (%SC) fueron calculados para comparar interacciones significativas.

Fuente de variación		Días Siembra-R1	R1-R5	R5-R7	Siembra- R7
Tamaño de semilla					
	Comercial	39	31	48	118
	AP-Semilla grande	45	29	42	115
	AP-Semilla pequeña	62	31	36	130
Año x Tamaño de semilla					
2011	Comercial	42	31	48	121
	AP-Semilla grande	47	29	42	118
	AP-Semilla pequeña	68	34	35	137
2012	Comercial	36	31	48	114
	AP-Semilla grande	42	30	41	113
	AP-Semilla pequeña	56	29	38	123
Genotipo					
	1. DM3100	39	29	45	113
	2. NK34	39	33	51	123
	3. SPS3X1	39	30	48	117
	4. IA3011	38	29	39	105
	5. PI555396	43	33	42	117
	6. PI538376	53	26	45	124
	7. PI518757	63	33	32	128
	8. PI398970	61	31	38	130
	9. PI196177	63	30	39	132
Año x Tamaño de semilla					
2011/12	1. DM3100	42	29	44	114
	2. NK34	43	34	50	127
	3. SPS3X1	42	30	51	123
	4. IA3011	41	22	41	104

	5. PI555396	46	33	42	120
	6. PI538376	55	32	45	132
	7. PI518757	70	35	30	135
	8. PI398970	66	34	36	136
	9. PI196177	70	31	38	139
2012/13	1. DM3100	36	30	46	112
	2. NK34	36	32	52	120
	3. SPS3X1	37	30	45	112
	4. IA3011	35	35	36	107
	5. PI555396	40	33	42	115
	6. PI538376	51	21	46	118
	7. PI518757	57	31	34	121
	8. PI398970	56	28	39	123
	9. PI196177	56	29	40	125

Significancia estadística	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC
Año	***(1)	11.2	n.s.	2.6	n.s.	0.2	***(1)	20.1
Bloque(año)		1.3		14.7		3.6		0.5
Tamaño de semilla	***(2)	74.9	*(2)	5.2	***(1)	67.2	***(1)	41.8
Año x Tamaño de semilla	***(2)	2.1	** (2)	6.8	** (2)	2.4	***(1)	3.4
Genotipo (Tamaño de semilla)	***(3)	10.1	***(3)	20.2	***(2)	20.9	***(1)	29.4
Año x Genotipo(Tamaño de semilla)	n.s.	0.2	***(4)	50.5	** (3)	5.7	***(1)	4.8

APÉNDICE IV

Tabla A.III. Concentración (g kg^{-1}) y contenido (mg seed^{-1}) de las reservas de la semilla (proteína, aceite, residual) en genotipos con diferente tamaño de grano y concentración de proteína evaluados durante las campañas 2011/12 and 2012/13. “Comerciales” son genotipos con tamaño de grano y proteína promedio, “AP-Semilla grande” tienen alta concentración de proteína debido a alto contenido de proteína, y “AP-Semilla pequeña” son genotipos con alta concentración de proteínas por reducciones en los contenidos de aceite y carbohidratos. Los genotipos del 1 al 3 son “Comerciales”, desde el 4 al 6 son “AP semillas grandes” y del 7 al 9 son “AP semillas pequeñas”. El valor de $\text{DMS}_{0.05}$ y el porcentaje de la suma de cuadrados total (%SC) fueron calculados para comparar interacciones significativas.

Fuente de variación		Concentración de proteína (g kg^{-1})	Contenido de proteína (mg semilla^{-1})	Concentración de aceite (g kg^{-1})	Contenido de aceite (mg semilla^{-1})	Concentración de residual (g kg^{-1})	Contenido de residual (mg semilla^{-1})
Tamaño de semilla							
	Comercial	363	55.4	219	33.4	417	64.0
	AP-Semilla grande	432	84.3	200	39.1	368	72.9
	AP-Semilla pequeña	412	30.5	181	13.5	407	30.1
Año x Tamaño de semilla							
2011	Comercial	383	56.0	228	33.2	390	56.9
	AP-Semilla grande	447	81.9	213	39.1	340	62.6
	AP-Semilla pequeña	432	31.7	196	14.5	372	27.1
2012	Comercial	342	54.8	210	33.6	448	71.7
	AP-Semilla grande	419	86.4	187	39.0	394	82.4
	AP-Semilla pequeña	392	29.4	166	12.5	442	33.2
Genotipo							
	1. DM3100	353	53.0	223	33.6	424	64.4
	2. NK34	359	53.4	219	32.5	422	63.1
	3. SPS3X1	379	60.5	216	34.2	405	64.5
	4. IA3011	406	72.2	216	38.5	379	68.6
	5. PI555396	469	79.4	185	31.3	345	58.6
	6. PI538376	421	103.7	197	48.6	382	94.2

	7. PI518757	418	27.1	171	11.1	411	26.8						
	8. PI398970	413	39.0	187	17.6	401	37.7						
	9. PI196177	405	25.5	186	11.8	409	26.0						
Año x Tamaño de semilla													
2011/12	1. DM3100	379	53.7	230	32.6	392	55.5						
	2. NK34	377	53.9	230	32.9	394	56.3						
	3. SPS3X1	394	60.5	223	34.3	383	58.9						
	4. IA3011	431	68.2	222	35.1	348	55.0						
	5. PI555396	474	77.3	204	33.3	322	52.6						
	6. PI538376	435	106.2	214	52.2	352	85.9						
	7. PI518757	435	27.3	186	11.7	380	23.9						
	8. PI398970	435	41.6	204	19.5	361	34.4						
	9. PI196177	426	25.0	199	12.2	376	23.1						
2012/13	1. DM3100	326	52.4	216	34.7	457	73.2						
	2. NK34	342	53.0	208	32.2	451	69.9						
	3. SPS3X1	364	60.6	205	34.2	432	72.0						
	4. IA3011	380	76.1	210	42.0	410	82.2						
	5. PI555396	465	81.4	167	29.2	368	64.6						
	6. PI538376	410	101.8	185	46.0	405	100.4						
	7. PI518757	401	26.9	156	10.5	443	29.7						
	8. PI398970	390	36.3	169	15.7	440	41.0						
	9. PI196177	383	26.1	174	11.4	443	28.9						
Significancia estadística													
		Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC
	Año	*** (1)	21.4	n.s.	0.0	*** (1)	31.6	n.s.	0.1	*** (1)	60.0	*** (0.3)	8.7
	Bloque(año)	-	1.8	-	0.2	-	1.2	-	0.1	-	0.6	-	0.2
	Tamaño de semilla	*** (1)	54.6	*** (0.5)	86.6	*** (1)	48.9	*** (0.2)	84.3	*** (1)	30.8	*** (0.4)	73.3
	Año x Tamaño de semilla	n.s.	0.5	n.s.	0.2	*** (1)	0.7	n.s.	0.2	* (2)	0.8	*** (0.8)	1.3
	Genotipo (Tamaño de semilla)	*** (4)	19.8	*** (1.3)	12.6	*** (2)	15.7	*** (0.7)	13.3	*** (3)	7.0	*** (1.2)	15.7
	Año x Genotipo(Tamaño de semilla)	** (8)	1.9	n.s.	0.4	*** (3)	1.9	*** (1.4)	2.0	n.s.	0.8	** (2.4)	0.9

* Significativo al 0.05 nivel de probabilidad.

** Significativo al 0.01 nivel de probabilidad.

***Significativo al 0.001 nivel de probabilidad.

APÉNDICE V

Tabla A.IV: *Detalle de la metodología y calidad de las muestras de ARN similar a lo reportado por Bustin (2002).*

Item para controlar	Detalles
DISEÑO EXPERIMENTAL	
Definición de las unidades experimentales y los controles.	Ver sección de materiales y métodos capítulo IV.
Número dentro de cada grupo	La expresión génica fue analizada en tres repeticiones de campo en dos años (n=6). Diez plantas consecutivas fueron muestreadas en cada repetición de campo. Cada repetición de campo tuvo también tres repeticiones técnicas (para más detalle ver la sección materiales y métodos).
Ensayo realizado por el laboratorio central o el laboratorio del investigador?	Laboratorio del investigador
MUESTRA	
Descripción	Ver sección materiales y métodos capítulo IV
Volumen/ Peso de la muestra procesada	Cada unidad experimental se compuso de diez plantas. Se muestrearon todas las vainas de los tres nudos centrales del tallo principal, se colocaron inmediatamente dentro de bolsas plásticas herméticas y se almacenaron en hielo para el transporte hasta el laboratorio. Luego las semillas se separaron de los carpelos y entre 15-30 semillas fueron
Microdissección o macrodissección	
Procedimiento de procesado	
Si fue congelado – con qué y cuán rápido?	
Tiempo y condiciones de almacenamiento.	

	almacenadas en tubos de 1.5 ml e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido. Las muestras se procesaron en morteros estériles y 30 ng de tejido se usó para las extracciones de ARN (para más detalles ir a la sección materiales y métodos del capítulo IV).
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	
Procedimiento y/o instrumentación.	El ARN total de las semillas se extrajo usando “SV Total RNA System Kit” (Promega Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante. No se hizo ninguna modificación y no se usó reactivo adicional.
Nombre de los kit y detalles de las modificaciones si las hubiera.	
Reactivos adicionales usados	
Detalles de tratamiento con ADNasa o ARNasa.	La ADNasa fue proporcionada por el kit “SV Total RNA System Kit” (Promega Corporation).
Evaluación de contaminación (ADN o ARN)	No se detectó contaminación.
Cuantificación de ácidos nucleicos	Espectrofotometría
Instrumentos y método	Una dilución 5:50 se usó para medir con el espectrofotómetro PerkingElmer®Lambda Bio+.
Pureza (A260/A280)	La relación A260/280 fue generalmente 1.8 - 2.1 y la A260/230 fue 1.4 - 2.1.
Rendimiento	Entre 120 a 360 ng/μl en cada extracción de ARN (volumen 100 μl).
Integridad del ARN – metodología e instrumentos	La integridad se confirmó a través de un gel electroforesis 1.5% agarosa teñido SYBR® Safe- DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific).
Cq de los transcritos 3' y 5'	
Gel de electroforesis	

Test de inhibición (diluciones Cq , otros)	Ninguna inhibición se confirmó a través del análisis de diluciones de Cq.
TRANSCRIPCIÓN REVERSA	
Condiciones de la reacción.	De acuerdo con "iScript cDNA synthesis kit" para RT-PCR™ (BIO-RAD)
Cantidad de ARN y volumen de la reacción	20 µl de volumen de reacción que contenía 1.5 µg de ARN total.
Cebadores y concentración.	Oligo dT estaba previamente mezclado en la mezcla de reacción del kit "iScript cDNA synthesis kit" para RT-PCR™ (BIO-RAD)
Transcripción reversa y concentración	La concentración de la transcriptasa reversa no se especificaba en el kit "iScript cDNA synthesis kit" para RT-PCR™ (BIO-RAD).
Tiempo y temperatura	25°C por 5 minutos, 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos.
Fabricante de los reactivos y número de catálogo.	"iScript cDNA synthesis kit for RT-PCR™" (BIO-RAD) (Cat no# 170-8890).
Cq con y sin RT.	El amplicón del gen de la b-Tubulina se usó para evaluar la calidad del ADNc de cada retrotranscripción. Los Cq con RT estuvieron entre 26-29 (Factor de amplificación promedio: 1.8). Ninguna amplificación se detectó sin RT.
Condiciones de almacenamiento ADNc.	Almacenamiento a -20°C
INFORMACIÓN Y CONDICIONES DE LA RT-qPCR	
Si es PCR multiplex, eficiencia y LOD de cada experimento.	No se llevó a cabo qPCR Multiplex.

Numero de accesión de las secuencias.	Ver Tabla III.1.
Localización del amplicon	Exones
Longitud del amplicón	ACC 57 pb / DGAT 65 pb / AAP 66 pb / SUT 68 pb / ADPGP 133 pb / PEPC 61 pb/ B-Tubulin 110 pb
Control especificidad <i>In silico</i> (BLAST, etc) Pseudogenes, retropseudogenes u otros homologos? Alineamiento de las secuencias	Los amplicones no fueron secuenciados.
Análisis estructura secundaria del amplicón	No fue analizada.
Localización de cada cebador por exon o por intrón	Exones
CEBADORES para RT-qPCR	
Secuencia de los cebadores	Ver Tabla 1.
Análisis de especificidad de los oligonucleotidos	La especificidad de los cebadores se evaluó en contra de la base de datos de secuencias no redundantes de soja que se encuentran en “NCBI's Nucleotide collections” (www.ncbi.nlm.nih.gov)
Prueba de secuencias	Ninguno
Localización e identidad de alguna modificación.	Ninguno
Fabricante de los oligonucleotidos	Biosynthesis ^{INC.} (www.biosyn.com)
Método de purificación.	“Salt-free”
PROTOCOLO RT-qPCR	
Condiciones de la reacción.	Descripción en la sección material y métodos del capítulo IV.
Volumen de reacción y cantidad ADNc/ADN.	Volumen de reacción de 15 µl que contenía 3 µl de ADNc en la

	mezcla de reacción.
Primer, Mg ⁺⁺ y concentraciones de dNTP	La mezcla real para qPCR® Biodynamics, Argentina (http://www.biodynamics.com.ar/) contenía NTP, Mg ⁺⁺ , buffer, and Taq DNA Polimerasa. Las concentraciones no estaban disponibles.
Identidad y concentración de la polimerasa	
Fabricante y tipo de Buffer/kit	
Constitución química del buffer	
Aditivos (SYBR Green I, DMSO, etc.)	La Mezcla Real qPCR®, Biodynamics, Argentina contenía SYBR Green™ (http://www.biodynamics.com.ar/).
Fabricante de las placas/tubos y número de catálogo	qPCR strip tubes + caps 0.1 mL x 4 for Corbett RG-6000 and Qiagen RG-Q, Axygen™ (https://www.qiagen.com/ar/).
Condiciones de termociclado	Described in the methods section.
Preparación de la reacción (manual/robotica)	Manual
Fabricante del instrumento para llevar a cabo la qPCR	Qiagen (Rotor-Gene® Q con HRM- High Resolution Melting), https://www.qiagen.com/ar/ .
VALIDADCIÓN RT-qPCR	
Especificidad (gel, secuencia, hibridación, o digestión)	Los amplicones específicos se confirmaron por la presencia de un único pico en la curva de fusión (melting curve) resultante de la qPCR. La tasa de hibridación se estableció entre 72 a 94°C con una tasa fue de 0.2°C/ciclo, y una espera de 5 segundos en cada etapa. Las curvas de hibridación pudieron visualizarse con la aplicación “Melting” provista por el programa Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94) Copyright © 2008 Corbett Life Science.

Evidencias de optimización	No se construyeron curvas estándar.
Curvas estándar con pendiente y ordenada al origen	
Cálculo de la eficiencia de la PCR a partir de la pendiente.	Descripción en materiales y métodos del capítulo IV.
Intervalo de confianza para la eficiencia de la PCR o error estándar	No analizado.
r^2 de la curva estándar	No se construyeron curvas estándar.
Rango de la dinámica linear.	
Variación de Cq en el límite inferior	
Intervalos de confianza a lo largo del rango	
Evidencia para límite de detección	Valores de Cq después del ciclo 40 se consideraron fuera del rango de cuantificación confiable.
Si fue PCR multiplex, eficiencia y LOD para cada experimento.	No se llevó a cabo PCR multiplex.
ANÁLISIS DE DATOS	
Programa para los análisis de qPCR	Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94) Copyright © 2008 Corbett Life Science
Método para determinación del Cq	Ajustes por defecto del programa.
Identificación de valores atípicos (outliers)	Ningún dato fue excluido de los cálculos.
Justificación del número y elección del gen de referencia.	β -tubulina (Wang et al., 2006, 2007) .
Método de normalización	Ver sección material y métodos del capítulo IV.
Número y similitud de réplicas biológicas	Los valores de Cq fueron similares entre 3 réplicas biológicas.
Number and stage (RT or qPCR) of technical replicates	Se hicieron 3 retro transcripciones por cada muestra y 3

	réplicas técnicas por cada qPCR.
Repetibilidad	Para chequear la reproducibilidad, se llevaron a cabo qPCRT para el gen de la b-tubulina usando 3 réplicas técnicas por cada muestra de ADNc. Los Cq de la b-tubulina presentaron una desviación estándar de 1.3 bajo todas las condiciones. Además, los niveles de expresión de los genes analizados mostraron ser similares entre las 3 réplicas biológicas.
Reproducibilidad	
Potencia del análisis	Los análisis matemáticos y estadísticos se describieron en la sección materiales y métodos en el capítulo IV.
Método estadístico	
Programa	

Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29: 23–39.

Wang, H.W., J.S. Zhang, J.Y. Gai, and S.Y. Chen. 2006. Cloning and comparative analysis of the gene encoding diacylglycerol acyltransferase from wild type and cultivated soybean. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1086–97

Wang, H.W., B. Zhang, Y.J. Hao, J. Huang, A.G. Tian, Y. Liao, J.S. Zhang, and S.Y. Chen. 2007. The soybean Dof-type transcription factor genes, GmDof4 and GmDof11, enhance lipid content in the seeds of transgenic Arabidopsis plants. *Plant J.* 52: 716–729.

APÉNDICE VI

Tabla A.3.: Expresión normalizada para AAP, FPC, DGAT, ACC, ADPGP y TSAC para un genotipo AP-Semilla grande, un AP-Semilla pequeña y un Comercial evaluados durante los años 2011/12 y 2012/13. Se calculó la DMS a través del método de Fisher corregido por el método de Bonferroni. Se consideró un nivel de probabilidad del 0.05. La proporción de la suma de cuadrados que representó cada fuente de variación se expresó como % SC.

Fuente de variación	AAP	FPC	ADPGP	ACC	TSAC	DGAT						
Tamaño de semilla												
AP-Semilla grande	2.27	377	0.011	60.1	2.6	22.1						
AP-Semilla pequeña	0.55	148	0.016	35.2	1.0	12.5						
Comercial	2.20	386	0.009	69.7	1.9	25.9						
Año x Tamaño de semilla												
2011 AP-Semilla grande	2.71	533	0.012	73.2	1.5	45.1						
AP-Semilla pequeña	0.61	115	0.020	70.8	0.7	33.6						
Comercial	2.74	608	0.009	95.4	3.4	41.9						
2012 AP-Semilla grande	1.55	142	0.011	38.3	3.7	8.2						
AP-Semilla pequeña	0.50	174	0.012	9.7	1.2	3.4						
Comercial	1.58	208	0.008	37.5	0.4	9.9						
Statistical significance	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC	Valor P (DMS)	%SC
Año	*** (0.7)	18	*** (99)	13	n.s.	12	***(18.0)	75	n.s.	0	***(7.1)	58
Bloque(Año)	-	15	-	23	-	47	-	7	-	67	-	29
Tamaño de Semilla	***(0.9)	57	***(121)	26	* (0.007)	31	** (22.0)	14	n.s.	2	*(8.7)	5
Año* Tamaño de semilla	** (1.2)	11	***(171)	38	n.s.	10	n.s.	3	** (2.7)	31	** (12.3)	7

*Significancia al 0.05 nivel de probabilidad **Significancia al 0.01 nivel de probabilidad ***Significancia al a.0.001 nivel de probabilidad.