



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**“ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR EL VALOR AGREGADO DE LA  
PRODUCCIÓN DE SOJA ARGENTINA: IDENTIFICACIÓN DE REGIONES,  
TÉCNICAS DE MANEJO Y GERMOPLASMA PARA AUMENTAR LA  
CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DE PROTEÍNA EN GRANO”**

**Lina Belén Bosaz**

Ingeniera Agrónoma – Universidad Nacional de Rosario - Doctorando

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS AGRARIAS

**José Arnaldo Gerde**

Doctor of Philosophy –Iowa State University – Director

**José Luis Rotundo**

Doctor of Philosophy –Iowa State University – Codirector

**2020**

**ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR EL VALOR AGREGADO DE LA PRODUCCIÓN DE  
SOJA ARGENTINA: IDENTIFICACIÓN DE REGIONES, TÉCNICAS DE MANEJO Y  
GERMOPLASMA PARA AUMENTAR LA CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DE PROTEÍNA EN  
GRANO**

**Lina Belén Bosaz**

Ingeniera Agrónoma – Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora 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 el Instituto de Ciencias Agrarias de Rosario, durante el período comprendido entre abril del 2017 y octubre del 2020, bajo la dirección de José Arnaldo Gerde y la codirección de José Luis Rotundo.

**Lina Belén Bosaz**

Doctorando

**José Arnaldo Gerde**

Director

**José Luis Rotundo**

Codirector

Defendida el..... del 2021.

## **AGRADECIMIENTOS**

A José Gerde y José Luis Rotundo, por darme su apoyo y conocimientos durante este proceso.

A Lucas Borrás, por la oportunidad de trabajar en el GIMUCE. Por brindarme su conocimiento y experiencia durante estos años.

A Pablo Cipriotti, por su valiosa ayuda en el análisis espacial realizado en el Capítulo II de esta tesis doctoral.

A Santiago Gallo, Matías Campos, Luciano Ascheri y a los productores agropecuarios y asesores de AACREA por proporcionar las muestras de grano y los datos de manejo agronómico de los establecimientos productivos evaluados en el Capítulo II de la presente tesis.

A los miembros del GIMUCE, Brenda Gambín, Matías de Felipe, Gabriel Santachiara, Florencia Poeta, Lucas Vitantonio, Lucas Abdala, Nancy Caballero, Gonzalo Parra, Ezequiel Saenz, Ana Carcedo, Florencia Accame, Florencia Buldain, Mercedes Barat, Emelí Lopez y Federico Larrosa, por su apoyo y compañerismo.

A Guillermo Ravera, Gabriel Santachiara, Guido Di Mauro y Florencia Buldain por su ayuda en las actividades a campo en los experimentos del Capítulo III de esta tesis doctoral.

A Pablo Mortera por sus aportes realizados en las actividades de laboratorio que involucró el Capítulo IV de esta tesis doctoral.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario y al Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario, por brindarme sus instalaciones para desarrollar las actividades y análisis relacionados a esta tesis.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las becas otorgadas que permitieron dedicarme en forma exclusiva a este trabajo de tesis.

A mi familia por ser el soporte incondicional de todos mis proyectos.

## DEDICATORIA

*“A mis abuelos, que son mis pilares”*

## **PUBLICACIONES PRINCIPALES DERIVADAS DE ESTA TESIS**

### Trabajos científicos publicados en revistas con referato

**L. Bosaz**, J. Gerde, L. Borrás, P. Cipriotti, S. Gallo, L. Ascheri, M. Campos, S. Gallo, J.L. Rotundo. 2019. Management and environmental factors explaining soybean seed protein variability in central Argentina. *Field Crops Research*. 240, 34-43.

### Trabajos científicos enviados a revistas con referato

**L. Bosaz**, L. Borrás, J. A. Gerde, G. Santachiara, J.L. Rotundo. Late season N fertilization effects on soybean seed protein and biological N fixation. *Crop Science*.

### Trabajos de divulgación

**L. Bosaz**, J. Gerde, L. Borrás, P. Cipriotti, S. Gallo, L. Ascheri, M. Campos, S. Gallo, J.L. Rotundo. 2019. Proteína en soja, ¿Cuáles son los factores que permiten incrementarla? *Revista de la Asociación Argentina de Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola (AACREA)*. 463:45-48.

**L. Bosaz**, J. Gerde, L. Borrás, P. Cipriotti, S. Gallo, J.L. Rotundo. 2018. Tenor proteico en soja. *Revista de la Asociación Argentina de Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola (AACREA)*. 447:48-52.

### Contribuciones en congresos y reuniones científicas

**L. Bosaz**, J. Gerde, L. Borrás, P. Cipriotti, S. Gallo, L. Ascheri, M. Campos, S. Gallo, J.L. Rotundo. 2019. Caracterización regional y manejo para aumentar el porcentaje de proteína en soja. *VII Jornada de intercambio académico ámbito público- privado* INTA Oliveros, Oliveros, Marzo 2019.

J.L. Rotundo, **L. Bosaz**, J. Gerde, L. Borrás. Environmental and management factors associated with increased seed protein concentration in soybean. *ASSA and CSSA International Annual Meeting "Enhancing productivity in a changing climate"*. Baltimore, Noviembre 2018.

#### Participación en jornadas de divulgación

**L. Bosaz**, J. Gerde, L. Borrás, P. Cipriotti, S. Gallo, J.L. Rotundo. Factores de manejo y ambiente que explican la variación de la proteína en soja en la región central de Argentina. *Seminario "Reformular la soja para impulsar una cadena de conocimiento"*. Mercosoja. Bolsa de Comercio de Rosario, Rosario, Septiembre, 2019.

**L. Bosaz**, J. Gerde, L. Borrás, P. Cipriotti, S. Gallo, L. Ascheri, M. Campos, S. Gallo, J.L. Rotundo. 2019. Factores ambientales y de manejo que explican la variación de la proteína en soja en el centro de Argentina. *Comisión de Agricultura de la Asociación Argentina de Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola y Mesa de Planes Nacionales*. Capital Federal, Febrero 2019.

**L. Bosaz**, J. Gerde, L. Borrás, P. Cipriotti, J.L. Rotundo. Explorando la variación de la concentración de proteína de soja y su patrón espacial en Argentina. *Cámara Industrial de Extrusado y Prensado Santa Fe*. Bolsa de Comercio de Santa Fe, Santa Fe. Junio 2018.

**L. Bosaz**, J. Gerde, L. Borrás, P. Cipriotti, S. Gallo, J.L. Rotundo. Caracterización regional y manejo para aumentar la concentración de proteína en soja. Reunión de Comisión de *Agricultura de la Asociación Argentina de Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola (AACREA)*. Capital Federal, Buenos Aires. Noviembre, 2017.

**L. Bosaz**, J. Gerde, L. Borrás, P. Cipriotti, S. Gallo, J.L. Rotundo. Caracterización regional y manejo para aumentar la concentración de proteína en soja. *Seminario "El Desafío" de la Asociación de la Cadena de la Soja Argentina (ACSOJA)*. Bolsa de Comercio de Rosario, Rosario, Octubre 2017.

## INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
DEDICATORIA .....	4
PUBLICACIONES PRINCIPALES DERIVADAS DE ESTA TESIS .....	5
ABREVIATURAS, SIGNOS Y ANGLICISMOS.....	10
RESUMEN.....	13
ABSTRACT .....	15
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	17
1.1. JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES EN EL ESTUDIO DE LA CALIDAD DEL GRANO DE SOJA .....	18
1.1.1. <i>La importancia de la proteína del cultivo de soja</i> .....	18
1.1.2. <i>Variación regional de la concentración de proteína en granos de soja</i> .....	19
1.1.3. <i>Tecnologías de manejo que inciden en la concentración de proteína en grano</i> .....	20
1.1.4. <i>Agregado de valor a la proteína de soja a través de calidad diferencial</i> .....	21
1.1.5. <i>Estudio de germoplasma mejorado para concentración de proteína y calidad de uso</i> .....	22
1.2. OBJETIVOS.....	24
1.2.1. <i>Objetivo general</i> .....	24
1.2.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	24
1.3. HIPÓTESIS.....	25
1.4. ESTRUCTURA Y ENFOQUE APLICADO EN LA PRESENTE TESIS .....	26
CAPÍTULO II .....	27
2.1. INTRODUCCIÓN.....	28
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.2.1. <i>Área de estudio y sistemas de producción</i> .....	30
2.2.2. <i>Enfoque observacional, evaluación de lotes de producción</i> .....	30
2.2.3. <i>Análisis geo-estadístico para la base de datos de lotes de producción</i> .....	34
2.2.4. <i>Análisis de árboles de regresión para la base de datos de lotes de producción</i> .....	35
2.2.5. <i>Enfoque experimental utilizando ensayos multiambientales</i> .....	35
2.3. RESULTADOS .....	37

2.3.1. Variación en la concentración de proteína en grano, rendimiento y N en grano en los lotes de producción.....	37
2.3.2. Patrón espacial de concentración de proteína en grano en el centro de Argentina.....	38
2.3.3. Variables ambientales y de manejo asociadas con la concentración de proteína en grano en lotes de producción.....	38
2.3.4. Relevancia del genotipo en ensayos multiambientales.....	44
2.3.5. Relación entre rendimiento y concentración de proteína.....	48
2.4. DISCUSIÓN.....	51
2.5. CONCLUSIONES.....	56
CAPÍTULO III.....	58
3.1. INTRODUCCIÓN.....	59
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
3.2.1. Experimentos de campo.....	62
3.2.2. Diseño experimental y tratamientos.....	62
3.2.3. Variables medidas.....	63
3.2.4. Análisis estadístico.....	64
3.3. RESULTADOS.....	66
3.3.1. Rendimiento, número y peso de granos.....	66
3.3.2. Concentración de proteína en grano, absorción de N y FBN.....	68
3.4. DISCUSIÓN.....	76
3.5. CONCLUSIONES.....	79
CAPÍTULO IV.....	81
4.1. INTRODUCCIÓN.....	82
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	85
4.2.1. Materiales vegetales.....	85
4.2.2. Variables medidas.....	85
4.2.2.1. Concentración de proteína y aceite en grano.....	85
4.2.2.2. Obtención de harina de soja desgrasada.....	87
4.2.2.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).....	87
4.2.2.4. Perfil de solubilidad de proteínas.....	87
4.3. RESULTADOS.....	89

4.3.1. <i>Concentración de proteína y aceite en grano</i> .....	89
4.3.2. <i>Proporción de tegumento</i> .....	89
4.3.3. <i>Concentración de proteína en harina de soja</i> .....	91
4.3.4. <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)</i> .....	92
4.3.5. <i>Solubilidad proteica</i> .....	99
4.4. DISCUSIÓN.....	106
4.5. CONCLUSIONES .....	110
CAPÍTULO V .....	111
5.1. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS.....	112
5.2. CONTRASTE DE HIPÓTESIS ASOCIADAS A LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	117
5.3. IMPLICANCIAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES .....	119
5.3.1. <i>Efectos de la mejora de los sitios de producción sobre la concentración de proteína en grano</i> .....	119
5.3.2. <i>Efectos del mejoramiento genético sobre la fijación biológica de nitrógeno. Variación genética entre cultivares ancestrales y actuales</i> .....	120
5.3.3. <i>Evaluación de genotipos no GMO de alta proteína</i> .....	120
6. REFERENCIAS .....	122
ANEXO I.....	132
ANEXO II .....	141
ANEXO III .....	143

## ABREVIATURAS, SIGNOS Y ANGLICISMOS

\*\*\*; probabilidad asociada menor a 0,001

\*\*; probabilidad asociada menor a 0,01

\*; probabilidad asociada menor a 0,05

<; menor

>; mayor

°; grados decimales

°C; Grados centígrados

%; porcentaje

% SC; porcentaje de suma de cuadrados

~; aproximadamente

+; más

AACREA; Asociación Argentina de Consorcios Regionales de Experimentación Agropecuaria

AIC; Criterio de información de Akaike

BLUP ; mejor predictor lineal insesgado

b; pendiente de una recta

Bc;  $\beta$ -conglucina

b.s.; base seca

Cont.; contenido

Ec.; ecuación

EE; error estándar

et al.; del latín, y otros

ene.; enero

Ej.; ejemplo

FBN; fijación biológica de nitrógeno

Gli; glicinina

G.L.; grados de libertad

g; fuerza centrífuga relativa

ha; hectárea

HIPRO; alta proteína

kg; kilogramo

kriging; del inglés, krigeado

m; metro

máx; máximo

mín; mínimo

MJ m<sup>-2</sup>; Mega Joule por metro cuadrado

N; nitrógeno

n; número de datos

ns; no significativo

nov.; noviembre

P; fósforo

p; probabilidad asociada

pH; potencial hidrógeno

pl m<sup>-2</sup>; plantas por metro cuadrado

PP; precipitaciones

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación

R2; floración completa

R3; inicio de formación de vainas

R4; plena formación de vainas

R5; inicio del llenado de granos

R5.5; 50% de llenado de granos

R6; pleno llenado de granos

R7; madurez fisiológica

sep.; septiembre

T; temperatura

Teg; tegumento

x; por

# **ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR EL VALOR AGREGADO DE LA PRODUCCIÓN DE SOJA ARGENTINA: IDENTIFICACIÓN DE REGIONES, TÉCNICAS DE MANEJO Y GERMOPLASMA PARA AUMENTAR LA CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DE PROTEÍNA EN GRANO**

## **RESUMEN**

Argentina es uno de los principales países productores de granos y el primer exportador mundial de harina de soja, cuya concentración de proteína ha disminuido significativamente en los últimos años. En este contexto, conocer cuáles son los factores ambientales y de manejo que podrían revertir esta situación es clave para alcanzar los estándares de comercialización requeridos por las harinas de alta calidad con mayor demanda mundial. Los objetivos de esta tesis fueron: (i) describir los niveles de proteína en grano en los sistemas de producción templados de la región central de Argentina y explorar patrones espaciales de variación de proteína en toda la región, (ii) identificar la importancia relativa del manejo y los efectos ambientales en la concentración de proteína en grano complementando un enfoque observacional y experimental, (iii) explorar las correlaciones entre la concentración de proteína, el rendimiento y la captura total de N mediante el análisis de ensayos multiambientales en la región bajo estudio, (iv) evaluar el efecto de tratamientos de fertilización nitrogenada en estadíos tardíos del cultivo sobre la concentración de proteína, la FBN y la absorción de nitrógeno mineral, y si la cantidad de N absorbido o la FBN modula la respuesta de la proteína a la fertilización, (v) identificar genotipos de distintas etapas evolutivas del cultivo (cultivares ancestrales y comerciales actuales) con alta concentración de proteína en grano y calidad diferenciada en la composición de la fracción proteica y evaluar cómo esto influye en la solubilidad de las proteínas de las harinas de soja. Para cumplir el objetivo (i) se realizó de una aproximación observacional utilizando herramientas de minería de datos. La concentración de proteína en grano mostró un patrón espacial para soja de primera, lo que permitió identificar áreas bien delimitadas con valores proteicos contrastantes. No se observó un patrón espacial para soja de segunda. Para el objetivo (ii) y (iii) se utilizó un enfoque experimental analizando ensayos multiambientales a nivel regional. Se identificaron genotipos con alta concentración de proteína consistente a través de los sitios explorados. Los ambientes con alto rendimiento y calidad fueron evidentes, pero los resultados mostraron correlaciones negativas entre

rendimiento y concentración de proteína en grano. Los experimentos manipulativos (objetivo iv) consistieron en evaluar fertilizaciones nitrogenadas (foliar y del suelo) en estadios tardíos del ciclo del cultivo, en dos fechas de siembra y dos genotipos de alto rendimiento y concentración de proteína contrastante. Las fertilizaciones foliares o del suelo no tuvieron un aumento positivo en el rendimiento o la captura de N del cultivo, pero tuvieron efectos positivos similares en la concentración de proteína en grano (+2%) sólo en las fechas tardías en ambos genotipos. La aplicación de N en el suelo o como fertilizante foliar inhibió la FBN, pero la inhibición fue mayor cuando se aplicó N en el suelo. La cantidad de N fijada durante el período de llenado de grano, expresada por unidad de grano, es un predictor relativamente bueno de la respuesta de la proteína a la fertilización con N, lo que sugiere un papel crítico de la FBN durante esta etapa para asegurar altos niveles de proteína en grano. Para cumplimentar el objetivo (v) se realizó una caracterización de genotipos de diferentes etapas evolutivas de la soja respecto a la concentración y composición de proteína en grano, y se evaluaron la composición y los perfiles de solubilidad de la proteína de las harinas resultantes. Se encontraron diferencias significativas entre tipos y genotipos para la concentración, composición y solubilidad de la proteína. Los ancestros silvestres (*G. soja*) y Elite tuvieron las concentraciones máxima y mínima de proteína en grano, respectivamente (42,9 y 36,3%). Con respecto a la composición de la proteína, para la  $\beta$ -conglucina (Bc) y glicinina (Gli), el genotipo fue el efecto significativo que representó la mayor parte de variación, al igual que para sus subunidades. Dentro de los genotipos Elite, A5009 tuvo la menor solubilidad de proteínas en toda la escala de pH. El tipo Elite presentó una concentración de proteína más baja en grano y, por lo tanto, también en la harina resultante respecto a los tipos ancestrales. La incorporación de materiales ancestrales que amplíen la base genética utilizada en los programas de mejoramiento actuales es crucial para la obtención de productos de alta concentración y calidad proteica y para acceder a mercados de alto valor. Además, la caracterización de estrategias de manejo específicas, su rol en la calidad de los granos, y su potencial inclusión a nivel productivo resultan novedosas para un área de entendimiento clave y poco explorada hasta el momento.

**STRATEGIES TO INCREASE THE ADDED VALUE OF ARGENTINE SOYBEAN  
PRODUCTION: IDENTIFICATION OF REGIONS, MANAGEMENT OPTIONS AND  
GERMPLASM TO INCREASE CONCENTRATION AND PROTEIN QUALITY IN GRAIN.**

**ABSTRACT**

Soybean cropping systems from temperate regions are having seed protein levels below the standard required for industrial processing, threatening the soybean value. Management options to increase these levels are needed to reach market standards. Commercial soybean breeding has been focused traditionally on increasing seed yield. The narrow initial parental selection of most breeding programs has resulted in limited genetic diversity within commercial genotypes. The objectives of this thesis were: (i) to describe soybean seed protein in the central production systems of Argentina, (ii) to explore spatial patterns across the region, (iii) to quantify the importance of crop management and environment on protein concentration, and to explore correlations between seed protein concentration, seed yield, and total canopy N uptake, (iv) to evaluate the impact of late N fertilization treatments on soybean seed protein on different planting dates and cultivars, and (v) to identify genotypes from different evolutionary stages (ancestral and current commercial cultivars) with high concentration of protein in grain and differentiated quality in the composition of the protein fraction and to evaluate how these characteristics influence the solubility of the proteins in the resulting defatted soybean meals. The observational approach showed an existing spatial pattern for seed protein concentration in soybean as single crop. It allowed to identify well-delimited areas with contrasting protein values. Management variables accounted for ~73% of seed protein concentration variation in both crops. Cultivar trials identified consistent high seed protein cultivars. Sites with high yield and quality were also evident. Regarding soil or foliar N fertilizations, both had similar positive effects on seed protein concentration only in late planted crops for both cultivars. Applying N in the soil or as a foliar fertilizer inhibited BNF, but the inhibition was higher in the first one. The amount of N fixed during the seed filling period, expressed per unit seed, is a relatively good predictor of the response of seed protein. Differences in seed protein concentration, composition, and solubility were evident for genotypes within different evolutionary stages and among stages as well. Wild relative (*G. soja*) and Elite had the maximum and minimum seed protein concentrations, respectively. Within Elite cultivars, A5009 had the lowest protein solubility

throughout the pH scale. Modern elite type had lower protein concentration in the seed, and thus, in the resulting flour than the ancient types.

## CAPÍTULO I

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1. JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES EN EL ESTUDIO DE LA CALIDAD DEL GRANO DE SOJA

#### 1.1.1. La importancia de la proteína del cultivo de soja

Argentina se ubica como tercer productor mundial de soja, luego de Estados Unidos y Brasil (USDA, 2016). Con más de 16,9 millones hectáreas sembradas y una producción que supera los 49 millones de toneladas (MAGyP, 2020), esta oleaginosa es el principal cultivo extensivo de nuestro país. Su versatilidad como producto para alimentación humana y animal, su potencial para aplicaciones energéticas e industriales y su bajo costo en comparación a otras fuentes de proteínas son algunas de las razones que explican la fuerte demanda mundial, y la consecuente relevancia a nivel nacional. De esta manera, sea como grano o sus productos derivados (aceite y harina), sus exportaciones componen la principal entrada de divisas aportadas por el complejo agroindustrial (MAGyP, 2020).

Concentraciones contrastantes de proteína en el grano de soja producen harinas de diferentes calidades luego de su procesamiento industrial. Harinas de alta calidad, comúnmente denominadas "HIPRO" (con 47% de proteína) son las de mayor demanda a nivel mundial. Sin embargo, la industria argentina ha tenido serios problemas para alcanzar el nivel de proteína requerido en este subproducto debido a la baja concentración proteica del grano procesado, obligando a modificar la base de comercialización de la harina de soja de origen argentino de 47 a 46,5% de proteína, con 12,5% de humedad. (Cuniberti y Herrero, 2013). El tenor proteico promedio del grano producido en Argentina es de 36,1% (MAGyP, 2020), en tanto que Brasil, Paraguay y Bolivia superan este valor (Cuniberti et al., 2011). Esta situación plantea el desafío de aumentar la concentración de proteína de los granos producidos en los sistemas sojeros actuales, explorando potenciales causas de su variación a escala de producción.

Por otro lado, a pesar de que existen más de 50 usos alternativos para la harina de soja (Deak et al., 2008), actualmente el 98% de la harina producida se utiliza para la elaboración de alimentos balanceados. En este sentido, explorar otros usos alternativos puede mejorar la competitividad de dicho subproducto en los mercados, ampliando y/o posibilitando otras vías comerciales de alto valor agregado. Dichos mercados no sólo demandan altas concentraciones

de proteína, sino además estándares específicos de calidad de dicha fracción. De esta forma, para lograr acceder a este tipo de mercados es necesario conocer la calidad del grano de soja, entendida no solo como concentración de aceite y proteína, sino además como composición de la fracción proteica de la soja producida en Argentina.

### 1.1.2. Variación regional de la concentración de proteína en granos de soja

La elección del genotipo, las condiciones ambientales a las que es expuesto y la interacción entre ambos definen la concentración proteica que alcanza un grano de soja. Reportes previos han documentado qué proporción de la variación encontrada en proteína corresponde al genotipo, al ambiente o a su interacción. Por ejemplo, Dardanelli et al. (2006) en un estudio realizado a través de numerosos ambientes de Argentina demostraron que la mayor parte de las modificaciones en proteína y aceite se debe en gran medida a las variaciones del ambiente (38% de la variación), mientras que factores genéticos, como el grupo de madurez, explicaron un 14% de la variación total.

Por su parte, investigaciones realizadas por Rotundo y Westgate (2009) mostraron que para un mismo genotipo es factible encontrar variaciones en el contenido de proteína de hasta 6% asociados a factores ambientales a los que fue expuesto, tales como la disponibilidad hídrica, la temperatura y las condiciones nutricionales. En general, situaciones de stress hídrico durante el llenado incrementan la concentración de proteína en grano (Rotundo y Westgate, 2009), mientras que temperaturas por encima de 26°C durante la misma etapa fenológica, favorecen la acumulación de proteína en los granos de soja. Por su parte, Carrera et al. (2009) mostraron que existe interacción entre estos factores ambientales, es decir, los genotipos responden diferencialmente en la concentración de proteína frente a diferentes condiciones ambientales, identificando mayor complejidad en la determinación de la composición de los granos en los sistemas de cultivo.

Dichos factores que explican parte de las variaciones de proteína en soja, presentan variación en el espacio. Algunos de los factores ambientales pueden presentar cierto patrón detectable, siguiendo un gradiente latitudinal y/o longitudinal. De esta forma, junto a las variaciones regionales que existen en el rendimiento (Andrade y Satorre, 2015), es posible esperar que la concentración de proteína también muestre un patrón de segregación para

distintas regiones de producción del país. Existe información que muestra que en zonas más cálidas del norte argentino se produce soja con mayor concentración de proteína. Este patrón se presenta tanto a escala nacional cuando se comparan las regiones norte, pampeana norte, y pampeana sur (Cuniberti et al., 2011) como a escala provincial (Cordone et al., 2010). Sin embargo, no existen aproximaciones que hayan podido detectar y cuantificar dicha tendencia espacial en nuestro país mediante el modelado de datos. Esto permitiría generar mapas detallados que muestran zonas específicas con concentraciones de proteína diferenciales como los que existen en la actualidad en otros países productores (Naeve et al. 2008; Rotundo et al. 2016). Esta zonificación sería de gran utilidad para el complejo sojero nacional. A escala industrial, permitiría establecer rangos esperables de concentración de proteína que recibe la industria en función de su procedencia geográfica, permitiendo optimizar el proceso de molienda. Esta información también es útil al productor agropecuario ya que le permitirá entender cuál sería la concentración de proteína normalmente esperable en su zona/establecimiento productivo.

### 1.1.3. Tecnologías de manejo que inciden en la concentración de proteína en grano

La identificación y caracterización de regiones con concentraciones de proteína diferentes permitirá definir la línea de base esperable para un productor agropecuario establecido en una región determinada. Esta información a su vez, servirá como herramienta de diagnóstico para identificar si el productor está cosechando con valores de proteína promedio para su región o se encuentra por debajo o por encima del porcentaje esperable en dicho sitio. Explorar las decisiones de manejo del cultivo en uno u otro caso puede contribuir a identificar las variables de manejo más relevantes en la determinación de la concentración de proteína de soja en una región. Idealmente, para aumentar el valor de la producción de soja se deberían conocer las tecnologías de manejo óptimas que maximicen la concentración de proteína. Actualmente, se desconocen cuáles son esas prácticas de manejo y la bibliografía disponible hasta el momento muestra resultados variables.

Por ejemplo, Houx et al. (2014) ha estudiado el efecto que tienen la rotación de cultivos y distintos tipos de labranza sobre la composición del grano. También se ha evaluado qué impacto tiene modificar la fecha y densidad de siembra en los componentes del grano (Bellaloui et al. 2015). Otra variable de manejo como el espaciamiento entre surcos fue estudiada por

Moreira et al. (2015) e informó que su efecto en la concentración de proteína no es significativo. En cuanto a la fertilización, numerosos ensayos mostraron falta de respuesta de la concentración de proteína al aumento de la disponibilidad de fósforo (Krueger et al., 2013; Farmaha et al., 2012). La fertilización nitrogenada en la soja tiene efectos erráticos tanto en el rendimiento como en la concentración de proteína en grano (Salvagiotti et al., 2008; Rotundo y Westgate, 2009).

Sin embargo, cabe destacar que no abunda bibliografía que correlacione variables de manejo con calidad en soja a escala regional, desconociéndose actualmente si existen combinaciones de prácticas de manejo que permitan maximizar la concentración de proteína en los granos de soja. Dicha información es clave para guiar a los productores en la toma de decisiones en sus explotaciones comerciales.

#### 1.1.4. Agregado de valor a la proteína de soja a través de calidad diferencial

Actualmente la mayor proporción de la harina de soja producida es destinada a la alimentación animal. Sin embargo, el uso del grano de soja en procesos industriales alternativos está cobrando mayor relevancia año tras año (<http://soynewuses.org/>). En especial, las harinas de soja y sus derivados (concentrados y aislados proteicos, texturizados, por ejemplo.) tienen un sinnúmero de usos en la formulación de productos de alto valor tales como salsas, aplicaciones panaderas, reemplazo de proteínas de huevo, formulación de sustitutos lácteos, formulación de productos cárnicos y a base de pescado, ingrediente en dietas para celíacos, bebidas y barras proteicas, además de usos en aplicaciones industriales no alimenticias como adhesivos y plásticos (Deak et al, 2008). La producción de materias primas para este tipo de alternativas comerciales e industriales no está siendo totalmente explotada en nuestro país.

Además de su valor nutricional, la proteína de soja proporciona propiedades funcionales únicas para procesos industriales. En general, la solubilidad de las proteínas se considera un indicador de la funcionalidad de las mismas (Kinsella et al., 1979). Las tecnologías de procesamiento de la harina de soja se han desarrollado ampliamente para producir subproductos proteicos altamente solubles como los aislados. La producción de aislados de proteína de soja se basa en la solubilidad diferencial de las proteínas en condiciones de pH contrastantes (es decir, extracción a pH alcalino y precipitación a pH isoelectrico). Además, la

solubilidad de las proteínas y los gramos de proteína solubilizada por gramo de harina tiene alta correlación con la composición del grano, que a su vez es dependiente del ambiente, el manejo agronómico y la genética elegida. En la actualidad se desconoce cuál es la magnitud y el efecto directo de estos factores agronómicos sobre la solubilidad.

Glicinina (Gli) y  $\beta$ -conglucina (Bc) son las proteínas de reserva en el grano de soja que se encuentran en mayor proporción (Kinsella, 1979). De acuerdo al sistema de clasificación de las proteínas según su solubilidad se las ubica entre las globulinas, responsables de las propiedades funcionales de los productos formulados a partir de proteína de soja: harina, concentrados y aislados proteicos. En general, se acepta que la proporción de Bc y Gli es 35 y 52%, respectivamente. Sin embargo, existen genotipos que favorecen la producción de una fracción por sobre la otra (Pesic et al., 2005; Fehr et al., 2003). Las propiedades funcionales de los productos elaborados a base de proteína de soja son altamente dependientes de la proporción de estas dos fracciones (Pesic et al., 2005). El aumento de Bc determina un aumento en la proteína soluble extraíble, que lleva a una mayor extractabilidad total de la proteína. Por su parte, el aumento de Gli produce una mejora nutricional por el aumento en la concentración de aminoácidos azufrados (cisteína y metionina), limitantes del complejo proteico de la soja (Murphy, 2008). Para lograr acceder a nuevos mercados relacionados a proteína de soja de alto valor agregado es fundamental conocer la calidad proteica y la funcionalidad de las harinas producidas en el país.

#### 1.1.5. Estudio de germoplasma mejorado para concentración de proteína y calidad de uso

El desarrollo de genotipos con alta concentración de proteína ha sido un objetivo del mejoramiento desde hace muchos años (Wilson, 2004). De hecho, la selección por alta concentración proteica en soja es a menudo exitosa (Morrison et al., 2000; Orf et al., 2004), sin embargo, los incrementos están usualmente asociados con bajos rendimientos (Hartwig y Hinson, 1972; Helms y Orf, 1998). Además, la estrecha selección parental inicial de la mayoría de los programas de mejoramiento ha dado como resultado una diversidad genética limitada dentro de los genotipos comerciales utilizados actualmente (Brown-Guedira et al., 2001, de Felipe et al., 2016). A nivel genético, existe una correlación negativa entre el rendimiento y la proteína en grano (Rotundo et al., 2009). Los mecanismos que rigen dicha correlación no son claros por lo que un mejor entendimiento de las bases genéticas y/o fisiológicas que determinan

estos atributos permitiría romper dichas correlaciones. El estudio de genotipos de soja no domesticados y ancestrales con concentración de proteína más alta que la observada en los genotipos utilizados actualmente es información clave para poder ampliar la base genética de partida. De esta manera, mediante su inclusión en los programas de mejoramiento, se podrían lograr aumentos de la concentración de proteína en grano mientras se mantienen rendimientos competitivos a través de la mejora de otras variables relacionadas a la resistencia a factores bióticos y abióticos (Kim et al., 2011; Leamy et al., 2017; Kofsky et al., 2018). Sin embargo, la composición proteica y la funcionalidad de las harinas de genotipos provenientes de diferentes etapas evolutivas no se han caracterizado completamente. Contar con esta información es crítico para identificar genotipos cuya proteína permita la obtención de productos con propiedades funcionales y nutricionales específicas, conforme a la demanda industrial. El desarrollo de cultivares de soja superiores mediante la incorporación de genes / alelos de *G. soja* es una solución prometedora y ecológica para mejorar, moderar o prescindir de pesticidas y fertilizantes para el cultivo.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. *Objetivo general*

El objetivo general de la tesis es describir la variabilidad y calidad de la proteína en soja. Así como también identificar variables ambientales y de manejo agronómico que permitan maximizar la concentración de proteína en grano, con la consecuente mejora de la calidad de las harinas proteicas resultantes.

### 1.2.2. *Objetivos específicos*

Objetivo específico 1: describir los niveles de proteína en grano en los sistemas de producción templados de la región central de Argentina y explorar patrones espaciales de variación de proteína en toda la región.

Objetivo específico 2: identificar la importancia relativa del manejo y los efectos ambientales sobre la concentración de proteína en grano complementando un enfoque observacional y experimental.

Objetivo específico 3: explorar las correlaciones entre la concentración de proteína, el rendimiento y la captura total de N mediante el análisis de ensayos multiambientales en la región bajo estudio.

Objetivo específico 4: evaluar el efecto de tratamientos de fertilización nitrogenada en estadios tardíos del cultivo sobre la concentración de proteína, la FBN y la absorción de nitrógeno mineral, y si la cantidad de N proveniente de la absorción mineral o la FBN modula la respuesta de la proteína a la fertilización.

Objetivo específico 5: Identificar genotipos de distintas etapas evolutivas del cultivo (cultivares ancestrales y comerciales actuales) con alta concentración de proteína en grano y calidad diferenciada en la composición de la fracción proteica y evaluar cómo esto influye en la solubilidad de las proteínas de las harinas de soja.

### **1.3. HIPÓTESIS**

Hipótesis 1: La interacción clima, genotipo y manejo determina la existencia de regiones productivas que consistentemente expresan un mayor porcentaje de proteína comparada con otras regiones.

Hipótesis 2: A pesar de existir una determinante regional, existen opciones de manejo que posibilitan maximizar la concentración de proteína en grano.

Hipótesis 3: Existe una correlación negativa entre rendimiento y proteína. A mayor captura total de N mayor es la concentración de proteína en grano.

Hipótesis 4: Los genotipos de alta concentración de proteína y siembras tardías mostrarán menores aumentos de dicha concentración después de las fertilizaciones nitrogenadas porque comúnmente muestran una mayor disponibilidad de N por grano en crecimiento.

Hipótesis 5: En estadios evolutivos más tempranos se encontrará mayor concentración de proteína que en los actuales por no haber sido sujeto a selección por rinde. Esto además impactará sobre la composición y la solubilidad de las proteínas de las harinas derivadas.

#### **1.4. ESTRUCTURA Y ENFOQUE APLICADO EN LA PRESENTE TESIS**

Para cumplir con los objetivos específicos, la presente tesis doctoral está planteada en tres capítulos anexos al presente introductorio. En el capítulo II se realizó una aproximación observacional a partir de registros históricos de producción de soja de la zona central de Argentina. Se caracterizaron los sistemas productivos en base a sus prácticas de manejo y condiciones ambientales exploradas. Esto permitió cuantificar el rango de concentración de proteína en grano en una amplia región del país identificando aquellos factores con mayor impacto en su variación. A su vez, se exploraron patrones espaciales dentro de la región bajo estudio, identificando zonas con valores diferenciales de proteína en grano. Los resultados obtenidos en dicho capítulo permitirán contar con información certera respecto a factores ambientales y de manejo específicos para maximizar la concentración proteica a nivel regional (Objetivos específicos 1, 2 y 3)

En el capítulo III, se llevó a cabo una aproximación experimental en microparcels que evaluó distintos tratamientos de fertilización nitrogenada en etapas reproductivas del ciclo del cultivo en dos fechas de siembra (Objetivo específico 4). Esta segunda sección presenta un estudio enfocado en explorar el efecto de la fertilización nitrogenada sobre la composición y calidad de los granos de soja. A su vez, la variación en concentración proteica fue explicada y relacionada con distintos procesos fisiológicos como la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y la captura total de nitrógeno por parte del cultivo.

Por último, en el capítulo IV se caracterizaron genotipos de diferentes etapas evolutivas para identificar diferencias relacionadas tanto a la concentración como a la composición de proteína en grano, y evaluar cómo esto influye en la solubilidad de las harinas proteicas resultantes (Objetivo específico 5).

## CAPÍTULO II

# FACTORES AMBIENTALES Y DE MANEJO QUE EXPLICAN LA VARIACIÓN DE LA PROTEÍNA EN SOJA EN EL CENTRO DE ARGENTINA

---

El contenido de este capítulo fue publicado en: **L. Bosaz**, J. Gerde, L. Borrás, P. Cipriotti, S. Gallo, L. Ascheri, M. Campos, S. Gallo, J.L. Rotundo. 2019. Management and environmental factors explaining soybean seed protein variability in central Argentina. *Field Crops Research*. 240, 34-43.

## **2. FACTORES AMBIENTALES Y DE MANEJO QUE EXPLICAN LA VARIACIÓN DE LA PROTEÍNA EN SOJA EN EL CENTRO DE ARGENTINA**

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

Argentina es el tercer productor mundial de soja y el mayor exportador de su harina (FAO, 2018). La harina de soja, el subproducto de alto valor de la extracción del aceite, es utilizado principalmente para la alimentación animal. Los mercados mundiales exigen harinas de soja con una concentración de proteína de 47,5-49,0% (Guinn, 2002). Sin embargo, los déficits de proteína en grano que se observan con frecuencia en diferentes regiones dificultan o impiden la producción de harinas con alta concentración de proteína requerida por los mercados internacionales. Eventualmente, se alcanzan estándares comerciales pero a expensas de incurrir en costos adicionales (por ejemplo, secado o descascarado; Johnson, 2000). Cuando no se alcanzan las pautas preestablecidas, las condiciones comerciales deben ser renegociadas, lo que resulta en reducciones sustanciales de precios. Actualmente, Argentina enfrenta estos problemas y costos adicionales debido a las constantes reducciones de la concentración de la proteína de soja (CAC, 2018).

La variación espacial en la concentración de proteína en grano fue documentada a escala de lote de producción (Kravchenko y Bullock, 2002) y a escala regional (Rotundo et al., 2016). La segregación de la producción de soja basada en la composición de los granos esperada es una herramienta muy útil para alcanzar los objetivos de comercialización. Sin embargo, no hay información disponible sobre si tales patrones de variación espacial también existen en la región central de Argentina. Patrones espaciales de rendimiento del cultivo de soja (Andrade et al., 2015; Di Mauro et al., 2018) se documentaron para Argentina, pero la distribución espacial de la composición de los granos aún no está disponible. Los datos preliminares mostraron que la concentración de proteína en grano disminuye de norte a sur en Argentina (Maestri et al., 1998; Cuniberti et al., 2004). Ampliar esta información ayudará a identificar regiones con una baja o alta concentración de proteína constante a lo largo de los años, ayudando a la toma de decisiones de la industria.

Además de la necesidad de identificar regiones con alta concentración de proteína, también es relevante caracterizar los genotipos, los ambientes y las prácticas de manejo asociadas con el aumento de proteína en grano. Las condiciones ambientales durante la etapa de crecimiento, junto con los factores genéticos y las decisiones de manejo

agronómico, determinan una porción sustancial de la variación en la concentración de proteína en grano (Medic et al., 2014). Los aumentos en el rendimiento del cultivo asociados con la mejora genética, se relacionaron con la dilución de la proteína en grano en genotipos de alto rendimiento (de Felipe et al., 2016; Morrison et al., 2000; Wilcox y Shibles, 2001). Estudios previos han demostrado que el grupo de madurez y la fecha de siembra son otras dos prácticas de manejo relevantes que determinan la concentración de proteína en grano (Mourtzinis et al., 2017). Entre los factores ambientales, la disponibilidad hídrica y la temperatura del aire son variables que afectan la variación de la concentración proteica (Naeve y Huerd, 2008; Carrera et al., 2009; Rotundo y Westgate, 2009). La interacción del manejo agronómico y el ambiente también impacta sobre los niveles de proteína. Por ejemplo, Dardanelli et al. (2006) encontraron que el 18% de la variación asociada a la concentración de proteína en grano correspondió a los efectos de la interacción del grupo de madurez y el ambiente.

La soja en el centro de Argentina se produce como un solo cultivo durante la campaña agrícola (de ahora en adelante "soja de primera") o como un cultivo de ciclo más corto después de una cosecha de invierno ("soja de segunda"). Tanto para la soja de primera como para la de segunda, los objetivos de este estudio fueron: (i) describir los niveles de proteína en grano en los sistemas de producción templados de la región central de Argentina y explorar patrones espaciales de variación de proteína en grano en toda la región, (ii) identificar la importancia relativa del manejo y los efectos ambientales en la concentración de proteína en grano, y (iii) explorar las correlaciones entre la concentración de proteína, el rendimiento y la captura total de N. Para lograr estos objetivos, se analizaron muestras de lotes de producción y muestras de ensayos multiambientales distribuidos en toda la región. Se complementaron enfoques observacionales y experimentales para identificar factores relevantes asociados con los niveles de proteína en grano. La meta fue definir acciones para abordar los esquemas de producción actuales y así lograr una alta concentración de proteína en grano y altos rendimientos.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Área de estudio y sistemas de producción

El área de estudio fue la región central de Argentina. El clima es templado-monzónico con temperaturas medias del aire que disminuyen de norte a sur. Las precipitaciones disminuyen de 1.000 a 500 mm de este a oeste (Hall et al., 1992). La soja se siembra comúnmente después de un período de barbecho de otoño / invierno, y se conoce como "soja de primera". También se puede sembrar después de la cosecha de un cultivo de invierno, y se conoce comúnmente como "soja de segunda". La época del cultivo para soja de primera normalmente es de octubre a febrero; para la soja de segunda normalmente es de diciembre a marzo (Andrade y Satorre, 2015). El área cultivada con soja en Argentina cubre más de 20 millones de hectáreas cada año. La proporción de esta área cultivada con soja de segunda varía, dependiendo de múltiples factores, del 6,5 al 21% cada año (Andrade y Satorre, 2015).

Se generaron dos bases de datos independientes para la soja de primera y de segunda con datos de 2012 a 2016: (i) base de datos de lotes de producción, y (ii) base de datos de ensayos multiambientales. Las muestras de granos y la información de manejo fueron proporcionadas por productores y asesores miembros de AACREA (Asociación Argentina de Consorcios Regionales para la Experimentación Agrícola). Los productores de AACREA registran las decisiones de manejo de cultivos de sus lotes de producción comercial. También realizan experimentos de campo para generar innovaciones en el manejo de cultivos con el objetivo de optimizar la producción.

### 2.2.2. Enfoque observacional, evaluación de lotes de producción

Cada unidad de observación corresponde a un lote de producción individual manejado de forma independiente durante un año en particular (a partir de ahora lotes de producción). La base de datos de lotes de producción involucró 1.294 y 427 observaciones de 2012 a 2016 para sojas de primera y de segunda, respectivamente. Los lotes fueron georeferenciados usando coordenadas de latitud y longitud. Se obtuvo una muestra de ~1 kg de grano de cada lote en la cosecha. La concentración de proteína en grano (%) se determinó mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR5000, Foss, Dinamarca) y se informó sobre base seca. Las ecuaciones de calibración fueron desarrolladas por la Universidad

Nacional de Rosario en cooperación con Foss Argentina. La calibración se desarrolló utilizando 163 muestras. El coeficiente de determinación de la calibración ( $R^2$ ) fue de 0,92, y el error estándar de calibración (EEC) fue de 0,65. El error estándar de validación cruzada (EEVC) fue 0,68, y el coeficiente de determinación de validación cruzada (1-VC) fue 0,91. El rendimiento ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) se informó en base seca. El nitrógeno total cosechado ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) se calculó usando el rendimiento y la concentración de proteína en grano, y dividido por 6,25 (Jung et al., 2003).

Se registraron las siguientes variables de manejo para cada lote de producción: genotipo, grupo de madurez, fecha de siembra, cultivo antecesor, espaciamiento entre surcos, inoculación, uso de fertilizantes fosforados y aplicaciones de fungicidas foliares. La Tabla 2.1 describe las variables de manejo evaluadas. Para cada lote individual se obtuvieron las siguientes variables ambientales: temperatura media mensual del aire ( $^{\circ}\text{C}$ ), radiación acumulada mensual y total durante la estación de crecimiento del cultivo ( $\text{MJ m}^{-2}$ ), y precipitaciones acumuladas mensuales y totales durante la estación de crecimiento del cultivo (mm).

La concentración de proteína en grano es el resultado final de múltiples procesos que tienen incidencia no solo durante el período de llenado de granos sino también durante otras etapas de crecimiento que finalmente afectan el rendimiento. Por lo tanto, incluimos variables climáticas durante todo el ciclo del cultivo para tener en cuenta cualquier posible efecto. Estos datos se obtuvieron de estaciones meteorológicas públicas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina (<http://inta.gob.ar>) (Aramburu Merlos et al., 2015; Verón et al., 2015). En los casos de registros de radiación faltantes, se consultaron datos de predicción de los recursos mundiales de energía de la Administración Nacional de Aeronáutica y del Espacio (<http://power.larc.nasa.gov>). La Tabla 2.2 describe todas las variables ambientales analizadas.

**Tabla 2.1.** Variables de manejo registradas para cada lote de producción de soja analizado (como soja de primera y de segunda). La información de manejo corresponde a los lotes de producción agrícola de la región central de Argentina.

Variable	Tipo	Unidad	Rango explorado	
			Soja de primera	Soja de segunda
Genotipo	Cualitativa		A5009, DM3810, DM4612, DM4670 <sup>a</sup>	A5009, DM4250, DM4612, DM4670 <sup>a</sup>
Grupo de madurez	Cualitativa	000 a X	III-VII	III-VI
Cultivo antecesor	Cualitativa		Maíz, soja, sorgo, girasol.	Trigo, cebada, arveja.
Fecha de siembra	Cuantitativa	fecha	sep. 29-ene. 2	nov. 1-ene. 4
Espaciamiento entre surcos	Cuantitativa	m	0,26-0,52	0,21-0,52
Fertilización fosforada	Cualitativa	Si/No		
Fungicida foliar	Cualitativa	Si/No		
Inoculación	Cualitativa	Si/No		

<sup>a</sup>, genotipos más frecuentes en la base de datos. Todos los genotipos incluidos en el análisis de lotes de producción se pueden observar en las figuras 2.2 y 2.3.

**Tabla 2.2.** Ubicación y rango de ambientes explorados para el estudio de lotes de producción analizados en la región central de Argentina.

Variable	Tipo	Unidad	Rango explorado
<b>Latitud</b>	Cuantitativa	Grados	-31,8 a -36,3
<b>Longitud</b>	Cuantitativa	Grados	-61,7 a -65,1
<b>Precipitaciones acumuladas</b>	Cuantitativa	Mm	
Octubre			0 - 125
Noviembre			0 - 221
Diciembre			0 - 261
Enero			0 - 311
Febrero			0 - 284
Marzo			0 - 167
Precipitaciones totales			0 - 1.099
<b>Radiación acumulada</b>	Cuantitativa	MJ m <sup>-2</sup>	
Octubre			297 - 760
Noviembre			264 - 831
Diciembre			197 - 912
Enero			124 - 927
Febrero			100 - 728
Marzo			151 - 640
Radiación total			1.363 - 4.801
<b>Temperatura promedio</b>	Cuantitativa	°C	
Octubre			11 - 24
Noviembre			18 - 24
Diciembre			21 - 27
Enero			21 - 28
Febrero			17 - 25
Marzo			16 - 25

### 2.2.3. Análisis geo-estadístico para la base de datos de lotes de producción

Se realizó un análisis geo-estadístico para explorar la variación espacial respecto a la concentración de proteína en grano en toda la región. Las coordenadas geográficas se proyectaron en coordenadas planares usando la zona UTM H20. Para describir el patrón espacial de la proteína en grano, se adoptó un enfoque de campo aleatorio para una variable continua en un espacio  $R^2$  continuo (Goovaerts, 1997). Se exploraron tendencias espaciales a gran escala ajustando regresiones no paramétricas suaves entre la proteína en grano, las coordenadas planares y la elevación topográfica. También se exploraron supuestos de campos distribucionales y aleatorios (estacionariedad y continuidad) para la proteína en grano. La auto-correlación de la proteína (residual en caso de que se detecte una tendencia significativa) se evaluó mediante un variograma omnidireccional directo. El variograma se exploró en una extensión máxima de 250 km (es decir, menos de un tercio de la diagonal del cuadro delimitador del área muestreada) y una resolución espacial de 5 km que garantiza al menos cientos de observaciones apareadas para cada distancia analizada. La semi-varianza de la muestra se estimó mediante un método robusto de acuerdo con Cressie y Hawkins (1980) (Ec. 2.1):

$$2\gamma_{CH}(h) = \frac{1}{C_h} \left[ \left( \frac{1}{N_h} \sum_1^{N(h)} |Z_{xi} - Z_{xj}|^{\frac{1}{2}} \right)^4 \right]$$

dónde  $\gamma(h)$  representa semi-varianza para una clase de distancia espacial específica  $h$ , y  $Z$  representa la variable aleatoria en diferentes ubicaciones. En este caso, la proteína en grano estimada en los sitios  $X_i$  y  $X_j$ ,  $N_h$  es el número de todos los pares de sitios separados por la distancia  $h$ , y  $C_h$  es un factor de corrección para el sesgo en la variable  $Z$  calculada como Ec. 2.2:

$$C_h = 0.457 + \frac{0.494}{N_h} + \frac{0.494}{N_h^2}$$

Los modelos exponenciales, esféricos y de onda fueron ajustados por el método de mínimos cuadrados y seleccionados según la suma residual de cuadrados después de obtener variogramas empíricos omnidireccionales para cultivos de soja de primera y de segunda. Se utilizó la interpolación por *kriging* ordinario para predecir la concentración de

proteína de grano en una nueva cuadrícula más fina que la original (2/3 más fina que la resolución espacial empleada en la muestra original). Esto se realizó después de ajustar un modelo espacial regionalizado (tendencia + autocorrelación) para caracterizar la estructura espacial particular de cada cultivo. Los paquetes *sp* (Bivand et al., 2013) y *rgdal* (Bivand et al., 2016) se utilizaron en el programa R. El paquete *gstat* R se utilizó para calcular los variogramas empíricos, ajustar los modelos y aplicar las técnicas de interpolación (Pebesma, 2004).

#### 2.2.4. Análisis de árboles de regresión para la base de datos de lotes de producción

Las variables ambientales y de manejo (Tablas 2.1 y 2.2) fueron asociadas a la concentración de proteína en grano mediante un análisis de árboles de regresión (Breiman et al., 1984). Los datos de soja de primera y de segunda se analizaron por separado. El análisis utiliza una técnica de partición binaria recursiva para separar la variación en la variable respuesta (es decir, la concentración de proteína en grano) al dividir repetidamente los datos en grupos más homogéneos, utilizando combinaciones de variables explicativas (Ej., genotipo o temperatura mensual promedio). El valor *LogWorth* es una medida de significancia estadística definida como  $-\log_{10}$  (valor P). Usamos esto para definir los criterios de división ya que cada división debería maximizar sus diferencias. El número mínimo de observaciones para cada nodo terminal se estableció en 120 y 40 para la soja de primera y de segunda, respectivamente. Esta fue una decisión arbitraria basada en la premisa de tener al menos el 10% de las observaciones iniciales en los nodos terminales. Este valor del 10% de observaciones en los nodos terminales representa el número de nodos en los que la explicación incremental del modelo cae a cero. Esto significa que agregar más nodos no aumentará la explicación de la variable respuesta. La misma aproximación se utilizó en Di Mauro et al. (2018). Los árboles de regresión se construyeron utilizando el software JMP (versión 13.1.0, SAS Institute Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

#### 2.2.5. Enfoque experimental utilizando ensayos multiambientales

Se realizaron ensayos multiambientales probando genotipos en diferentes ambientes durante las campañas agrícolas 2014/15 y 2015/16. La base de datos incluyó, combinando ubicaciones y años, un total de 43 sitios para soja de primera y 9 para soja de segunda. La Figura Suplementaria 2.1 muestra la distribución geográfica de todos los sitios en la región,

y la Tabla Suplementaria 2.1 describe la ubicación geográfica exacta de cada uno, junto con el número de genotipos evaluados. Cada experimento tuvo un promedio de 13 genotipos. El tamaño de la parcela varió para cada sitio, oscilando entre seis y trece surcos de ancho y entre 200 y 300 m de longitud. Se utilizó un diseño aleatorio completo con al menos dos repeticiones en cada ensayo. Todos los ensayos se manejaron utilizando la tecnología agrícola disponible (siembra, pulverización y cosecha), y representan los sistemas de producción de soja utilizados actualmente en Argentina. En consecuencia, el manejo agronómico de cada ensayo (por ejemplo, fecha de siembra, espaciamento entre surcos y densidad) varió entre los sitios.

El rendimiento ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) se obtuvo de una cosechadora comercial y se informó sobre base seca. El N en grano total cosechado ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) se calculó multiplicando el rendimiento y la concentración de proteína en grano, y se dividió por 6,25 (Jung et al., 2003). Se obtuvo una muestra de  $\sim 1$  kg de grano de cada parcela cosechada. La concentración de proteína en grano (%) se determinó mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR5000, Foss, Dinamarca) y se informó sobre base seca. Las ecuaciones de calibración fueron desarrolladas por la Universidad Nacional de Rosario en cooperación con Foss Argentina.

Los ensayos multiambientales se analizaron utilizando modelos de efectos mixtos (Zuur et al., 2009). Esto permitió cuantificar la contribución relativa del genotipo, el sitio y su interacción en la concentración de proteína en grano, el rendimiento y la variación del N exportado en grano. La estimación del modelo estadístico incluyó los factores genotipo, sitio y la interacción genotipo x sitio como efectos aleatorios. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete *lme4* (Bates et al., 2015) en R (R Development Core Team, 2015). La contribución del componente de varianza (%) se calculó como su contribución relativa a la varianza total explicada por el modelo general (Hall et al., 2013). El uso de modelos mixtos permitió tratar componentes aleatorios y desequilibrios de la base de datos, por ejemplo, no todos los sitios tenían los mismos genotipos (Hall et al., 2013). El mejor predictor lineal insesgado (BLUP; Robinson, 1991) se calculó para predecir la variación del cultivo en diferentes sitios. El análisis de correlación se utilizó para explorar la relación entre el rendimiento y la concentración de proteína usando GraphPad Prism V5.0 (Radushev, 2007).

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Variación en la concentración de proteína en grano, rendimiento y N en grano en los lotes de producción

Se encontró una variación significativa en la concentración de proteína en grano, rendimiento y N total en toda la región central de Argentina. La concentración de proteína en grano en los lotes de producción varió de 34 a 40%, tanto para soja de primera como de segunda, según se define en los percentiles 5 y 95 (Tabla 2.3). La soja de primera mostró un promedio de 36,6% de concentración de proteína en grano, y la soja de segunda un promedio de 37,6% (Tabla 2.3). El rendimiento de soja de primera fue de 3.648 kg ha<sup>-1</sup>, y varió de 2.157 a 4.785 kg ha<sup>-1</sup> (5-95%). El rendimiento promedio de soja de segunda fue de 3.154 kg ha<sup>-1</sup>, y osciló entre 1.915 y 4.019 kg ha<sup>-1</sup> (5-95%, Tabla 2.3). El N cosechado en grano para soja de primera fue 213 kg N ha<sup>-1</sup> en promedio, y osciló entre 128 y 280 kg N ha<sup>-1</sup> (5-95%, Tabla 2.3). Para la soja de segunda, el N en grano fue de 190 kg N ha<sup>-1</sup>, y osciló entre 109 y 242 kg N ha<sup>-1</sup> (5-95%, Tabla 2.3).

**Tabla 2.3.** Promedio, percentil 5 y 95 para concentración de proteína en grano, rendimiento y nitrógeno en grano, para lotes de producción de la región central de Argentina para las campañas 2012 al 2016.

Variable	Soja de primera/segunda	Promedio	5%	95%
Proteína en grano (%)	Soja de primera	36,6	34,2	39,4
	Soja de segunda	37,6	34,8	40,4
Rendimiento (kg ha <sup>-1</sup> )	Soja de primera	3.648	2.157	4.785
	Soja de segunda	3.154	1.915	4.019
N en grano (kg N ha <sup>-1</sup> )	Soja de primera	213	128	280
	Soja de segunda	190	109	242

### 2.3.2. Patrón espacial de concentración de proteína en grano en el centro de Argentina

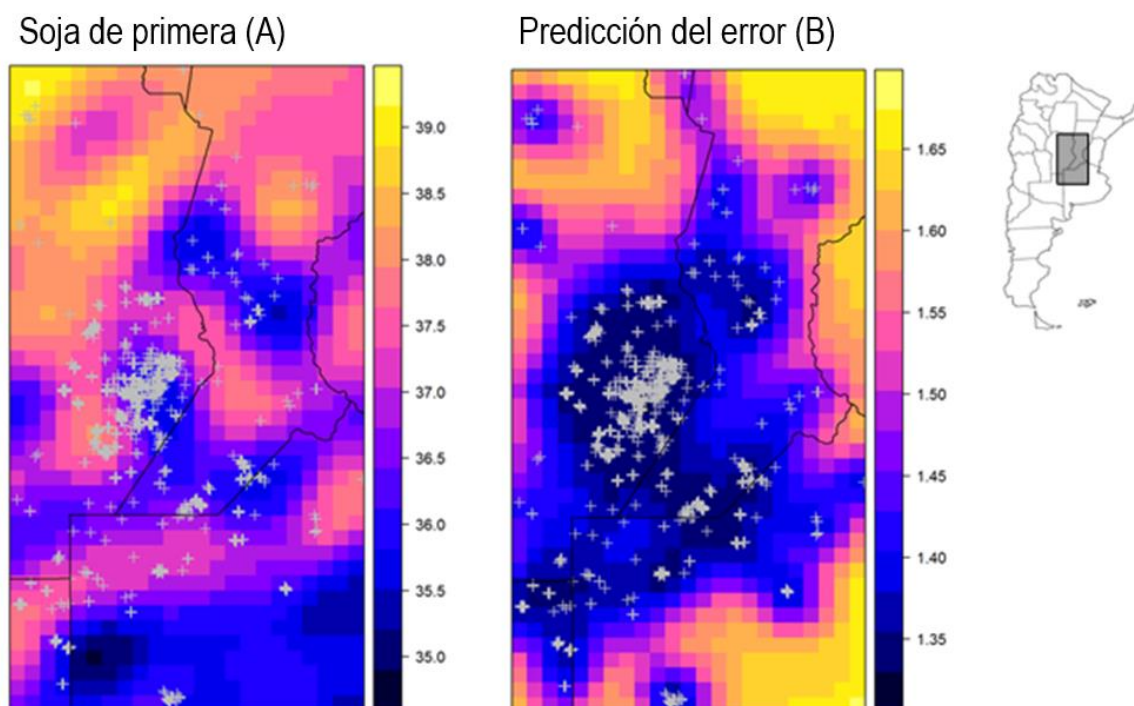
El variograma elaborado indicó una fuerte autocorrelación espacial para la concentración de proteína en grano para soja de primera (Figura Suplementaria 2.2). Sin embargo, no se observó autocorrelación espacial para la soja de segunda (Figura Suplementaria 2.2). La estructura espacial de soja de primera estuvo bien representada por un modelo de onda con un 33% de la variación total explicada por la estructura espacial en el pico del modelo de onda (pepita = 1,77 y umbral parcial = 0,86) con un rango máximo de autocorrelación de ~65 km. Hubo una disminución sutil de la semivarianza o un aumento en la autocorrelación espacial a 150 km que justificó la selección del modelo de onda (Figura Suplementaria 2.2). El error para el modelo ajustado fue muy bajo (<0,001).

El mapa predicho para la soja de primera indicó un fuerte gradiente de norte a sur, con valores que oscilan entre 39% en la parte norte de la región y 35% en las zonas más meridionales (Figura 2.1). Sin embargo, hubo parches evidentes de concentración de proteína en grano relativamente alta (~38%) y baja (~35%) ubicada en el área central de la región estudiada. El error estándar estimado por *kriging* ordinario fue muy bajo cerca de los puntos observados (<1,35% de proteína), y también fue relativamente bajo incluso en áreas con menor densidad de muestreo (1,65% de proteína; Figura 2.1). Fue posible identificar una estructura espacial para la proteína en grano solamente para la soja de primera. Este patrón ayudó a identificar zonas con una concentración de proteína en grano contrastante y consistente en los lotes de producción de la región evaluada.

### 2.3.3. Variables ambientales y de manejo asociadas con la concentración de proteína en grano en lotes de producción

El árbol de regresión para soja de primera mostró nueve nodos terminales, con concentración de proteína en grano, rendimiento y N cosechado en grano que varió de 35,3 a 38,4%, 3.767 a 4.804 kg ha<sup>-1</sup> y 226 a 278 kg de N ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 2.2). El árbol de regresión explicó el 39% de la variación total de la concentración de proteína en grano. Las variables de manejo representaron el 73% de esta variación total explicada, mientras que las variables ambientales explicaron el 27% restante (Tabla 2.4). De todas las variables analizadas, el genotipo fue la primera variable de división para la concentración de proteína (P<0,001;

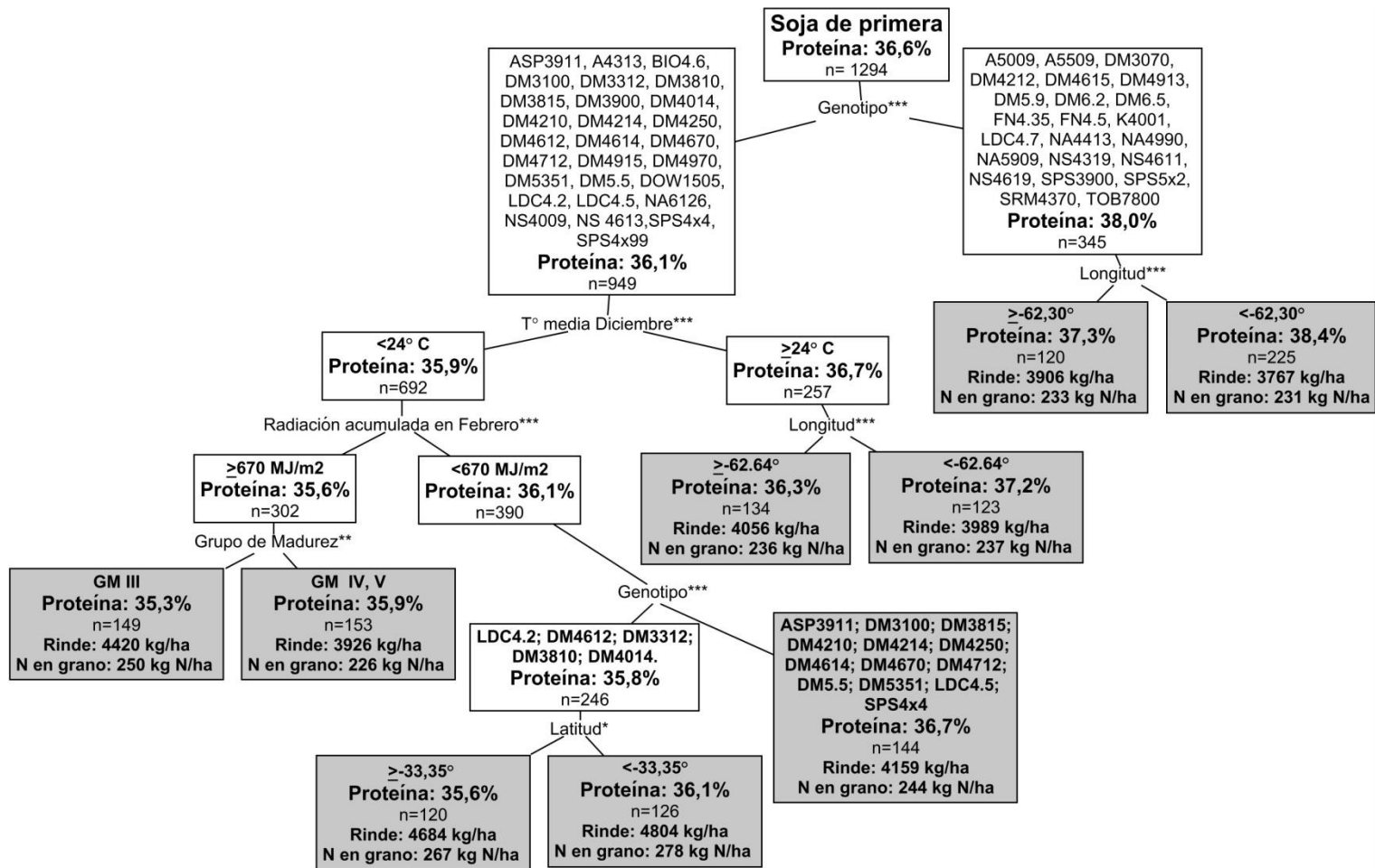
Figura 2.2). Las observaciones de lotes de producción se dividieron en dos grupos de genotipos que tenían una concentración de proteína en grano de 36,1 y 38,0%, respectivamente (Figura 2.2).



**Figura 2.1.** (A) Mapa de concentración de proteína en grano (%) para soja de primera interpolado por *kriging* y (B) su error de predicción asociado para la región central de Argentina.

El genotipo explicó el 71,5% de la concentración total de proteína en grano (Tabla 2.4), y fue la variable de manejo que mostró mayor relevancia. Dentro del grupo que tenía genotipos con menor concentración de proteína en grano (rama izquierda, Figura 2.2), la temperatura promedio de diciembre ( $P < 0,001$ ; Figura 2.2) y la radiación acumulada durante febrero ( $P < 0,001$ ; Figura 2.2) ayudaron a explicar la variación de la concentración de proteína en grano. Las bajas temperaturas durante diciembre y los altos niveles de radiación durante febrero se correlacionaron con valores bajos de proteína en grano. El grupo de madurez representó el 1,8% de la variación encontrada para proteína. En la soja de primera los grupos de madurez más largos mostraron una concentración de proteína en grano ligeramente más alta en comparación con los grupos de madurez más cortos (Tabla 2.4, Figura 2.2).

Los lotes de producción con genotipos con mayor concentración de proteína en grano (rama derecha, Figura 2.2) mostraron concentraciones de proteína asociadas a la longitud de la ubicación del lote ( $P < 0,001$ ; Figura 2.2). Las observaciones ubicadas hacia el oeste de la región en estudio mostraron una mayor concentración de proteína que las ubicadas hacia el este (38,4 y 37,3%, respectivamente, Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Modelo de árbol de regresión para la concentración de proteína en grano para soja de primera de lotes de producción de la región central de Argentina. La concentración de proteína en grano se expresó en porcentaje. \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$  y, \*  $P < 0,05$ . Los nodos terminales se representan como cuadros grises. El rendimiento en grano ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) y el nitrógeno en grano ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) se muestran para cada nodo terminal.

**Tabla 2.4.** Porcentaje de explicación de la variación en concentración de proteína en grano (%) para las variables ambientales y de manejo evaluadas en los árboles de regresión. Los árboles de regresión explicaron el 39,0 y el 47,6% del total de la variación observada para concentración de proteína en grano, para soja de primera y de segunda respectivamente.

Variable	Soja de primera	Soja de segunda
Genotipo	71,5	68,9
Grupo de madurez	1,8	0,0
Fecha de siembra	0,0	2,5
Distancia entre surcos	0,0	0,0
Cultivo antecesor	0,0	0,0
Fertilización con P	0,0	0,0
Fungicida foliar	0,0	0,0
Inoculante	0,0	0,0
<b>Σ Manejo</b>	<b>73,3</b>	<b>71,4</b>
Latitud	1,1	0,0
Longitud	11,3	0,0
Precipitaciones acumuladas en octubre	0,0	0,0
Precipitaciones acumuladas en noviembre	0,0	0,0
Precipitaciones acumuladas en diciembre	0,0	0,0
Precipitaciones acumuladas en enero	0,0	15,5
Precipitaciones acumuladas en febrero	0,0	0,0
Precipitaciones acumuladas en marzo	0,0	3,2
Precipitaciones totales	0,0	5,9
Radiación acumulada en octubre	0,0	-
Radiación acumulada en noviembre	0,0	-
Radiación acumulada en diciembre	0,0	0,0
Radiación acumulada en enero	0,0	0,0
Radiación acumulada en febrero	4,1	0,0
Radiación acumulada en marzo	0,0	0,0
Radiación total	0,0	0,0

Temperatura promedio de octubre	0,0	-
Temperatura promedio de noviembre	0,0	-
Temperatura promedio de diciembre	10,3	0,0
Temperatura promedio de enero	0,0	4,0
Temperatura promedio de febrero	0,0	0,0
Temperatura promedio de marzo	0,0	0,0
<b>∑ Ambiente</b>	<b>26,7</b>	<b>28,6</b>

---

Para soja de segunda, el árbol de regresión explicó ~48% de la variación total de la concentración de proteína en grano. Las variables de manejo representaron ~71% de la variación total explicada, mientras que las variables ambientales explicaron el ~29% restante (Tabla 2.4). Hubo ocho nodos terminales, y la concentración de proteína en grano varió de 35,9 a 39,6%, el rendimiento de 2.913 a 4.071 kg ha<sup>-1</sup>, y el nitrógeno en grano de 178 a 234 kg N ha<sup>-1</sup> (Figura 2.3). De acuerdo con los resultados hallados para soja de primera, el genotipo fue la primera variable de división (P<0,001; Figura 2.3) y fue la principal variable asociada a la concentración de proteína en grano (~69% de la variación explicada por el árbol de regresión; Tabla 2.4). Luego de la división del genotipo, en la rama izquierda, la concentración de proteína se asoció con las precipitaciones acumuladas y la temperatura promedio durante enero (P<0,001; Figura 2.3). El mes de enero, más cálido y lluvioso, se asoció a concentraciones más bajas de proteína. La rama derecha del árbol de regresión, después de la división del genotipo, la concentración de proteína en grano varió de acuerdo con la precipitación acumulada durante todo el ciclo del cultivo. En general, mayores precipitaciones se asociaron a una menor concentración de proteína en grano. Las fechas de siembra posteriores al 10 de diciembre se asociaron con una mayor concentración de proteína grano (P<0,001; Figura 2.3).

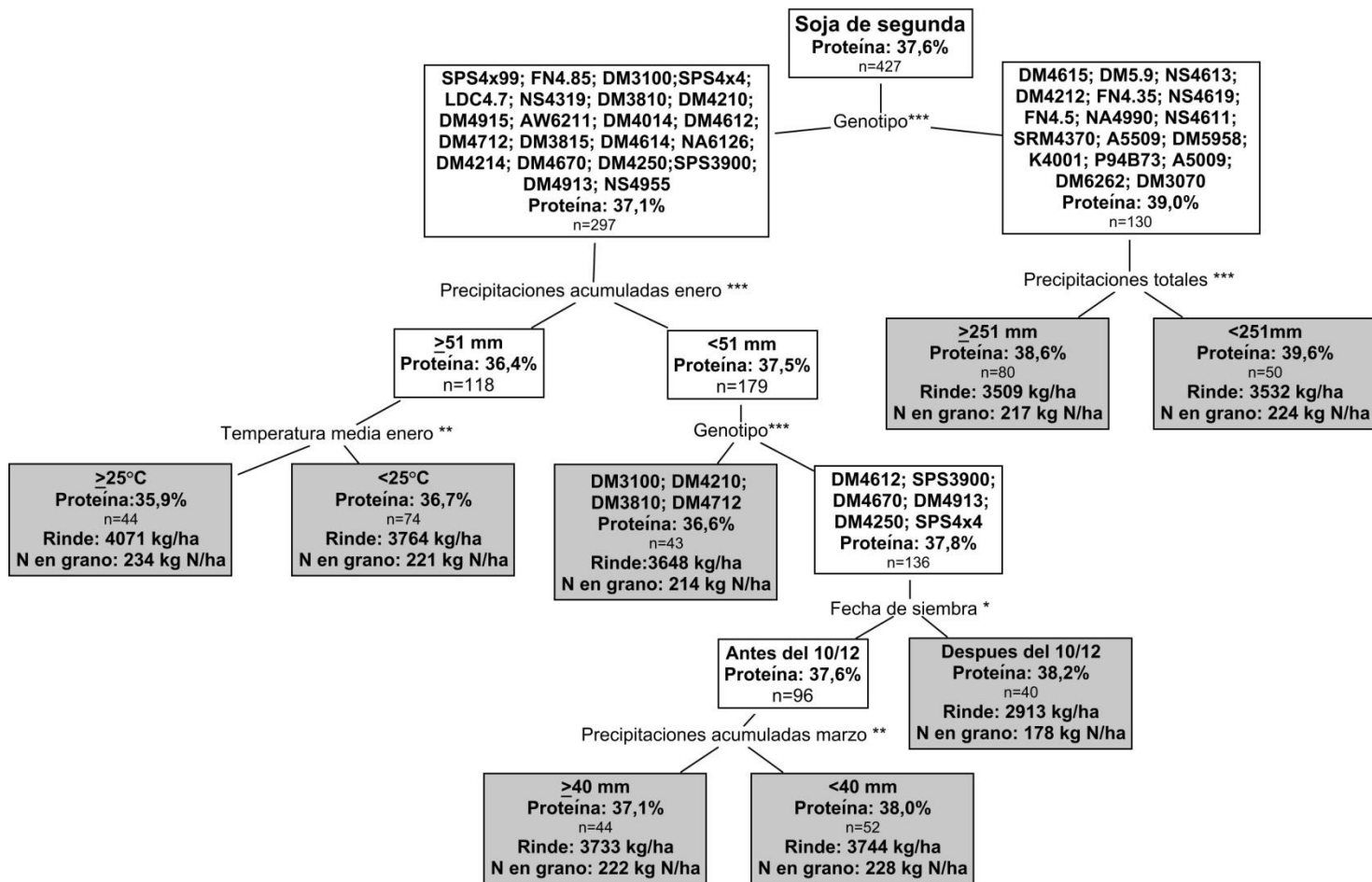
En resumen, los árboles de regresión ayudaron a dilucidar los principales factores asociados a la variación de la proteína en grano tanto para soja de primera como de segunda. Para ambos sistemas de cultivo, los factores de manejo tuvieron una importancia relativa mayor que las variables ambientales para determinar los diferentes niveles de proteína en grano. El genotipo, la fecha de siembra y el grupo de madurez fueron las opciones de manejo más

relevantes para lograr una alta concentración de proteína. A pesar de su menor relevancia, las precipitaciones y la temperatura también se identificaron como variables ambientales asociadas con la variación de la proteína.

#### 2.3.4. Relevancia del genotipo en ensayos multiambientales

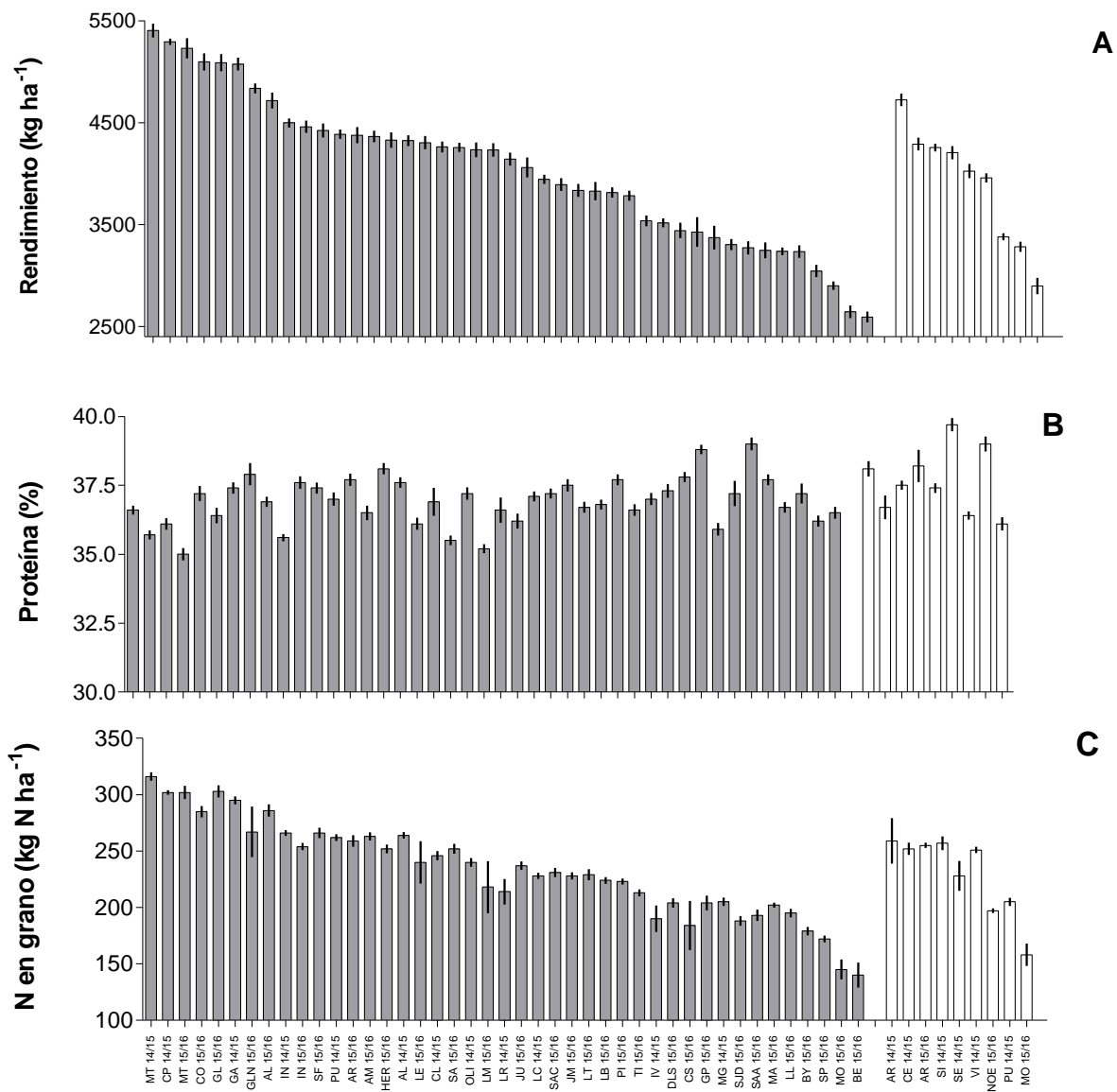
Dado que el estudio observacional mostró que el efecto genotipo fue muy relevante para explicar la concentración de proteína en grano en la región bajo estudio, se probó aún más la estabilidad de la expresión de la proteína en diferentes sitios dentro de la región. Para esto, se analizaron 52 ensayos multiambientales probando un promedio de 13 genotipos en cada sitio, distribuidos en toda la región (Figura Suplementaria 2.1). La Figura 2.4 describe el rendimiento, la concentración de proteína en grano y el nitrógeno en grano en todos los sitios, tanto para soja de primera como de segunda. Los componentes de variación mostraron que el sitio explicó la mayor proporción de la variación total observada (48 y 57% para la soja de primera y de segunda, respectivamente), seguido por el genotipo (17 y 16%, respectivamente) y la interacción genotipo x sitio (12 y 7%, respectivamente, Tabla 2.5). El efecto del genotipo representó aproximadamente el doble de la variación de la concentración de proteína que la interacción genotipo x sitio, indicando que el comportamiento de los genotipos es consistente a través de los sitios de producción respecto a la concentración de proteína (Tabla 2.5).

Los BLUP de los genotipos mostraron que la concentración de proteína en grano varió de ~36 a 38% para la soja de primera, y de 36.6 a 39% para la soja de segunda (Tabla Suplementaria 2.2). La importancia relativa de los componentes de varianza para el rendimiento y el nitrógeno en grano siguió la misma tendencia que la observada para la concentración de proteína (Tabla 2.5). El sitio (~85%) y el genotipo (2-5%) mostraron la mayor contribución a la variación total del rendimiento y el nitrógeno en grano en ambos cultivos. Los BLUP para el rendimiento de soja de primera variaron de 3.767 a 4.195 kg ha<sup>-1</sup>, mientras que para la soja de segunda varió de 3.604 a 4.046 kg ha<sup>-1</sup>. Los BLUP para nitrógeno en grano para soja de primera oscilaron entre 225 y 246 kg N ha<sup>-1</sup>, y para soja de segunda entre 218 y 248 kg N ha<sup>-1</sup> (Tabla Suplementaria 2.2).



**Figura 2.3.** Modelo de árbol de regresión para la concentración de proteína en grano para soja de segunda de lotes de producción de la región central de Argentina. La concentración de proteína en grano se expresó en porcentaje. \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$  y, \*  $P < 0,05$ . Los nodos terminales se representan como cuadros grises. El rendimiento en grano ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) y el nitrógeno en grano ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) se muestran para cada nodo terminal.

Estos experimentos permitieron identificar genotipos con una concentración de proteína en grano alta y estable, tanto en soja de primera como de segunda (Tabla Suplementaria 2.2). Para la soja de primera, los genotipos NS4619, A5009 y DS1470 tuvieron los niveles de proteína en grano más altos en los sitios probados. Los genotipos con mayor concentración de proteína en grano para la soja de segunda fueron NS4619, NS4955 y NS6248. Curiosamente, el cultivar NS4619 mostró una calidad de grano superior a la media y rendimientos adecuados ( $\sim 4.000 \text{ kg ha}^{-1}$ ), tanto en soja de primera como de segunda. De acuerdo con el estudio observacional presentado anteriormente, estos ensayos multiambientales realizados en toda la región también ayudan a concluir que la selección del genotipo surge como una opción de manejo relevante para alcanzar altos niveles de proteína en grano.



**Figura 2.4.** Valores promedio para (A) rendimiento, (B) concentración de proteína en grano y (C) N en grano para los 52 ensayos multiambientales que probaron los efectos del genotipo. Las barras completas representan los sitios de soja de primera y las barras vacías los sitios de soja de segunda. La distribución geográfica y la lista de ubicaciones están disponibles en la Figura Suplementaria 2.1. y en la Tabla Suplementaria 2.1.

**Tabla 2.5.** Variación relativa explicada por el sitio, el genotipo, la interacción sitio x genotipo y el residual para concentración de proteína en grano (%), rendimiento (kg ha<sup>-1</sup>) and N en grano (kg N ha<sup>-1</sup>) calculado para los ensayos multiambientales conducidos en la región central de Argentina durante las campañas 2014/15 y 2015/16. Las fuentes de variación fueron estimadas como relativas a la variancia total usando modelos mixtos. La variación explicada por la relación entre el genotipo y la interacción genotipo por sitio también fue reportada.

Fuente de variación	Soja de primera			Soja de segunda		
	Proteína	Rendimiento	N en grano	Proteína	Rendimiento	N en grano
	% del total de variación					
Sitio (S)	48	86	84	57	84	83
Genotipo (G)	17	2	2	16	5	5
G x S	12	3	4	7	4	3
Residual	23	9	10	20	7	9
G / GxS	1,4	0,7	0,5	2,3	1,3	1,7

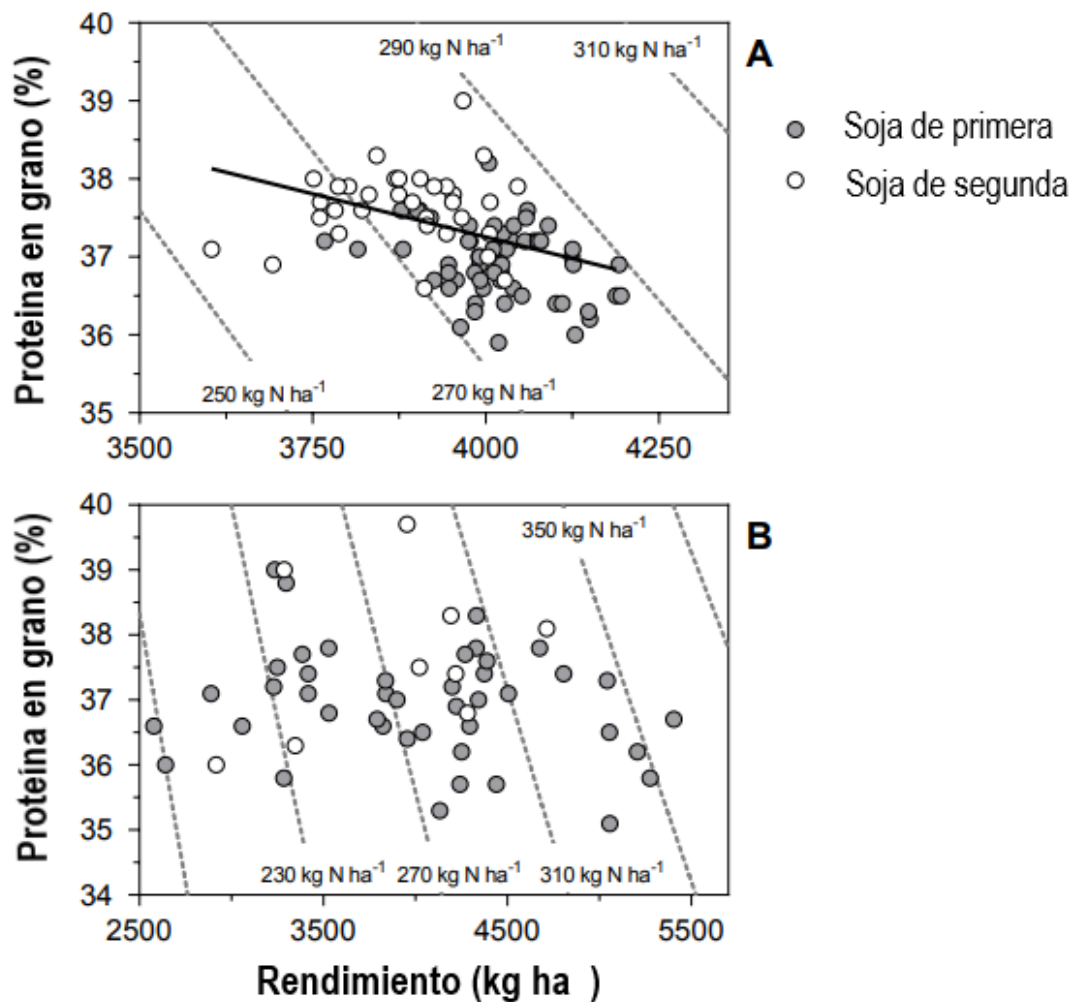
### 2.3.5. Relación entre rendimiento y concentración de proteína

El último objetivo estuvo relacionado con la exploración de correlaciones entre rendimiento, concentración de proteína en grano, nitrógeno en grano y absorción total de N por el cultivo. Para probar esto, se graficaron los datos de rendimiento y concentración de proteína en grano de los ensayos multiambientales (Figura 2.5). También se incluyeron los cálculos teóricos de la captura total de N del canopeo para combinaciones de rendimiento y concentración de proteína. Para esto, se utilizó un índice de cosecha de N de 0,85 basado en evidencias recientes en nuestra región (Santachiara et al., 2017).

Cuando se trazaron los BLUP del genotipo a través de los ensayos, fue evidente una correlación significativa y negativa entre el rendimiento y la concentración de proteína en grano

( $P < 0,0001$ , Figura 2.5.A). La absorción promedio total estimada de N para los genotipos probados varió de 250 a 290 kg de N ha<sup>-1</sup>. No se identificaron genotipos de soja que mostraran consistentemente niveles de captura de N superiores a 290 kg N ha<sup>-1</sup>. Se detectaron dos genotipos contrastantes: NS4619 y MS4.0. Ambos alcanzaron una captura total de N de 290 kg N ha<sup>-1</sup>, pero NS4619 produjo 3.967 kg ha<sup>-1</sup> con 39% de proteína de grano, mientras que MS4.0 arrojó 4.192 kg ha<sup>-1</sup> con 36,9% de proteína. Esta comparación muestra una estrategia de dilución para la variación en la concentración de proteína, siendo la captura total de N el factor limitante final para lograr un alto rendimiento y una alta concentración de proteína. Al analizar los diferentes sitios, no hubo correlación entre la concentración de proteína y el rendimiento (Figura 2.5.B). Esto muestra que en la región bajo estudio se pueden encontrar sitios con alta concentración de proteína y alto rendimiento. La captura máxima estimada de N del cultivo fue ~370 kg N ha<sup>-1</sup> (Figura 2.5.B).

En resumen, las correlaciones consistentes de compensación entre el rendimiento y la concentración de proteína fueron evidentes en todos los genotipos, pero se pueden lograr sitios con alto rendimiento y alta concentración de proteína en grano. Los niveles de captura total de N deben aumentar para permitir mejoras simultáneas en el rendimiento y la concentración de proteína.



**Figura 2.5.** Relación entre el mejor predictor lineal insesgado (BLUP) para la concentración de proteína en grano (%) y rendimiento ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) para (A) 91 genotipos evaluados y para (B) 52 sitios evaluados. Los sitios analizados y la lista de genotipos están disponibles en la Tabla Suplementaria 2.1 y 2.2, respectivamente. Las líneas discontinuas representan diferentes isolíneas de captura total de N del cultivo ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) según el rendimiento, la concentración de proteína y un índice de cosecha de N de 0,85 (Santachiara et al., 2017). La regresión en la Figura 2.5.A es  $Y = -0,00224 * X + 46,1$  ( $R^2: 0,19$ ;  $n: 91$ ;  $P < 0,0001$ ).

## 2.4. DISCUSIÓN

Utilizando enfoques complementarios observacionales y experimentales se caracterizó la variación geográfica y los factores ambientales y de manejo que tienen efecto sobre la concentración de proteína en soja en los sistemas de producción del centro argentino. La concentración promedio de proteína fue de 36,6 y 37,6% para la soja de primera y de segunda, respectivamente. Los resultados mostraron que la concentración de proteína en soja de primera siguió un patrón espacial en toda la región. Por lo tanto, fue posible identificar áreas con concentraciones de proteína contrastantes. Los hallazgos complementan el análisis espacial regional previo de rendimiento en grano (Andrade y Satorre, 2015) y de las brechas de rendimiento (Di Mauro et al., 2018) de los cultivos de soja para la Pampa central.

El rango de autocorrelación, que proporciona un indicador del tamaño de las áreas que tienen una composición de granos similar, es mucho menor (~65 km) en comparación con otras regiones de producción de soja como Estados Unidos (Rotundo et al., 2016). Estas diferencias en la correlación espacial entre Argentina y Estados Unidos pueden obedecer a las diferencias en la heterogeneidad del suelo en estas regiones. En cualquier caso, un rango pequeño, como el observado en el presente estudio, podría facilitar el abastecimiento de cultivos de proteína en grano alta o baja para lograr un estándar de comercialización específico sin la necesidad de incurrir en costos de transporte más altos desde regiones lejanas, como es el caso de producción de soja en EE.UU. (Rotundo et al., 2016).

Dos preguntas relevantes surgen de los resultados del análisis geoestadístico que justifican una mayor investigación. Primero, ¿por qué se observa el patrón espacial en la proteína de soja de primera pero no en la soja de segunda? Una posibilidad es la línea base de concentración de proteína más alta de la soja de segunda. Este aumento podría determinar una homogeneización regional de la concentración de proteína en grano. La segunda pregunta está relacionada con los impulsores ambientales subyacentes al patrón espacial de onda observado para la concentración de proteína. Los modelos de onda son menos comunes en los sistemas biológicos que los exponenciales y/o esféricos (Webster y Oliver, 2007). En este caso, estas fluctuaciones no pueden considerarse como ruido aleatorio, y el estudio de toda la estructura puede proporcionar información valiosa sobre la variación funcional de los datos (Radeloff et al., 2000; Pyrcz y Deutsch 2003).

Los resultados sobre la concentración de proteína en grano sugieren un tipo sutil de variación cíclica en los factores ambientales espaciales que de acuerdo con la escala espacial (~150 km) probablemente puede obedecer a las regiones geológicas o la variación del tipo de suelo. Los principales impulsores de esta variación aún no se han determinado. Se requiere una mejor comprensión del manejo de los sistemas de cultivo diseñados específicamente para aumentar la calidad del producto final (Tamagno et al., 2016; Abdala et al., 2018). Los resultados sugirieron que la selección de genotipos es la opción de manejo más consistente asociada con una mayor concentración de proteína en grano en una amplia gama de escenarios climáticos y de manejo.

La selección de genotipos explicó el ~70% de la variación encontrada, para ambos cultivos, según los árboles de regresión. El análisis del componente de varianza indicó una baja interacción genotipo por sitio. Estos resultados concuerdan con la alta correlación genética generalmente observada para este rasgo (Cianzio et al., 1985). Estudios anteriores informaron valores de concentración de proteína en grano diferentes y consistentes para diferentes grupos de madurez (Dardanelli et al., 2006). Los resultados muestran que la identidad del genotipo, en lugar del grupo de madurez, está más asociada a la concentración de proteína. Ciertamente hubo una correlación entre los cultivares y los grupos de madurez en la primera división del árbol de regresión tanto para la soja de primera como de segunda. Pero también hubo muchas superposiciones en los grupos de madurez. Al final, la variación entre los genotipos fue mayor en comparación con la variación entre los grupos de madurez. Esta es la razón por la cual el árbol de regresión separó los genotipos primero en lugar de los grupos de madurez. Esto también concuerda con diferentes ubicaciones de mapeo de QTL para la concentración de proteína y para el grupo de madurez. Los principales QTL para la concentración de proteína se mapearon en los cromosomas 15 y 20 (Patil et al., 2017), mientras que los de la determinación del grupo de madurez se mapearon en los cromosomas 4, 6, 11 y 16 (Kong et al., 2018). Esto indica que no existe una correlación genética entre la proteína en grano y el grupo de madurez, pero que los grupos de madurez más largos generalmente se cultivan en regiones con alta concentración de proteína de grano impulsada por el ambiente (es decir, latitudes más bajas).

Una correlación negativa entre el rendimiento y la concentración de proteína se observó al comparar genotipos. Este efecto se observó en estudios previos y se determinaron las causas fisiológicas. La alta concentración de proteína en grano a nivel de genotipo depende del aumento del suministro de asimilados al grano en forma de carbono y N (Rotundo y Westgate,

2009, 2011). En general, este aumento en el suministro a los granos se logró mediante el mejoramiento indirecto reduciendo el número de granos en lugar de aumentar las cantidades de asimilación, lo que afecta negativamente el rendimiento. A nivel productivo, alcanzar un alto rendimiento y una concentración de proteína en grano requiere aumentar la absorción total de N. Al comparar genotipos, los resultados muestran una absorción máxima de N de 290 kg N ha<sup>-1</sup> (promedio para la región). Esta isolínea de 290 kg N ha<sup>-1</sup> proporciona el rango de rendimiento y proteína alcanzable. El aumento tanto del rendimiento como de la concentración de proteína requerirá mover la absorción total de N más allá de este límite. Por lo tanto, este estudio sugiere que los esfuerzos adicionales para aumentar la concentración de proteína deben centrarse en los procesos de absorción de N (es decir, la FBN y la absorción de N mineral) en lugar de los procesos de determinación de proteína en grano (Santachiara et al., 2017). En los procesos de absorción de N es en lo que se enfoca el siguiente capítulo de la tesis.

Otras variables de manejo, además de la selección de genotipos, no fueron relevantes en la modificación de la concentración de proteína. El espacio entre surcos, la fertilización con P, los fungicidas foliares y la inoculación no se asoció con una mayor concentración de proteína en grano. El espacio entre surcos está relacionado con las diferencias de intercepción de luz que afectan el rendimiento, pero se informó que su papel en la proteína no es significativo (Moreira et al., 2015). Varios ensayos experimentales mostraron falta de respuesta de la concentración de proteína a la fertilización con fósforo (Krueger et al., 2013; Farmaha et al., 2012). Existe alguna evidencia de que la aplicación de fungicidas foliares aumenta la concentración de proteína en grano (Weidenbenner et al., 2014). Este efecto, sin embargo, ha sido pequeño (<1%) y no consistente entre los grupos de madurez. Existe evidencia de que la inoculación por la infección de *Bradyrhizobium* no se asoció con una mayor concentración de proteína al menos en suelos con un largo historial de cultivo de soja (Diaz et al., 2009), como es el caso de la región en estudio. La otra práctica de manejo relevante más allá de la selección de genotipos para afectar la concentración de proteína en grano fue la fecha de siembra. Esto se observó sólo para la soja de segunda e indica que parte de los beneficios de este sistema de cultivo para el aumento de la concentración de proteína se expresa más cuando se siembra después del 10 de diciembre.

Los resultados también permiten identificar las condiciones ambientales asociadas a una alta concentración de proteína en grano. La temperatura del aire fue la principal variable

ambiental asociada con la variación de la concentración de proteína tanto en la soja de primera como de segunda. Sin embargo, para la soja de primera, la temperatura más alta se asoció con una mayor concentración de proteína, mientras que, para la soja de segunda, el resultado fue el opuesto. Estos resultados destacan la complejidad de la respuesta de la proteína a la temperatura. Primero, la respuesta a la temperatura depende del rango explorado. A bajas temperaturas, la respuesta es negativa, mientras que a altas temperaturas la respuesta opuesta es más común (Rotundo y Westgate, 2009; Mourtzinis et al., 2017). Segundo, hay evidencias de una interacción entre la temperatura y el déficit hídrico para la determinación de la proteína. Carrera et al. (2009) mostraron una respuesta positiva de la proteína a la temperatura en condiciones bien regadas, pero la respuesta se volvió negativa en ambientes con estrés hídrico. En general, la soja de segunda es más propensa al estrés hídrico que la de primera debido al agotamiento del agua del suelo por el cultivo anterior. Esto podría ayudar a explicar la correlación negativa entre la temperatura y la concentración de proteína en grano observada en los cultivos de soja de segunda.

Apoyando la importancia de las precipitaciones para el cultivo cómo se mostró anteriormente para el rendimiento, una menor disponibilidad de agua se asoció a una mayor concentración de proteína en grano solo para la soja de segunda. Este efecto no se asoció con un rango diferencial de longitudes geográficas exploradas y/o ninguna correlación entre precipitaciones y longitud en comparación con la soja de primera (Figura Suplementaria 2.3). Este resultado concuerda con el efecto positivo del estrés hídrico en la concentración de proteína en grano observada tanto en experimentos de campo como en invernaderos (Rotundo y Westgate, 2009, 2010). La disminución de las precipitaciones tiene un doble efecto en el aumento de la concentración de proteína. Reduce el rendimiento, causando un efecto de concentración en la proteína. Y, cuando ocurre específicamente durante el período de llenado de grano, el estrés hídrico afecta la fotosíntesis que está directamente relacionada con la acumulación de aceite, pero no con la proteína que se genera a partir del carbono y el N previamente fijado (es decir, la removilización).

El desafío actual para la cadena de la soja es producir altos rendimientos en los lotes agrícolas mientras se mantienen los requisitos de calidad adecuados para las necesidades de la industria. De acuerdo con estudios previos (de Felipe et al., 2016; Helms y Orf, 1998; Wilcox y Shibles, 2001), se exploró una correlación negativa entre el rendimiento y la concentración de proteína cuando se compararon los genotipos. Pero, los sitios con rendimiento y calidad

adecuados fueron evidentes (Figura 2.5), lo que indica que esto es posible si se optimizan los niveles de captura total de N.

## 2.5. CONCLUSIONES

El presente estudio permitió caracterizar los sistemas de producción de soja de acuerdo con la concentración de proteína en grano mediante la exploración de factores espaciales, ambientales y de manejo en la región central de Argentina. Se encontró una concentración promedio de proteína en grano de 36,6 y 37,6% para la soja de primera y de segunda, respectivamente. Los resultados mostraron que la concentración de proteína está correlacionada espacialmente en la soja de primera, pero no en la soja de segunda. Por lo tanto, se identificaron áreas que producen soja de primera con valores de concentración de proteína de grano consistentemente más altos. Fue evidente un patrón claro de norte a sur, con valores más altos en las partes más al norte de la región.

La selección de genotipos surge como la opción de manejo más importante para la determinación de la concentración de proteína en grano. Se identificaron genotipos comerciales actuales con una mayor concentración de proteína en grano. Los árboles de regresión ayudaron a comprender que el genotipo, la fecha de siembra y el grupo de madurez son opciones críticas de manejo para obtener una alta concentración de proteína entre las variables de manejo analizadas.

Dentro de las variables ambientales, las precipitaciones y la temperatura también fueron relevantes para discriminar lotes con alta concentración de proteína. Opciones de manejo como cultivo anterior, espaciamiento entre hileras, inoculación, fertilización fosforada y la aplicación de fungicidas foliares no fueron relevantes para diferenciar lotes de producción con una concentración de proteína contrastante.

Se observaron correlaciones negativas consistentes entre el rendimiento y la proteína, pero no entre los sitios. Esto demostró que se pueden encontrar sitios con alto rendimiento y alta concentración de proteína. Para aumentar simultáneamente la concentración de proteína y el rendimiento, la captura total de N debe aumentar. Es precisamente este concepto el que se explora en el siguiente capítulo de la tesis.



## CAPÍTULO III

# EFECTOS DE LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA EN ETAPAS TARDÍAS SOBRE LA PROTEÍNA EN SOJA Y LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITROGENO

---

El contenido de este capítulo fue enviado a *Crop Science*. Late season N fertilization effects on soybean seed protein and biological N fixation. **Lina B. Bosaz**, Lucas Borrás, José A. Gerde, Gabriel Santachiara, José L. Rotundo. Actualmente se encuentra en revisión.

### **3. EFECTOS DE LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA EN ETAPAS TARDÍAS SOBRE LA PROTEÍNA EN SOJA Y LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITROGENO.**

#### **3.1. INTRODUCCIÓN**

La concentración de proteína en grano es un atributo de calidad relevante para lograr harinas ricas en proteína (Brumm y Hurburgh, 2006), que se utilizan principalmente para la alimentación animal. Actualmente, los mercados internacionales de soja se enfrentan a un problema crítico asociado con niveles inadecuados de concentración de proteína en grano (Medic et al., 2014; Rotundo et al., 2016). Argentina es hoy un importante productor mundial de soja y el mayor exportador de harina de soja (FAOSTAT, 2019). Sin embargo, los productores están teniendo dificultades para alcanzar los niveles de concentración de proteína en grano exigidos por la industria de procesamiento para producir harina de alta calidad (Guinn, 2002). La proteína en grano se ve afectada por prácticas de manejo como la fecha de siembra y la elección del genotipo, pero también por variables ambientales como la disponibilidad hídrica y la temperatura (Rotundo y Westgate, 2009; Mourtzinis et al., 2017; Assefa et al., 2019; Bosaz et al., 2019). Es un desafío identificar las opciones de manejo al alcance de los productores para aumentar los niveles de proteína en grano. Rotundo y Westgate (2009) identificaron la aplicación de N a fines del ciclo del cultivo como una potencial herramienta de manejo para mejorar la concentración de proteína en grano.

La fertilización nitrogenada en la soja ha mostrado efectos erráticos tanto en el rendimiento como en la concentración de proteína en grano (Salvagiotti et al., 2008; Rotundo y Westgate, 2009). En los casos en que la fertilización con N al momento de la siembra tiene un impacto en el rendimiento, rara vez se evidencia un efecto sobre los niveles de proteína en grano, generalmente relacionado con un aumento tanto en la fuente de llenado de grano (establecida en R5) como en el tamaño de los destinos (establecido anteriormente en el desarrollo). Ferreira et al. (2016) y Afza et al. (1987) aplicaron diferentes dosis de N al comienzo del ciclo del cultivo sin respuesta en la concentración de proteína. Sin embargo, Ham et al. (1975) observaron un aumento sustancial en la concentración de proteína en grano (4%) con las primeras aplicaciones de fertilización con N mayores a 200 kg N ha<sup>-1</sup>. Esta excepción podría estar relacionada con limitaciones de rendimiento severas, ya que los rendimientos del tratamiento control sin fertilización con N fueron cercanos a 1.000 kg ha<sup>-1</sup>. Cafaro La Menza et

al. (2017, 2019) informaron aumentos (3%) en la concentración de proteína en grano con aplicaciones secuenciales que varían de 330 a 840 kg N ha<sup>-1</sup> hasta R5. Una mejor comprensión de los mecanismos que determinan la respuesta de la proteína al fertilizante nitrogenado es crítica para aumentar la previsibilidad de los resultados de esta práctica.

La concentración de proteína en grano tiene un fuerte control genético (Rotundo et al., 2009, 2011; Bosaz et al., 2019) y la selección de genotipos es hoy la opción de manejo más adecuada para alcanzar altos niveles de proteína en grano. Sin embargo, se observan compensaciones entre el rendimiento y los niveles de proteína en base a las diluciones de absorción de N del cultivo (Gaspar et al., 2017).

La captura de N puede dividirse en la FBN y la absorción de N mineral del suelo (Santachiara et al., 2017). La FBN se deprime comúnmente por las fertilizaciones nitrogenadas de principios de ciclo (Azfa et al., 1987; Streeter, 1988; Tamagno et al., 2018). Por lo tanto, las recomendaciones de fertilización que permitan optimizar la captura de N del cultivo sin inhibir el proceso de fijación son críticas para obtener un alto rendimiento y una alta concentración de proteína. En este contexto, es necesario probar las aplicaciones de N en estadios tardíos sobre la FBN.

No hay información de cómo responden e interactúan los genotipos con niveles de proteína contrastantes con las fertilizaciones de N durante el llenado de granos. Se supone que los genotipos de alta concentración de proteína mostrarán menores aumentos de dicha concentración después de las fertilizaciones nitrogenadas porque comúnmente muestran una mayor disponibilidad de N por grano en crecimiento (Rotundo et al., 2009). También se hipotetizó que lo mismo se aplicará a cualquier opción de manejo que ayude a alcanzar niveles más altos de proteína de grano, como siembras tardías (Bosaz et al., 2019).

Basado en dificultades evidentes para alcanzar niveles adecuados de concentración de proteína en muchas regiones de producción (Hurburgh et al., 1990; Hurburgh, 1994; Brumm y Hurburgh, 2006; Cuniberti y Herrero, 2018), y la necesidad general de identificar el impacto de diferentes herramientas de manejo para modificar esta tendencia, el objetivo principal fue evaluar si los tratamientos de fertilización con N en estadios tardíos podrían contribuir a aumentar la concentración de proteína. Además, se valoró cómo los tratamientos de fertilización (aplicaciones foliares o en el suelo) afectan la concentración de proteína, la captura de N y la FBN. Finalmente, se evaluó si la cantidad de N proveniente de la absorción mineral o del

proceso de fijación modula la respuesta de la proteína a la fertilización nitrogenada en estadios tardíos.

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1. Experimentos de campo

Los experimentos de campo se realizaron en condiciones de secano durante dos campañas agrícolas (2015/16 y 2016/17) en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, ubicada en Zavalla, Santa Fe, Argentina (33 ° 1 ' S, 60 ° 53 ' W). El suelo fue franco limoso arcilloso (Argiudol Vértico, serie Roldán). El contenido de agua disponible en el suelo a la siembra a 200 cm de profundidad fue de 157 mm y 327 mm para las campañas 2015/16 y 2016/17, respectivamente. La precipitación total para el período de noviembre a abril fue de 781 mm y 608 mm para las campañas 2015/16 y 2016/17, respectivamente. En la Figura Suplementaria 3.1 se incluyó una descripción detallada de la temperatura mensual promedio, las precipitaciones acumuladas, la radiación solar y la dinámica del fotoperiodo. El contenido de N del suelo (como nitratos) a una profundidad de 0 a 30 cm a la siembra y antes de la aplicación de fertilizantes nitrogenados fue de 67,6 kg ha<sup>-1</sup> y 70,2 kg ha<sup>-1</sup> para las campañas 2015/16 y 2016/17, respectivamente. El cultivo antecesor fue soja en ambos años. Las parcelas presentaron cuatro surcos y 5.5 m de largo, con 0.52 m de espaciado entre surcos. Las semillas se inocularon con la dosis recomendada (2,5 ml kg de semillas<sup>-1</sup>) con RizoLiq LLI® (Rizobacter Company, Argentina) que contiene *Bradyrhizobium japonicum* (cepa E109) y un osmoprotector para mantener la viabilidad de las bacterias después de la aplicación de pesticidas a las semillas. El inoculante presentó 3 x 10<sup>10</sup> unidades formadoras de colonias ml<sup>-1</sup>. Se aplicó insecticida y fungicida de semilla compatible, Cruiser Advanced® (Syngenta Company, Argentina) en una proporción de 1 cm<sup>3</sup> kg de semilla<sup>-1</sup> para ambos tratamientos. La densidad final se ajustó a 30 plantas m<sup>-2</sup> después del raleo manual en V1 (Fehr y Caviness 1977). Malezas, plagas y enfermedades se controlaron químicamente con los productos comerciales recomendados para el cultivo.

### 3.2.2. Diseño experimental y tratamientos

En cada campaña agrícola, se evaluaron dos fechas de siembra. Para diferenciar los ambientes, se denominaron siembras tempranas y tardías, que fueron el 3 y 28 de diciembre para la campaña 2015/16, y el 4 y 16 de noviembre para la campaña 2016/17. Se evaluaron dos genotipos del grupo de madurez IV intermedio. Ambos genotipos comerciales presentaban alto rendimiento, con niveles de concentración de proteína contrastantes (Bosaz et al., 2019). Resultados anteriores mostraron que el genotipo NS4619 tenía alta concentración de proteína

(38,2%), mientras que DM4612 tenía valores más bajos (36,2%). También tuvieron mayores concentraciones de proteína en siembras tardías en comparación con las tempranas.

Ambos genotipos fueron evaluados bajo tres tratamientos diferentes de fertilización con N: (i) un tratamiento control, (ii) un tratamiento de fertilización foliar, y (iii) un tratamiento de fertilización en el suelo. El tratamiento de control consistió en no realizar fertilización nitrogenada. En los tratamientos foliar y en el suelo se aplicaron un total de 80 kg N ha<sup>-1</sup> (20 kg ha<sup>-1</sup> de N en cada aplicación) Los fertilizantes siempre se aplicaron al mismo tiempo, y se dividieron en etapas fenológicas R3, R4, R5.5 y R6 (Fehr y Caviness, 1977). Para el tratamiento en el suelo se utilizó urea granulada (46-0-0, N-P-K) que se esparció manualmente entre los surcos. Para el tratamiento foliar, se usó una solución de urea y nitrato de amonio (UAN, 32:00:00) que se aplicó sobre la parte superior del canopeo utilizando un pulverizador de CO<sub>2</sub> con una tasa de dilución de agua de 70 l ha<sup>-1</sup>.

### 3.2.3. Variables medidas

Los estadíos fenológicos R2 (floración completa), R4 (plena formación de vainas), R5 (inicio del llenado de granos), R5.5 (50% de llenado de granos), R6 (pleno llenado de granos) y R7 (madurez fisiológica) se registraron cada dos días, siguiendo la escala de Fehr y Caviness (1977). En cada etapa se determinó la biomasa aérea total del cultivo (kg ha<sup>-1</sup>) mediante el muestreo en 1.04 m<sup>2</sup> en los dos surcos centrales de cada parcela. Las plantas se cortaron a mano, se secaron en estufa a 60° C y se pesaron. Se usó una alícuota para la determinación de la concentración de N total mediante el procedimiento de Kjeldahl (McKenzie y Wallace, 1953). La FBN se determinó utilizando el método de abundancia relativa de ureidos (Peoples et al., 1989). Las concentraciones de ureidos, nitratos y aminoácidos N se estimaron espectrofotométricamente siguiendo a Santachiara et al. (2018). La abundancia relativa de ureidos se calculó como (Ec. 3.1):

$$\text{Concentración relativa de ureidos} = \left( \frac{4U}{4U+AA+N} \right) \times 100$$

donde U, AA y N son la concentración molar de ureidos, aminoácidos y nitratos, respectivamente (Herridge y Peoples, 1990).

En madurez fisiológica, después de pesar la biomasa aérea total, se trillaron las muestras y se pesaron los granos para calcular el rendimiento ( $\text{kg ha}^{-1}$ ). Los granos y la biomasa vegetativa se molieron por separado y se analizaron para determinar la concentración total de N. La captura total de N del cultivo se calculó como el promedio del contenido de N en granos y la biomasa vegetativa. El índice de cosecha de nitrógeno (ICN) se calculó como la relación entre el N en grano y el N total del cultivo ( $\text{kg kg}^{-1}$ ) en R7. El rendimiento y la concentración de proteína se informaron sobre base seca (0% de humedad). La concentración de proteína se expresó en porcentaje, entendido como g de proteína cada 100g de granos. El peso individual del grano ( $\text{mg grano}^{-1}$ ) se calculó a partir de una submuestra de 200 granos por parcela, también se informó sobre base seca. El número de granos por unidad de superficie ( $\text{granos m}^{-2}$ ) se estimó como el rendimiento dividido el peso promedio individual del grano. Se calculó la relación entre el N total acumulado (suelo + atmósfera) entre R5 y R7 y el número de granos por unidad de superficie. Se hizo el mismo cálculo para el N fijado acumulado. Estas dos medidas de la relación fuente-destino se usaron como predictores de la respuesta de la concentración de proteína a la fertilización nitrogenada. La respuesta a la fertilización nitrogenada se calculó como la diferencia entre la concentración de proteína en el tratamiento fertilizado con N y el control, dividido por la concentración de proteína en el control.

#### 3.2.4. Análisis estadístico

Los tratamientos se asignaron siguiendo un diseño en bloques completamente al azar con cuatro repeticiones. Para las variables medidas en madurez fisiológica, se realizó un análisis de varianza de modelo mixto lineal usando la función *lme* del paquete *lme4* en R (R Core Team, 2017; Bates et al., 2015). Fecha de siembra, genotipo y tratamientos fueron incluidos como efectos fijos. Los bloques y los años se consideraron factores aleatorios. Se examinaron los efectos de estos factores y sus interacciones sobre el rendimiento, el número de granos, el peso de granos, la concentración de proteína, la absorción total de N, la FBN y el ICN. El nivel de significancia se estableció en  $\alpha = 0,05$ , a menos que se indique lo contrario. Los datos sobre la absorción total de N y la FBN durante el ciclo de crecimiento se ajustaron mediante una función logística utilizando la Ec.3.2:

$$y = Y_{m\acute{a}x} / \{1 + e^{[-k(t-tm)]}\}$$

donde  $Y_{\text{máx}}$  es el valor asintótico para la absorción total de N o la FBN,  $k$  está asociado con la inclinación de la curva,  $t$  son los días posteriores a la siembra y  $t_m$  es el punto de inflexión donde las tasas de absorción de N o FBN se maximizan (Archontoulis y Miguez, 2015). Se utilizaron modelos de efectos mixtos no lineales (paquete *nlme*, función *nlme*) (Pinheiro et al., 2020) para probar el efecto de los tratamientos, fecha de siembra, genotipos y fertilización en los parámetros de la ecuación 3.1. Estos factores fueron considerados factores fijos. Años y bloques dentro de años se consideraron factores aleatorios. Se llevó a cabo un procedimiento de selección de modelos utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC) para encontrar la mejor combinación de efectos fijos asociados a los diferentes parámetros. Se probaron un total de 964 modelos.

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Rendimiento, número y peso de granos

El rendimiento mostró diferencias entre fechas de siembra ( $P < 0,001$ ), con valores medios de 3.949 y 3.242 kg ha<sup>-1</sup> para fechas tempranas y tardías, respectivamente (Tabla 3.1). No se encontraron diferencias de rendimiento entre los dos genotipos probados o entre los tratamientos de fertilización con N (Tabla 3.1). El número de granos también mostró diferencias significativas entre las fechas de siembra ( $P < 0,001$ ), que se explicaron por los cambios en el número de granos ( $P < 0,001$ ). El peso seco de los granos no se vio afectado por la fecha de siembra (Tabla 3.1). Sin embargo, el efecto de la interacción genotipo x fecha de siembra en el peso fue significativo ( $P < 0,01$ ), lo que indica que las diferencias entre los genotipos dependieron de la fecha de siembra (Tabla 3.1). En este sentido, las diferencias de peso de los granos entre los genotipos se observaron solamente en la fecha de siembra temprana (Tabla 3.1). DM4612 fue 9 mg grano<sup>-1</sup> más pesado que NS4619 en la fecha de siembra temprana ( $P < 0,01$ ; Tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Análisis de varianza y promedio de rendimiento, número de granos y peso individual de los granos en dos fechas de siembra (FS), dos genotipos y tres tratamientos de fertilización con N evaluados en las campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17. Ambos tratamientos de fertilización se aplicaron en R3, R4, R5.5 y R6, totalizando 80 kg de N ha<sup>-1</sup>. Diferentes letras dentro del mismo efecto representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

Fecha de siembra	Genotipo	Tratamiento de fertilización	Rendimiento (kg ha <sup>-1</sup> )	Nº de granos (granos m <sup>-2</sup> )	Peso de los granos (mg grano <sup>-1</sup> )
Temprana			3.949 a	2.879 a	137
Tardía			3.242 b	2.341 b	139
	DM4612		3.652	2.698	136 b
	NS4619		3.540	2.523	140 a
		Control	3.559	2.581	137
		Fert. N Foliar	3.534	2.569	139
		Fert, N Suelo	3.694	2.681	139
Temprana	DM4612		3.883	2.935	133 b
	NS4619		4.015	2.824	142 a
Tardía	DM4612		3.420	2.460	140 b
	NS4619		3.064	2.222	138 b
Temprana		Control	3.890	2.836	136
		Fert. N Foliar	3.926	2.848	138
		Fert. N Suelo	4.032	2.953	138
Tardía		Control	3.228	2.325	138
		Fert. N Foliar	3.142	2.288	139
		Fert, N Suelo	3.357	2.409	140
Fecha de siembra (FS)			***	***	ns
Genotipo (G)			ns	ns	**
Tratamiento (T)			ns	ns	ns
FS x G			ns	ns	**
FS x T			ns	ns	ns
G x T			ns	ns	ns
FS x G x T			ns	ns	ns

\* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; ns: no significativo.

### 3.3.2. Concentración de proteína en grano, absorción de N y FBN

La fecha de siembra ( $P < 0,01$ ), el genotipo ( $P < 0,001$ ) y los tratamientos de fertilización ( $P < 0,001$ ) afectaron la concentración de proteína en grano (Tabla 3.2). La siembra tardía presentó mayor concentración de proteína que la temprana (1,3% más alta; Tabla 3.2). El genotipo NS4619 tuvo una concentración de proteína mayor que DM4612 (3,6% más; Tabla 3.2). Todos los aumentos en las concentraciones de proteína se asociaron con ganancias en el contenido de proteína en grano entendido como  $\text{mg grano}^{-1}$  (Tabla 3.2).

Las aplicaciones de los tratamientos de N foliar y de suelo dieron como resultado concentraciones de proteína en grano más altas que el control ( $P < 0,001$ ), pero no en todas las combinaciones de genotipos y fechas de siembra. El promedio de los genotipos y las fechas de siembra fue de 35,7, 37,1 y 36,9% para los tratamientos control, foliar y suelo, respectivamente (Tabla 3.2). Una interacción significativa entre la fertilización con N y la fecha de siembra fue evidente, mostrando que la respuesta de la proteína a la fertilización con N fue dependiente de la fecha de siembra ( $P < 0,01$ , Tabla 3.2). La concentración de proteína no difirió entre los tratamientos de fertilización en la fecha de siembra temprana (Tabla 3.2). En la fecha de siembra tardía, aumentó, con respecto al control, de 35,7 a 37,6% para aplicaciones de N en el suelo, y de 35,7 a 38,2% para aplicaciones foliares.

**Tabla 3.2.** Efecto de la fecha de siembra (FS), el genotipo, los tratamientos de fertilización con N y su interacción, sobre la concentración de proteína, la concentración de aceite, el contenido de proteína, el contenido de aceite y el contenido residual en madurez fisiológica. Ambos tratamientos de fertilización se aplicaron en R3, R4, R5.5 y R6, para totalizar 80 kg de N  $\text{ha}^{-1}$ . Diferentes letras dentro del mismo efecto representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

Fecha de siembra	Genotipo	Tratamiento de fertilización	Proteína (%)	Aceite (%)	Cont. de proteína (mg grano <sup>-1</sup> )	Cont. de aceite (mg grano <sup>-1</sup> )	Cont. de residual (mg grano <sup>-1</sup> )
Temprana			35,9 b	21,4 a	49,3 b	29,4	58,7
Tardía			37,2 a	19,9 b	51,9 a	27,1	57,9
	DM4612		34,8 b	21,8 a	47,6 b	29,6 a	58,8
	NS4619		38,4 a	19,5 b	53,7 a	26,9 b	57,8
		Control	35,7 b	20,8	48,8 b	28,4	59,9
		Fert. N Foliar	37,1 a	20,8	51,3 a	27,9	56,2
		Fert. N Suelo	36,9 a	20,5	51,8 a	28,4	58,9
Temprana	DM4612		34,0	22,7	45,1 c	30,1 a	57,5 a
	NS4619		37,8	20,2	53,4 a	28,8 a	60,1 a
Tardía	DM4612		35,5	21,0	50,0 b	29,1 a	59,9 a
	NS4619		38,9	18,8	53,8 a	25,1 b	55,7 a
Temprana		Control	35,6 b	21,4	48,3	29,2	59,0
		Fert. N Foliar	35,9 b	21,7	49,6	29,9	58,4
		Fert. N Suelo	36,3 b	21,1	50,2	29,1	58,6
Tardía		Control	35,7 b	20,1	48,3	27,6	60,7
		Fert. N Foliar	38,2 a	19,8	53,0	25,9	54,0
		Fert. N Suelo	37,6 a	19,8	53,4	27,7	59,1
Fecha de siembra (FS)			ns	**	**	ns	ns
Genotipo (G)			***	***	***	***	ns
Tratamiento (T)			*	***	ns	ns	ns
FS x G			*	ns	ns	*	*
FS x T			ns	**	ns	ns	ns
G x T			ns	ns	ns	ns	ns
FS x G x T			ns	ns	ns	ns	ns

\* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; ns: no significativo.

**Tabla 3.3.** Efecto de la fecha de siembra, el genotipo, los tratamientos de fertilización con N y sus interacciones sobre la absorción total de N del canopeo, la fijación biológica de N (FBN) y el índice de cosecha de N (ICN) en madurez fisiológica. Ambos tratamientos de fertilización se aplicaron en R3, R4, R5.5 y R6, totalizando 80 kg de N ha<sup>-1</sup>. Diferentes letras dentro del mismo efecto representan diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

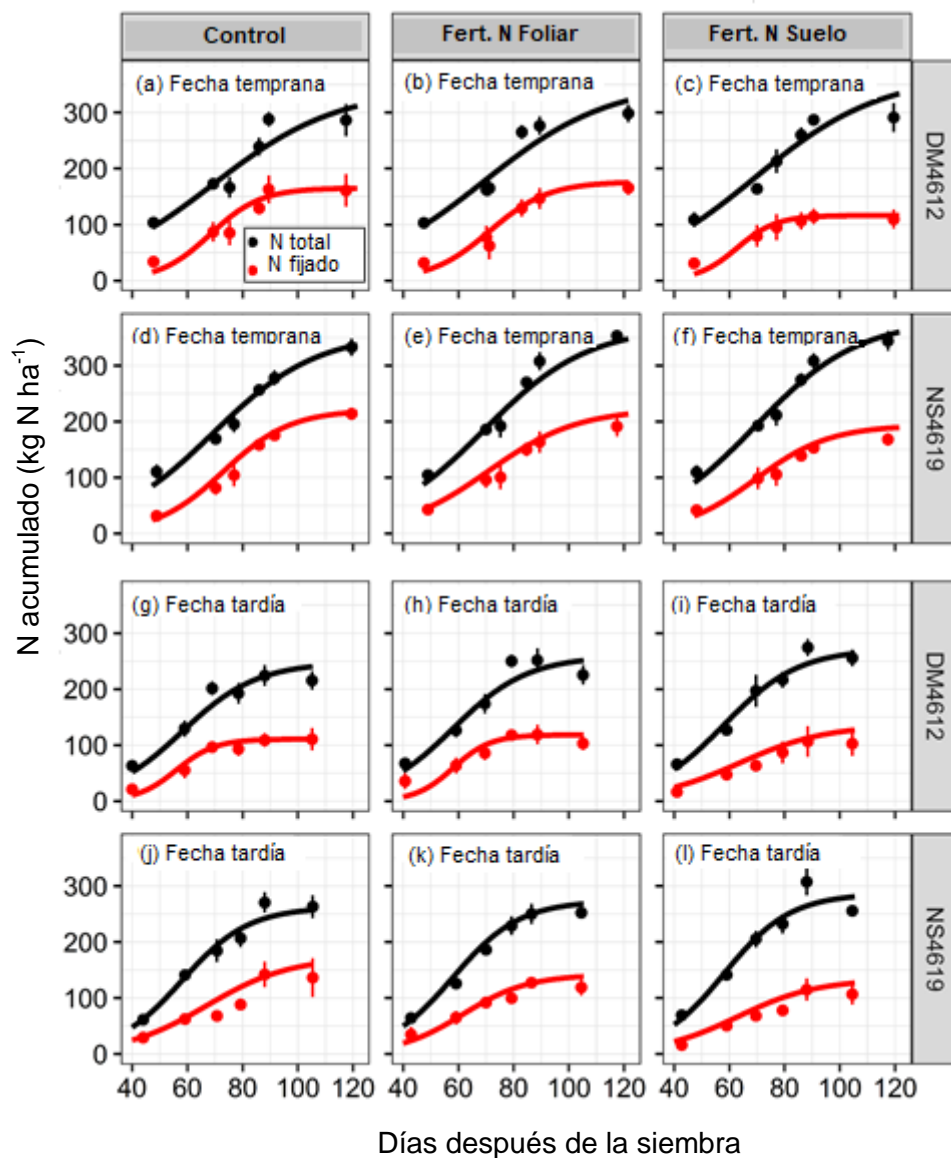
Fecha de siembra	Genotipo	Fertilización N	Captura total de N (kg ha <sup>-1</sup> )	FBN (%)	ICN (kg kg <sup>-1</sup> )
Temprana			314 a	52,4 a	0,72 b
Tardía			246 b	46,6 b	0,78 a
	DM4612		264 b	47,8	0,76 a
	NS4619		295 a	50,8	0,74 b
		Control	275	55,0 a	0,74
		Fert. N Foliar	276	50,8 a	0,76
		Fert. N Suelo	289	42,1 b	0,76
Temprana	DM4612		288	48,7	0,73
	NS4619		337	55,3	0,72
Tardía	DM4612		243	46,9	0,80
	NS4619		251	46,3	0,75
Temprana		Control	311	58,8	0,71
		Fert. N Foliar	313	54,7	0,72
		Fert. N Suelo	316	42,5	0,74
Tardía		Control	238	51,1	0,76
		Fert. N Foliar	239	46,9	0,80
		Fert. N Suelo	260	41,7	0,77
Fecha de siembra (FS)			***	*	**
Genotipo (G)			**	ns	**
Tratamiento (T)			ns	***	ns
FS x G			ns	ns	ns
FS x T			ns	ns	ns
G x T			ns	ns	ns
FS x G x T			ns	ns	ns

\* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; ns: no significativo

La captura total de N se vio afectada por la fecha de siembra, y fue mayor en la temprana que en la tardía ( $P < 0,001$ , Tabla 3.3). Además, los genotipos fueron significativamente diferentes ( $P < 0,01$ ; Tabla 3.3). NS4619 capturó  $31 \text{ kg ha}^{-1}$  más de N total que DM4612 (Tabla 3.3). No se observó ningún efecto de los tratamientos de fertilización con N en ninguna de las dos fechas de siembra para este parámetro ( $P > 0,05$ ; Tabla 3.3).

La fecha de siembra ( $P < 0,05$ ) y los tratamientos de fertilización ( $P < 0,001$ ) mostraron diferencias significativas en la proporción de N proveniente de FBN (Tabla 3.3). En promedio, la FBN para cada fecha de siembra fue de 52,4 y 46,6% (Tabla 3.3). Aunque la interacción entre el tratamiento de fertilización y la fecha de siembra no fue significativa ( $P > 0,05$ ), la magnitud del efecto de adición de N no fue la misma en ambas fechas de siembra. La FBN fue máxima en el tratamiento control de ambas fechas de siembra y también fue muy afectado por el tratamiento de fertilización con N en el suelo (Tabla 3.3).

Las dinámicas temporales de la captura total de N y la FBN a lo largo de la fenología del cultivo se muestran en la Figura 3.1. Las mayores diferencias entre ambas curvas se observaron en el tratamiento de fertilización con N en el suelo (Figs. 3.1c, 3.1f, 3.1i y 3.1l). Para la absorción total de N,  $Y_{\text{max}}$  (la absorción máxima de N) se vio afectada por la fecha de siembra, el genotipo y la fertilización nitrogenada. En general,  $Y_{\text{max}}$  fue  $\sim 354 \text{ kg N ha}^{-1}$  (Tabla 3.4). Este valor de referencia se redujo en la fecha de siembra tardía y ante la falta de fertilización con N, y se incrementó en el caso del genotipo NS4619. La fecha de siembra tardía se asoció con una curva más pronunciada y un tiempo más corto hasta la tasa máxima de absorción de N (Tabla 3.4).



**Figura 3.1.** Dinámicas del N total y fijado biológicamente entre R2 y R5 para la fecha de siembra temprana y tardía y para los dos genotipos. Los puntos son datos observados (media  $\pm$  error estándar) y las curvas son predicciones derivadas del análisis de modelos mixtos no lineales utilizando una función logística como modelo de respuesta. Las estimaciones de los parámetros se informan en las Tablas 3.4 (N total) y 3.5 (N fijado).

**Tabla 3.4.** Análisis de modelos mixtos no lineales para las dinámicas temporales de acumulación total de N ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) según la fecha de siembra (FS), el genotipo y la fertilización con N evaluados en las campañas 2015/16 y 2016/17. Se presenta el mejor modelo basado en el AIC de los 964 modelos posibles evaluados.  $Y_{m\acute{a}x}$  es la absorción máxima de N o asintótica,  $k$  está asociada con la pendiente de la curva y  $tm$  es el punto de inflexión que indica el día de la tasa máxima de absorción de N.

Parámetro	Efectos fijos	Estimado	E.E.	G.L.	Valor t
$Y_{m\acute{a}x}$	(intercepto)	354,7	11,9	501	29,8
	FS tardía	-95,9	13,5	501	-7,1
	NS4619	14,7	6,1	501	2,4
	Fert. N Suelo	13,0	5,8	501	2,2
	Control	-11,3	5,9	501	-1,9
$k$	(intercepto)	0,044	0,005	501	8,0
	FS tardía	0,030	0,009	501	3,3
	NS4619	0,009	0,004	501	2,1
$tm$	(intercepto)	69,3	3,9	501	17,9
	FS tardía	-11,3	5,4	501	-2,1
	Efectos aleatorios	Desvío estándar			Residual
		$Y_{m\acute{a}x}$	$K$	$tm$	
	Nivel: Año	7,2E-04	5,7E-03	5,0	
	Nivel: Bloque(Año)	9,4	1,4E-05	0,05	37,0

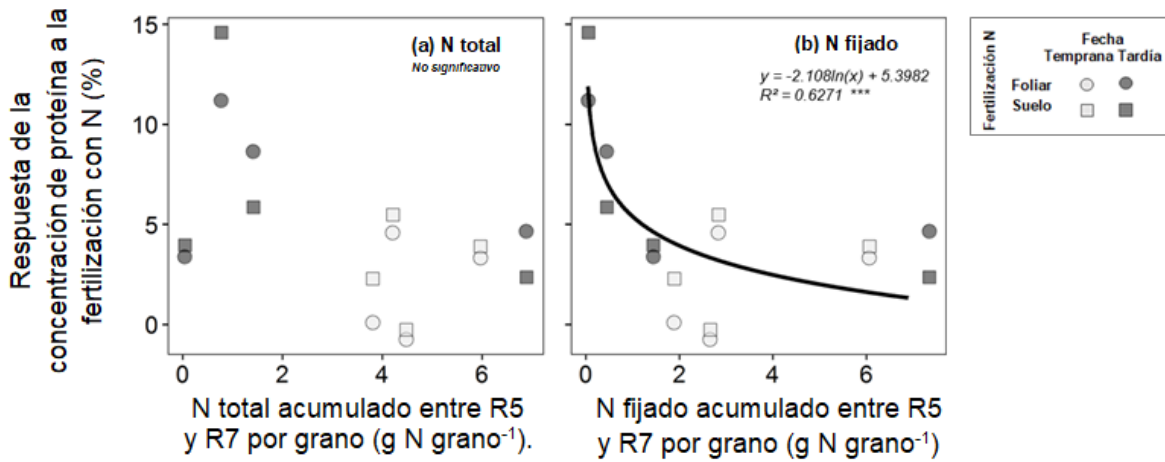
La respuesta de la dinámica de la fijación de N a los factores experimentales fue mucho más compleja que la de la absorción total de N. En este caso, el valor de  $Y_{m\acute{a}x}$  para la FBN fue de  $\sim 158 \text{ kg ha}^{-1}$ , sin embargo, este valor no solo se redujo en la siembra tardía y la fertilización en el suelo, sino que también fue modificado por NS4619, el control y las interacciones entre la fecha de siembra, el genotipo y el tratamiento de fertilización nitrogenada (Tabla 3.5). La pendiente de la curva fue menor en el genotipo NS4619 y se incrementaron los días hacia la tasa de fijación máxima.

**Tabla 3.5.** Análisis de modelos mixtos no lineales para la dinámica temporal de acumulación de N fijado ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) según la fecha de siembra (FS), el genotipo y la fertilización con N evaluados en las campañas 2015/16 y 2016/17. Se presenta el mejor modelo basado en el AIC de los 964 modelos posibles evaluados.  $Y_{\text{máx}}$  es la fijación máxima o asintótica de N,  $k$  está asociado con la inclinación de la curva y  $tm$  es el punto de inflexión que indica el día de la tasa máxima de fijación de N.

Parámetro	Efectos fijos	Estimado	E.E.	G.L.	Valor t
$Y_{\text{máx}}$	(intercepto)	158,0	16,2	495	9,7
	FS tardía	-32,7	22,6	495	-1,4
	NS4619	58,9	12,6	495	4,7
	Fert. N Suelo	-32,2	9,0	495	-3,6
	Control	1,9	9,2	495	0,2
	FS tardía x NS4619	-32,5	15,5	495	-2,1
	FS tardía x Fert. N Suelo	10,4	12,6	495	0,8
	FS tardía x Control	-9,4	12,7	495	-0,7
	NS4619 x Fert. N Suelo	17,5	13,8	495	1,3
	NS4619 x Control	5,4	14,0	495	0,4
	FS tardía x NS4619 x Fert. N Suelo	-16,6	19,7	495	-0,8
	FS tardía x NS4619 x Control	8,5	20,3	495	0,4
$k$	(intercepto)	0,1125	0,0241	495	4,7
	NS4619	-0,0468	0,0114	495	-4,1
$tm$	(intercepto)	61,1	4,7	495	13,0
	NS4619	4,5	1,7	495	2,7
Efectos aleatorios		Desvío estándar			Residual
		$Y_{\text{máx}}$	$k$	$tm$	
Nivel: Año		18,3	0,04	8,6	
Nivel: Bloque (Año)		14,1	5,4E-06	2,7	30,4

La respuesta relativa de la proteína en grano a la fertilización con N no se asoció con la cantidad de absorción de N de R5 a R7 por unidad de grano ( $\text{g N grano}^{-1}$ , Figura 3.2a). Esta respuesta contrasta con la relación negativa exponencial observada entre la respuesta de la

proteína en grano a la fertilización con N y la cantidad de N fijada por unidad de grano de R5 a R7 (Figura 3.2b).



**Figura 3.2.** Relación entre la respuesta relativa de la concentración de proteína a la fertilización con N y (a) el N total acumulado o (b) el N fijado acumulado entre R5 y R7 por unidad de grano.

### 3.4. DISCUSIÓN

El objetivo principal fue evaluar la capacidad de las fertilizaciones nitrogenadas en etapas tardías para aumentar la concentración de proteína en grano en diferentes fechas de siembra y genotipos. Al promediar las respuestas de los genotipos y las fechas de siembra, los resultados mostraron aumentos en la concentración de proteína de 1,4 y 1,2% ante las aplicaciones de N foliar y del suelo, respectivamente. Sin embargo, la respuesta de la proteína en grano a la fertilización con N solo fue relevante en siembras tardías. En este sentido, ambos tratamientos de fertilización mostraron una mayor concentración de proteína en grano (2,5% más) pero solamente en algunos escenarios particulares. La fertilización tardía con N puede tener un impacto en la concentración de proteína, pero la respuesta depende de otras opciones de manejo relevantes como la fecha de siembra. Esta interacción contribuye a explorar y comprender la capacidad de prácticas de manejo específicas dirigidas a mejorar la calidad de grano.

Los estudios centrados en probar las opciones de manejo del N para aumentar los niveles de proteína de soja son escasos, y mostraron respuestas variables. Se obtuvo un promedio de 1,4% de aumento de la concentración de proteína asociada con los tratamientos de fertilización con N. Esta respuesta fue similar a los resultados de Schmitt et al. (2001) que encontraron un aumento de 1,2% de proteína después de aplicar urea durante la etapa de crecimiento R4 a R5, en Minnesota. Además, el aumento de los niveles de proteína como resultado de la fertilización con N fue similar a los obtenidos en Argentina y EE. UU en una amplia gama de fechas de siembra y niveles de rendimiento (Cafaro La Menza et al., 2017 y 2019). A diferencia nuestro estudio, donde la tasa de fertilización fue de 80 kg N ha<sup>-1</sup>, Rotundo y Westgate (2009) encontraron que la concentración de proteína aumentó solamente cuando se aplicaron más de 100 kg N ha<sup>-1</sup>. Barker y Sawyer (2005) evaluaron el efecto de la urea y la urea recubierta con polímero aplicada en bandas subsuperficiales a niveles de 45 y 90 kg de N ha<sup>-1</sup>, en R3. En este caso, el tratamiento de fertilización con N no cambió la concentración de proteína en grano.

Los resultados del presente capítulo, en relación al rendimiento y la fertilización con N, no son consistentes con varios trabajos publicados, sin embargo, la tasa de fertilización nitrogenada usada en nuestro estudio fue 4-8 veces menor. Cafaro La Menza et al. (2017, 2019) descubrieron que el rendimiento aumentó en el tratamiento con N (> 330 kg N ha<sup>-1</sup>), en

relación con el tratamiento con cero N, en lotes con un nivel potencial de rendimiento mayor de 2.500 kg ha<sup>-1</sup>. Ciampitti et al. (2016), observaron mayores rendimientos cuando la fertilización fue la principal fuente de N, especialmente a 600 kg N ha<sup>-1</sup>, que cuando la nutrición nitrogenada dependió únicamente de la inoculación. Estas diferencias de rendimiento fueron menores cuando la tasa de N se redujo a 50 kg de N ha<sup>-1</sup>. Además, Ortez et al. (2018) mostraron que los tratamientos de 670 kg N ha<sup>-1</sup> dieron como resultado un aumento del rendimiento de 4 y 12% en relación con los tratamientos no fertilizados en Argentina y EE. UU., respectivamente. Sin embargo, se debe reconocer que esta alta tasa de fertilizante está lejos de cualquier umbral rentable y sostenible, este tratamiento de fertilización se implementó para obtener un escenario de N no limitante. En cuanto a la concentración de proteína en grano, no se observaron efectos de los tratamientos con N.

Otros autores mostraron que el rendimiento responde al tratamiento de fertilización con N solamente en cultivos de alto rendimiento (más de 4.500 kg ha<sup>-1</sup>, Salvagiotti et al., 2008). En el experimento desarrollado en el presente capítulo, los tratamientos de fertilización con N no tuvieron un impacto significativo en el rendimiento, que varió de 3.534 a 3.694 kg ha<sup>-1</sup>. Estos resultados concuerdan con Welch et al. (1973), quienes no encontraron diferencias en el rendimiento para la fertilización con N en floración temprana o durante el llenado de granos. De manera similar, Barker y Sawyer (2005), al evaluar las fuentes de N y la ubicación del N en Iowa, no encontraron efectos significativos en el rendimiento, con solamente un aumento de 39 kg ha<sup>-1</sup>.

La aplicación de N en el suelo o de manera foliar afectó negativamente la FBN. Al aumentar la disponibilidad de N en el suelo, esta inhibición aumentó, lo que sugiere un efecto negativo más local del N sobre la FBN en lugar de una respuesta sistemática de toda la planta. Sin embargo, el nivel de supresión fue relativamente bajo, probablemente debido al momento de la aplicación. Los efectos inhibitorios del N sobre la FBN se reducen a medida que la aplicación se retrasa en el ciclo de crecimiento (Santachiara et al. 2019). Tamagno et al. (2018) informaron reducciones en el pico de FBN de hasta el 16% cuando se aplicó N en plena floración. La baja fue aún mayor cuando la aplicación de N se retrasó de las etapas vegetativas a reproductivas. Otros autores evaluaron los tratamientos de fertilización con 80 kg N ha<sup>-1</sup> durante el llenado de granos (40 kg ha<sup>-1</sup> de suelo más 40 kg N ha<sup>-1</sup> de fertilizante foliar), lo que disminuyó la FBN significativamente, del 37 al 25% (Azfa et al., 1987).

Se identificaron los factores que afectan la dinámica de la fijación del N durante el período de crecimiento. En su mayor parte, la siembra tardía y la fertilización con N del suelo inhibieron la cantidad potencial de N fijada en forma biológica sin afectar otros parámetros de la dinámica temporal. Más interesante aún, fue posible encontrar un predictor de la magnitud de la respuesta de la proteína a la fertilización con nitrógeno. Los datos indican que a medida que aumenta la cantidad de N fijada por unidad de grano, se reduce la probabilidad de tener una respuesta positiva a la fertilización nitrogenada. Esto es consistente con los resultados de Santachiara et al (2017) que indicaron que el N fijado durante el llenado de granos se destina preferentemente a los granos en comparación con el N que proviene del suelo. Este resultado sugiere que una reducción en la FBN por grano durante el período de llenado de granos puede ser superada por aplicaciones de N en estadios tardíos del cultivo.

### 3.5. CONCLUSIONES

Las fertilizaciones foliares y del suelo durante los estadios reproductivos de soja aumentaron la concentración de proteína en grano. Sin embargo, este aumento no fue consistente en todas las fechas de siembra y genotipos. Para nuestro estudio, la respuesta de la concentración de proteína en grano a la fertilización con N solamente fue evidente en las siembras tardías en los dos genotipos evaluados. Bajo estas condiciones, ambos tratamientos (foliar y del suelo) tuvieron ganancias similares.

Las fertilizaciones nitrogenadas no tuvieron efecto sobre la captura de N del cultivo, y el N proveniente de la FBN fue menor en todos los tratamientos de fertilización con N comparado con el control. Cuando el N se aplicó en el suelo, la FBN fue la más afectada, en todos los genotipos probados y las fechas de siembra.

Debido a que las fertilizaciones con N durante las etapas reproductivas no ayudaron a aumentar los niveles de concentración de proteína en grano en todas las condiciones analizadas, el tratamiento necesitará pruebas adicionales en ambientes específicos.

Conocer el efecto de herramientas de manejo sobre la concentración de proteína en grano es clave para lograr los estándares comerciales de las harinas proteicas. Poder alcanzar los requerimientos de la industria es crucial para incursionar en nuevos mercados de alto valor agregado. Generar información sobre cómo el manejo y el ambiente influyen en la proteína será de utilidad para elaborar subproductos proteicos de alta calidad. Para profundizar el análisis, no solo es relevante la concentración en lo que refiere a proteína, sino también la composición de la misma, ya que es una variable fundamental para caracterizar una de las propiedades funcionales más importantes de las harinas de soja, la solubilidad. El capítulo IV de la presente tesis aborda estos conceptos y explora dichas variables en genotipos de diferentes etapas evolutivas de la soja.



## **CAPÍTULO IV**

# **CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIÓN DE PROTEÍNA EN GENOTIPOS DE DISTINTAS ETAPAS EVOLUTIVAS**

---

## 4. CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIÓN DE PROTEÍNA EN GENOTIPOS DE DISTINTAS ETAPAS EVOLUTIVAS

### 4.1. INTRODUCCIÓN

La soja [*Glycine max* (L.)] es el principal contribuyente a la producción mundial de proteínas de origen vegetal (FAO, 2020). Actualmente, la mayor proporción de la harina de soja producida se utiliza como materia prima para la alimentación animal. Sin embargo, una proporción cada vez mayor tiene aplicaciones relevantes en productos para alimentación humana y usos industriales.

La harina de soja es ampliamente reconocida por su alta concentración de proteína y propiedades funcionales (Wolf, 1970). Los productos derivados de la harina de soja, como los aislados y concentrados proteicos, se utilizan ampliamente en formulaciones alimentarias, así como en aplicaciones industriales, como adhesivos y plásticos (Deak et al., 2008). Las harinas de soja desgrasadas con solventes y con alto contenido de proteína, en general, tienen concentraciones del rango de 54.0 a 55.6% (base seca). Aunque los estándares comerciales también consideran harinas de menor calidad, las harinas ricas en proteínas son las más demandadas en todo el mundo.

El mejoramiento comercial de la soja se ha centrado tradicionalmente en aumentar el rendimiento del cultivo. La concentración de proteína en granos no ha sido un rasgo que tradicionalmente se haya considerado como crítico en este proceso (Rowntree et al., 2013; de Felipe et al., 2016). Esto ha resultado en genotipos con mayor rendimiento y menor concentración de proteína en grano (de Felipe et al., 2016). Además, la estrecha selección parental inicial de la mayoría de los programas de mejoramiento ha dado como resultado una diversidad genética limitada dentro de los genotipos comerciales (Brown-Guedira et al., 2001, de Felipe et al., 2016). A nivel genético, existe una correlación negativa entre el rendimiento y la proteína en grano (Rotundo et al., 2009). Por estas razones, los genotipos de soja no domesticados y ancestrales tienen concentraciones de proteína más altas que las observadas en los genotipos utilizados actualmente (Krishnan et al., 2006). Se ha propuesto la introducción de *Glycine soja*, genotipos ancestrales y variedades asiáticas dentro de los programas de mejoramiento como una fuente de variación genética adicional para aumentar la concentración

de proteína en grano mientras se mantienen rendimientos competitivos (La et al., 2019). Sin embargo, su composición proteica no se ha caracterizado completamente.

Además de su valor nutricional, la proteína de soja proporciona propiedades funcionales únicas a las harinas y sus derivados. En general, la solubilidad de las proteínas se considera un marcador de la funcionalidad de las proteínas (Kinsella et al., 1979). Las tecnologías de procesamiento de las harinas se han desarrollado ampliamente para producir ingredientes proteicos altamente solubles como los aislados. La producción de aislados proteicos se basa en la solubilidad diferencial de las proteínas de soja en condiciones de pH contrastantes (es decir, pH alcalino e isoelectrico). Además de las condiciones de procesamiento, como el pH y la temperatura, la solubilidad de las proteínas también puede verse afectada por el genotipo (Khatib et al., 2002). Es fundamental que se mantenga la solubilidad de la proteína en los derivados de la molienda de la soja para preservar su funcionalidad como ingrediente y la eficiencia de los procesos involucrados en la producción de otros productos tales como los aislados.

Los componentes principales de la fracción proteica del grano de soja y, por consiguiente, de la harina desgrasada resultante son la glicinina (Gli) y la  $\beta$ -conglucina (Bc) (Hermansson et al., 1978; Brumm et al., 2004). Diferentes concentraciones y composiciones de proteína en grano dan como resultado diversas propiedades funcionales de la harina de soja, en particular la solubilidad (Rickert et al., 2004; García Rebollar et al., 2016). Con respecto a la composición de proteínas, la Gli y la Bc constituyen aproximadamente el 70% de las proteínas de almacenamiento (Kinsella et al., 1979, Nielsen et al., 1989). La Gli es un hexámero de 320-375 kDa, cuyas seis subunidades están compuestas por un polipéptido ácido (35 kDa) y un polipéptido básico (20 kDa). La segunda proteína, Bc, es un trímero de 150-200 kDa formado por cuatro subunidades, de las cuales  $\alpha$  (71 kDa),  $\alpha'$  (67 kDa) y  $\beta$  (50 kDa) son las más importantes (Maruyama et al., 1999). Estudios previos demostraron que la composición del grano, y especialmente la relación Gli / Bc, dependen de la elección del genotipo (Murphy et al., 1984; Pesic et al., 2005; Bosaz et al., 2019). Kwanyuen et al. (1998) encontraron que la proporción Gli / Bc varía entre diferentes genotipos. Krishnan et al. (2006) evaluaron genotipos ancestrales y modernos y demostraron que los genotipos modernos presentan una concentración de subunidad  $\beta$  de la Bc notablemente menor. Pesic et al. (2005) encontraron diferencias en la concentración de Bc y Gli, así como en la relación Gli / Bc entre los genotipos evaluados. Comprender la variación genética en relación con la composición de la proteína en

grano y su impacto en la solubilidad de la proteína de la harina contribuirá a entender mejor el impacto del genotipo sobre la funcionalidad de la proteína, esto impacta fundamentalmente en el uso de la harina como ingrediente y como materia prima de otros procesos.

La evaluación de genotipos resultantes de diferentes etapas evolutivas del cultivo (ancestros silvestres de la soja (*G. soja*), variedades asiáticas domesticadas y ancestros norteamericanos) permitirá cuantificar el potencial genético del germoplasma exótico disponible para la reproducción con enfoque en parámetros de calidad industrial. Es de interés establecer si existe variación genética en la concentración de proteínas, composición y perfil de solubilidad de las harinas obtenidas de genotipos representativos de distintas etapas evolutivas del cultivo. Tener esta información es fundamental para comprender si el uso de genotipos antiguos en programas de mejoramiento puede afectar la calidad, y posiblemente, el rendimiento del producto final.

Los objetivos del presente estudio fueron (i) caracterizar la concentración y composición de proteína en grano en genotipos de diferentes etapas evolutivas de la soja (ancestros silvestres (*G. soja*), variedades asiáticas domesticadas, ancestros norteamericanos y genotipos comerciales actuales) y (ii) evaluar la concentración de proteína y perfiles de solubilidad de las harinas desgrasadas obtenidas de estos genotipos.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. Materiales vegetales

Se utilizaron genotipos correspondientes a cuatro etapas evolutivas diferentes del cultivo de soja (Hyten et al., 2006; Rotundo et al., 2016): (i) siete accesiones de *G. soja* recolectadas de sus áreas de distribución natural en China, Corea y Japón (de ahora en adelante ancestros silvestres), (ii) cinco variedades locales de *Glycine max* (L.) Merr., domesticadas en China, Corea y Japón (a partir de ahora variedades locales asiáticas), (iii) cinco fundadores de *G. max* de América del Norte (a partir de ahora ancestrales NAm) y (iv) cinco genotipos comerciales élite que se utilizan actualmente en Argentina (Tabla 4.1).

Los genotipos se sembraron durante la campaña agrícola 2017/2018, en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, ubicada en Zavalla, Santa Fe, Argentina (33 ° 1 ' S, 60 ° 53 ' W). Las parcelas fueron de un surco y de 5,5 m de largo. Las semillas se trataron con fungicida y se inocularon con bacterias simbióticas fijadoras de N<sub>2</sub> [*Bradyrhizobium japonicum*]. La densidad final de plantas fue de 30 plantas m<sup>-2</sup> aproximadamente. Las malezas, plagas y enfermedades se controlaron químicamente con productos comerciales recomendados. Se evaluaron dos ambientes diferentes mediante el uso de dos fechas de siembra, con dos repeticiones. La siembra temprana fue el 6 de diciembre y la tardía el 27 de diciembre.

### 4.2.2. Variables medidas

#### 4.2.2.1. Concentración de proteína y aceite en grano

Los granos de soja de cada parcela se molieron con un molinillo de laboratorio (Tecnodalvo, Argentina). El contenido de nitrógeno se determinó mediante el método de Kjeldahl (McKenzie y Wallace, 1954) y se transformó a concentración de proteína utilizando el factor de conversión 6,25 (Jung et al., 2003). Para determinar la concentración de aceite, una alícuota de 0,5 g se desgrasó cuatro veces con hexanos (3 ml). Después de agitar con vórtex durante 1 minuto, la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 3.000 g y a 18°C. Se agruparon los sobrenadantes, se dejaron durante la noche bajo la campana para la evaporación del

solvente y se pesó el aceite. Las concentraciones de proteína y aceite se calcularon y se informaron como porcentaje en base seca (b.s.).

**Tabla 4.1.** Genotipos evaluados dentro de cuatro tipos: 7 ancestros silvestres (*G. soja*), 5 variedades locales asiáticas, 5 ancestros de América del Norte (NAm) y 5 genotipos Elite de Argentina.

Tipo	Genotipo
Ancestros silvestres ( <i>G. soja</i> )	PI339871A
	PI407027
	PI483464A
	PI549046
	PI597459D
	PI597461A
	PI468400A
Variedades locales asiáticas	FC33243
	PI567298
	PI567368
	PI594615
	PI594777
Ancestrales NAm	PI548362
	PI548456
	PI548485
	PI548603
	PI548657
Elite	A5009
	DM3810
	DM4612
	NS4619
	SPS4X4

#### 4.2.2.2. Obtención de harina de soja desgrasada

A los granos (20,00 g) se les extrajo el tegumento manualmente. Se pesaron los tegumentos y se calculó la proporción del mismo (%). Los granos descascarados se molieron usando un CT293 Cyclotec™ (Foss, Dinamarca) equipado con una malla de 0,5 mm. Una alícuota de 0,5 g se desgrasó cuatro veces con hexano (3 ml). Después de cada extracción, la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 3.000 g y a 18 ° C. Los sobrenadantes se descartaron y la harina desgrasada se desolventizó durante la noche a temperatura ambiente bajo campana de extracción. La concentración de proteína se determinó como se describió previamente.

#### 4.2.2.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se extrajo harina de soja desgrasada (0,15 g) con 3 ml de buffer de muestra (Tris-HCL 60 mM (pH 6,8), dodecilsulfato de sodio al 2% (p/v), glicerol al 10% (v/v), azul de bromofenol 0,3 mM, urea 8M y 5%, 2-mercaptoetanol (v/v)). La suspensión se calentó en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y se centrifugó (15.800 g, 15 minutos). El sobrenadante (10 µl) se cargó en un gel de resolución al 13,5% (p/v, Krishnan et al., 2006). La electroforesis se realizó mediante un sistema de electroforesis Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad, CA), y las proteínas se separaron a voltaje constante y 30 mA por gel. Los geles de poliacrilamida se tiñeron con 25% (v/v) Coomassie Blue G-2500, metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante dos horas. Los geles teñidos se sumergieron en etanol al 10% (v/v), 10% (v/v) de ácido acético y 80% (v/v) de agua destilada durante al menos tres horas. Se escanearon los geles y se utilizó el software Gel Analyzer v. 3.0 (Media Cybernetics, EE.UU.) para la densitometría. Se estimaron los pesos moleculares utilizando los estándares de Precision Plus Protein (Bio-Rad, CA).

#### 4.2.2.4. Perfil de solubilidad de proteínas

Se suspendió una alícuota de harina desgrasada (0,05 g) en 5 ml de agua desionizada y se ajustó el pH a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 usando HCl (0,2 M y 0,002 M) o NaOH (0,2 M y 0,002 M). Las soluciones se agitaron y se realizaron los ajustes de pH a 0, 15 y 40 min. Se registró el volumen de HCl o NaOH usado para el ajuste del pH y se corrigió el volumen final para calcular

la solubilidad de las proteínas. Las dispersiones se agitaron horizontalmente (140 golpes por minuto) durante 55 minutos y se centrifugaron a 10.000 g durante 30 minutos a 20°C. La concentración de proteína soluble se determinó mediante el método de Biuret (Gornall et al., 1949) utilizando una curva de calibración preparada con aislado proteico de soja (ADM, IL). La solubilidad se calculó utilizando la siguiente ecuación (Ec. 4.1):

$$\% \text{ de Solubilidad} = \left( \frac{\text{proteína en el sobrenadante (g)}}{\text{proteína en la alícuota de harina (g)}} \right) \times 100$$

Además, se calculó la cantidad de proteína extraída por g de harina como un indicador del rendimiento en los procesos de extracción de proteína.

$$\text{Proteína soluble en harina (g g}^{-1}\text{)} = \left( \frac{\text{proteína en harina}}{\text{solubilidad}} \right)$$

#### 4.2.3. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando un modelo de análisis de varianza en el software R con el paquete Agricolae (R Core Team, 2016). El ambiente (A), el tipo (T, período evolutivo) y genotipo anidado dentro de tipo (G [T]), y las interacciones A x T, A x (G [T]) se consideraron efectos fijos. Los datos de solubilidad se analizaron con el mismo modelo para cada pH. La significancia se estableció en  $\alpha = 0,05$ . Los componentes de la varianza y las diferencias mínimas significativas (LSD) de todos los rasgos evaluados se estimaron a partir del análisis ANOVA.

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Concentración de proteína y aceite en grano

La concentración de proteína en grano (%) mostró diferencias respecto a los ambientes ( $P < 0.001$ ) con 39.0 y 41.6% para el ambiente temprano y tardío, respectivamente (Tabla 4.2). Se encontraron diferencias significativas entre los cuatro tipos de soja evaluados ( $P < 0.001$ , Tabla 4.2), y este efecto explicó la mayor parte de la variación del modelo (42% SC). El tipo ancestros silvestres (*G. soja*) y Elite tuvieron las concentraciones máximas y mínimas de proteína en grano, respectivamente (42,9 y 36,3%). Las diferencias entre genotipos dentro de tipo también fueron evidentes ( $P < 0.001$ , Tabla 4.2). Sin embargo, las interacciones ambiente x genotipo dentro de tipo y ambiente x tipo también fueron significativas ( $P < 0.001$ ), lo que indica que las diferencias observadas entre los genotipos y los tipos dependieron también del ambiente (Tabla 4.2). Sin embargo, la gran mayoría de la variación asociada a la modelo se concentró en los factores tipo y genotipo dentro de tipo (Tabla 4.2). La concentración de proteína media osciló entre 33,9% en NS4619 (dentro del tipo Elite) en la fecha temprana, y 50,6% para PI594615 en la fecha tardía (dentro del tipo variedades locales asiáticas, Tabla Suplementaria 4.1).

La concentración de aceite se vio afectada significativamente por todos los efectos e interacciones principales ( $P < 0.05$ , Tabla 4.2). Se observó una concentración más alta en el ambiente temprano (15%,  $P < 0.001$ , Tabla 4.2). El efecto tipo explicó la mayor parte de la variación observada (73%SC) y, en promedio, el tipo Elite mostró el máximo (20,0%,  $P < 0.001$ ). La descripción completa de cada genotipo dentro de tipo en cada ambiente se describe como información suplementaria (Tabla Suplementaria 4.1).

#### 4.3.2. Proporción de tegumento

La proporción de tegumento (%) mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los efectos tipo, genotipo dentro de tipo y la interacción ambiente x genotipo dentro de tipo (Tabla 4.2). Las medias de los tipos variaron de 10,8 a 25,8% para los tipos Elite y ancestros silvestres (*G. soja*), respectivamente. Este efecto explicó la mayor parte de la variación total del modelo

(42%SC). El efecto ambiente x genotipo dentro de tipo fue significativo ( $P < 0.01$ ), ya que las diferencias entre los genotipos dependieron del ambiente (Tabla 4.2 y Tabla Suplementaria 4.1).

**Tabla 4.2.** Efectos del ambiente, tipo, genotipo dentro de tipo y la interacción ambiente x tipo sobre la proteína en grano, proteína en harina, aceite y proporción de tegumento. Una descripción completa de todos los genotipos anidados en tipos en cada ambiente está disponible como información suplementaria (Tabla Suplementaria 4.1). Se muestran los componentes de la varianza (en porcentaje) asociados al ambiente (A), tipo (T), genotipo dentro del tipo (G [T]), residual y todas las interacciones posibles.

Ambiente	Tipo	Genotipo (Tipo)	Proteína en grano (% b.s.)	Proteína en harina (% b.s.)	Aceite (% b.s.)	Proporción de tegumento (% b.s.)
Temprano	Tardío		39,0	48,8	15,0	15,2
			41,6	50,0	13,7	17,6
		Ancestros silvestres ( <i>G. soja</i> )	42,9	55,1	7,3	25,8
		Variedades locales asiáticas	41,1	47,7	14,8	12,2
		Ancestros NAm	40,0	48,4	17,0	13,8
		Elite	36,3	44,1	20,0	10,8
		Ancestros silvestres ( <i>G. soja</i> ) <i>media</i>	42,8	55,4	7,3	25,5
		Variedades locales asiáticas <i>media</i>	41,1	47,7	14,8	12,2
		Ancestros NAm <i>media</i>	40,1	48,4	17,0	13,8
		Elite <i>media</i>	36,3	44,1	20,0	10,9
Temprano		Ancestros silvestres ( <i>G. soja</i> )	42,1	55,1	7,1	25,9
		Variedades locales asiáticas	39,0	46,0	16,0	10,1
		Ancestros NAm	38,7	47,6	18,0	10,8
		Elite	34,9	43,8	22,0	11,0

Tardío	Ancestros silvestres ( <i>G. soja</i> )	43,7	56,0	7,4	25,6
	Variedades locales asiáticas	43,2	49,4	13,6	14,3
	Ancestrales NAm	41,3	49,2	15,9	16,9
	Elite	37,7	44,4	18,0	10,6

---

Ambiente(A)	***	***	***	ns
Tipo(T)	***	***	***	***
Genotipo[Tipo] (G[T])	***	***	***	*
A x T	** (1,5) <sup>a</sup>	***(1,3)	** (1,6)	ns
A x G[T]	***(2,5)	***(2,9)	* (3,7)	** (13,9)

---

Variancia %				
A	11	1	2	0
T	42	65	73	42
G[T]	33	24	14	17
A x T	2	1	2	2
A x G[T]	7	5	4	21
Residual	5	4	5	18

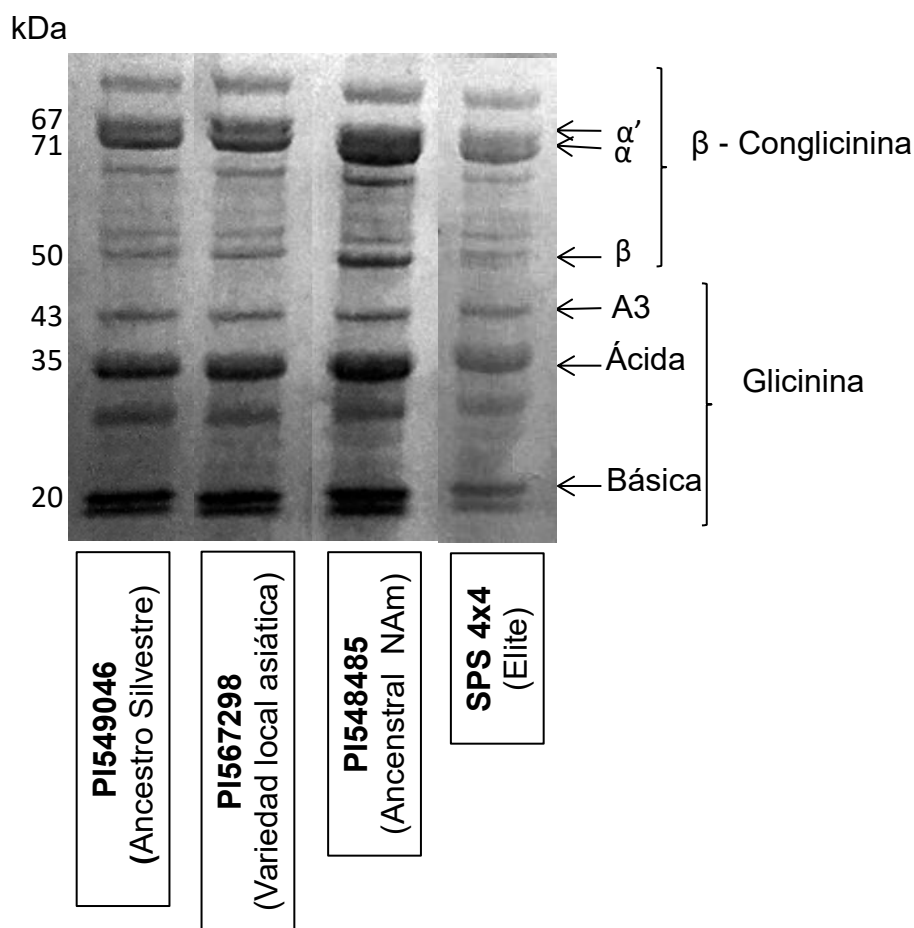
\* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; ns: no significativo.<sup>a</sup> Números entre paréntesis representan LSD de las medias a P<0.05.

#### 4.3.3. Concentración de proteína en harina de soja

La concentración de proteína en la harina de soja (%) mostró diferencias significativas para ambiente, tipo y genotipo dentro de tipo, así como para sus interacciones (P<0,001, Tabla 4.2). El tipo y el genotipo dentro del tipo fueron los factores que explicaron los mayores porcentajes de la variación del modelo, 65 y 24%SC respectivamente (Tabla 4.2). Los valores medios para los tipos evaluados fueron 55,1, 47,7, 48,4 y 44,1% para ancestros silvestres (*G.soja*), las variedades locales asiáticas, los Ancestros NAm y Elite, respectivamente (Tabla 4.2). Las concentraciones medias de los genotipos dentro de tipos variaron de 42,7% para DM46212 (dentro de los genotipos Elite) a 59,2% para PI339871A (dentro de ancestros silvestres (*G. soja*); Tabla Suplementaria 4.1).

#### 4.3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

La composición de las proteínas de los diferentes genotipos se analizó mediante SDS-PAGE. En la Figura 4.1 se pueden observar corridas electroforéticas representativas y para una comparación general, de un genotipo de cada etapa evolutiva analizada. La significancia de los efectos principales sobre la proporción de cada subunidad proteica se muestra en la Tabla 4.3.



**Figura 4.1.** Corridas electroforéticas en gel de poliacrilamida de resolución al 13,5% mediante un sistema de electroforesis Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad, CA). Se puede observar un genotipo representativo de cada etapa evolutiva analizada, las subunidades proteicas evaluadas y los pesos moleculares de cada una (kDa).

La Bc total no mostró diferencias significativas entre ambientes ni entre tipos (Tabla 4.3). El efecto del genotipo dentro del tipo fue significativo (Tabla 4.3,  $P < 0,001$ ) con un rango de 14,4

(PI567298) a 24,8% (PI483464A, Tabla 4.3). También representó la mayor parte de la variación total de la Bc (52%SC; Tabla 4.3), seguida por la interacción genotipo x ambiente (26%SC;  $P < 0,001$ ). Las proporciones mínimas y máximas se encontraron en PI407027 (11,1%) y PI483464A, respectivamente (25,2%), ambos en fecha de siembra tardía.

Con respecto a los componentes de la Bc, el genotipo dentro del tipo fue el efecto significativo ( $P < 0,001$ ) que describió la mayor parte de la variación ( $> 40\%$ SC) para las subunidades  $\beta$ ,  $\alpha$  y  $\alpha'$  (Tabla 4.3). Para la subunidad  $\beta$ , los valores medios variaron entre 3.6% (DM3810, tipo Elite) y 8.6% (PI483464A, dentro de ancestros silvestres (*G. soja*); Tabla 4.3). La interacción ambiente x tipo también fue significativa ( $P < 0.01$ ; Tabla 4.4). La proporción de la subunidad  $\alpha$  entre los genotipos osciló entre 3,0% (PI548485) y 7,7% (PI597459D, Tabla 4.3). A diferencia de los anteriores, además del efecto genotipo, la subunidad  $\alpha'$  mostró diferencias significativas entre ambientes ( $P < 0.01$ ), tipos ( $P < 0.01$ ), y la interacción genotipo x ambiente ( $P < 0.01$ , Tabla 4.3 y 4.4). Los valores medios variaron de 4.2% (PI567298, variedad local asiática) a 13.3% (PI468400A, ancestro silvestre (*G. soja*)), ambos dentro del ambiente temprano (Tabla 4.4).

Las diferencias en las proporciones de Gli total y todos sus componentes fueron significativas para el efecto genotipo dentro de tipo y ambas interacciones ( $P < 0,001$ , Tabla 4.3). Como se observó, con la Bc, el genotipo dentro del tipo representó la mayor parte de la variación asociada al modelo ( $> 35\%$ SC). Para la proporción total de Gli, los valores medios de los genotipos variaron entre 22,1% (PI567298, dentro de variedades locales asiáticas) en el ambiente temprano y 46,7% (PI548456, dentro de Ancestros NAm), en el ambiente tardío (Tabla 4.3). Los valores medios para cada combinación de genotipo y ambiente se describen en la Tabla 4.4.

**Tabla 4.3.** Efectos de ambiente, tipo y genotipo dentro de tipo sobre la betaconglucina (Bc), la glicina (Gli), sus subunidades y la relación Gli / Bc. Se muestran los componentes de la varianza (en porcentaje) asociados al ambiente (A), tipo (T), genotipo dentro del tipo (G [T]), residual y todas las interacciones posibles.

Ambiente	Tipo	Genotipo (Tipo)	% del total de proteína							Relación Gli / Bc	
			Bc (%)				Gli (%)				
			Total	$\beta$	$\alpha$	$\alpha'$	Total	Básica	Ácida		A3
Temprano			18,9	5,3	4,8	8,7	31,6	12,8	13,9	4,9	1,7
Tardío			18,2	5,6	4,7	7,7	31,5	13,1	13,4	5,1	1,8
	Ancestros silvestres		19,4	5,8	4,5	9,1	31,3	12,2	14,4	4,7	1,7
	Variedades locales asiáticas		18,2	5,3	5,0	7,9	31,5	13,0	13,5	5,0	1,8
	Ancestros NAM		17,9	5,7	4,9	7,3	32,1	13,4	13,4	5,3	1,9
	Elite		18,5	5,0	4,5	8,4	31,5	13,5	13,1	5,0	1,7
	Ancestros silvestres	PI339871A	18,2	5,5	3,1	9,7	33,3	12,4	15,6	5,3	1,8
		PI407027	17,0	4,6	3,5	8,9	28,5	12,3	12,3	4,0	1,9
		PI468400A	20,6	5,0	5,2	10,4	33,7	14,0	15,6	4,1	1,6
		PI483464A	24,8	8,6	4,0	12,2	28,3	11,0	12,2	5,1	1,1
		PI549046	15,7	5,0	4,0	6,8	24,9	8,2	12,1	4,6	1,6
		PI597459D	21,0	6,2	7,7	6,9	35,0	13,2	16,5	5,3	1,7
		PI597461A	19,2	5,1	4,6	9,6	36,6	15,4	17,2	4,1	1,9
	Variedades locales asiáticas	FC33243	18,5	3,9	6,9	7,8	27,9	11,0	12,9	3,9	1,5
		PI567298	14,4	5,5	4,5	4,4	24,3	8,7	10,7	5,0	1,7
		PI567368	18,5	6,4	4,2	7,9	36,6	17,1	13,6	6,0	2,0
		PI594615	18,1	5,0	5,0	8,2	27,6	11,4	11,0	5,2	1,6
		PI594777	21,4	5,7	4,6	11,2	41,3	17,0	19,5	4,9	1,9

Ancestros NAm	PI548362	18,8	4,9	6,5	7,4	31,6	13,4	13,3	4,8	1,7
	PI548456	15,6	5,1	4,1	6,5	38,6	19,4	12,9	6,4	2,6
	PI548485	14,9	5,2	3,0	6,7	26,3	9,5	11,7	5,1	1,8
	PI548603	19,7	6,0	6,8	6,9	33,0	11,6	15,8	5,7	1,7
	PI548657	20,6	7,6	4,3	8,8	31,2	13,1	13,5	4,7	1,5
Elite	A5009	21,0	6,4	5,5	9,1	35,8	16,3	14,3	5,3	1,7
	DM3810	18,4	3,6	4,2	7,8	30,4	11,6	13,0	5,7	1,7
	DM4612	20,7	6,0	5,6	9,2	28,7	11,5	12,6	4,7	1,4
	NS4619	17,3	4,4	3,3	9,7	33,4	14,6	13,8	5,0	1,9
	SPS4x4	14,8	4,7	3,8	6,3	29,1	13,3	11,6	4,1	2,0

---

Ambiente (A)	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	*
Tipo (T)	ns	ns	ns	** (0,9)	ns	ns	*	**	*
Genotipo[Tipo] (G[T])	***	*** (1,8)a	*** (1,8)	***	***	***	***	***	***
A x T	ns	** (1,1)	ns	ns	*** (2,5)	*** (1,8)	** (1,2)	*** (0,5)	*** (0,2)
A x G[T]	*** (3,9)	ns	ns	** (3,0)	*** (5,7)	*** (4,1)	** (2,8)	*** (1,1)	*** (0,4)

---

Variación %									
A	1	1	0	5	0	0	1	1	1
T	3	3	2	8	0	2	4	6	3
G[T]	52	44	54	43	63	47	63	38	47
A x T	2	10	3	3	8	7	4	8	5
A x G[T]	26	14	17	23	16	32	13	30	33
Residual	16	28	24	19	13	13	14	17	11

---

**Tabla 4.4.** Efectos de la interacción ambiente x tipo y ambiente x genotipo dentro de tipo sobre la Bc, la Gli, sus componentes y la relación Gli / Bc.

Ambiente	Tipo	Genotipo (Tipo)	% del total de proteína							Relación Gli /Bc	
			Bc (%)				Gli (%)				
			Total	$\beta$	$\alpha$	$\alpha'$	Total	Básica	Acida		A3
Temprano	Ancestros silvestres		20,1	5,7	4,4	10,0	32,4	12,4	15,3	4,6	1,6
	Variedades locales asiáticas		17,6	4,3	5,5	7,8	30,6	12,8	13,0	4,8	1,8
	Ancestros NAm		18,2	5,6	5,1	7,5	30,0	11,6	13,5	4,9	1,7
	Elite		19,0	5,6	4,3	9,2	33,3	14,6	13,4	5,3	1,8
Tardío	Ancestros silvestres		18,6	5,8	4,7	8,1	30,0	12,0	13,4	4,7	1,7
	Variedades locales asiáticas		18,8	6,2	4,6	8,0	32,5	13,2	14,1	5,2	1,7
	Ancestros NAm		17,6	5,9	4,7	7,0	34,2	15,2	13,3	5,8	2,1
	Elite		17,9	4,4	4,7	7,6	29,6	12,3	12,7	4,6	1,7
Temprano	Ancestros silvestres	PI339871A	17,5	5,7	2,6	9,2	34,1	12,2	16,6	5,4	2,0
		PI407027	22,9	5,2	4,5	13,3	30,9	10,8	15,5	4,6	1,4
		PI468400A	20,6	5,0	5,2	10,4	33,7	14,0	15,6	4,1	1,6
		PI483464A	24,4	9,0	3,1	12,4	26,9	9,8	11,9	5,3	1,1
		PI549046	16,4	5,5	2,8	8,2	23,9	8,6	11,0	4,3	1,5
		PI597459D	20,6	5,7	8,6	6,3	37,1	14,7	17,5	4,9	1,8
		PI597461A	18,4	4,1	4,0	10,3	40,4	17,0	19,4	3,9	2,2
	Variedades locales asiáticas	FC33243	17,8	3,6	6,6	7,7	27,4	11,0	11,9	4,4	1,5
		PI567298	11,8	3,0	4,7	4,2	22,1	8,0	10,0	4,3	1,9
		PI567368	17,5	6,1	4,5	6,9	33,9	15,9	12,7	5,4	2,0
		PI594615	21,4	4,9	6,9	9,7	29,4	12,4	11,2	5,8	1,4

		PI594777	19,4	4,1	4,8	10,6	40,1	17,0	19,2	3,9	2,1
	Ancestros NAm	PI548362	18,7	5,1	7,4	6,3	27,4	9,2	13,3	4,9	1,5
		PI548456	17,5	5,7	4,7	7,2	30,5	10,8	14,2	5,6	1,8
		PI548485	16,0	4,7	2,9	8,4	25,3	10,1	11,1	4,1	1,6
		PI548603	18,5	5,4	6,1	7,1	33,6	13,2	14,8	5,6	1,8
		PI548657	20,7	7,3	4,8	8,7	33,4	14,8	14,2	4,4	1,6
	Elite	A5009	20,8	7,0	5,7	8,1	36,3	16,4	13,3	6,7	1,8
		DM3810	17,8	4,6	4,6	8,6	31,7	11,8	13,6	6,2	1,8
		DM4612	21,2	6,4	4,4	10,4	29,5	11,2	13,3	5	1,4
		NS4619	18,9	5,2	2,9	10,9	36,0	16,3	14,7	5,1	1,9
		SPS4x4	16,5	4,8	3,8	7,9	33,1	17,6	12,1	3,4	2,0
Tardío	Ancestros silvestres	PI339871A	19,0	5,3	3,7	10,1	32,4	12,7	14,6	5,2	1,7
		PI407027	11,1	4,1	2,6	4,5	26,2	13,7	9,2	3,4	2,4
		PI483464A	25,2	8,3	5,0	12,0	29,7	12,2	12,5	5	1,2
		PI549046	15,0	4,6	5,1	5,4	25,8	7,7	13,3	4,8	1,7
		PI597459D	21,5	6,7	6,9	7,6	33,0	11,7	15,6	5,7	1,5
		PI597461A	20,1	6,0	5,2	8,9	32,9	13,8	15,1	4,2	1,7
	Variedades locales asiáticas	FC33243	19,2	4,1	7,2	7,9	28,5	11,1	13,9	3,4	1,5
		PI567298	16,9	8,0	4,4	4,6	26,5	9,5	11,5	5,7	1,6
		PI567368	19,5	6,7	3,9	8,9	39,2	18,3	14,5	6,5	2,0
		PI594615	14,8	5,1	3,1	6,6	25,8	10,5	10,7	4,5	1,7
		PI594777	23,5	7,3	4,4	11,9	42,5	17,0	19,8	5,8	1,8
	Ancestros NAm	PI548362	18,9	4,8	5,6	8,6	35,7	17,7	13,3	4,7	1,9
		PI548456	13,8	4,5	3,6	5,8	46,7	28,1	11,6	7,1	3,4
		PI548485	13,8	5,7	3,1	4,9	27,3	8,9	12,3	6,2	2,0
		PI548603	20,8	6,6	7,6	6,7	32,5	10,0	16,8	5,8	1,6

	PI548657	20,6	7,9	3,8	9,0	29,1	11,3	12,8	5,1	1,4
Elite	A5009	21,3	5,8	5,4	10,1	35,4	16,3	15,3	3,9	1,7
	DM3810	19,1	2,6	3,7	6,9	29,1	11,5	12,4	5,3	1,6
	DM4612	20,3	5,5	6,9	7,9	28,0	11,7	11,9	4,4	1,4
	NS4619	15,8	3,7	3,7	8,5	30,8	13,0	12,9	4,9	2,0
	SPS4x4	13,1	4,7	3,8	4,8	25,0	9,1	11,2	4,7	1,9

---

\* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; ns: no significativo.<sup>a</sup> Números entre paréntesis representan LSD de las medias a P<0.05.

Al considerar la subunidad básica de la Gli, las proporciones oscilaron entre el 7,7% (PI549046, ancestro silvestre (*G. soja*)) y 28,1% (PI548456, ancestro NAm), ambos en el ambiente tardío. Para las subunidades ácida y A3, además del genotipo dentro de tipo y ambas interacciones, el efecto tipo también fue significativo ( $P < 0.05$ ). En el primer caso, las concentraciones mínima y máxima fueron 9.2% (PI407027, ancestro silvestre; *G. soja*) y 19.8% (PI594777, variedad local asiática), ambas en el ambiente tardío (Tabla 4.4), respectivamente. La fracción A3 varió entre 3.4% (FC33243, variedad local asiática, en el ambiente tardío) y 7.1% (PI548456, ancestro NAm, en el ambiente tardío, Tabla 4.4).

La relación Gli / Bc mostró diferencias significativas entre los ambientes evaluados ( $P < 0,05$ ), los tipos ( $P < 0,05$ ) y los genotipos dentro de tipo ( $P < 0,001$ ), así como también entre sus interacciones ( $P < 0,001$ , Tabla 4.3). Nuevamente, el genotipo dentro de tipo representó la mayor parte de la variación del modelo (47%SC), pero las interacciones significativas sugieren que el ambiente también juega un papel relevante en la determinación de esta proporción (Tabla 4.3). En general, los valores extremos para todas las fracciones proteicas se observaron dentro de los tipos más antiguos (ancestros silvestres, razas locales asiáticas y Ancestros NAm).

#### 4.3.5. Solubilidad proteica

La solubilidad de las proteínas es una propiedad de gran importancia en las harinas de soja debido a que está directamente relacionada con su funcionalidad como ingrediente, así como también con el rendimiento de los procesos de transformación para la obtención de otros productos como los aislados proteicos. Los resultados de la solubilidad de las proteínas se presentan en la Tabla 4.5. Para los valores de pH evaluados, el efecto tipo fue significativo ( $P < 0.01$ ), la excepción fue el pH 6. Dentro del rango de pH más cercano al punto isoeléctrico (pH 4-5), las variedades locales asiáticas tuvieron la mayor solubilidad. Esta tendencia continuó aumentando hasta el valor de pH 8, cuando el tipo Elite alcanzó valores similares a las variedades locales asiáticas. Esta tendencia continuó hasta pH 10.

Además, a pH 2, 4, 7, 8 y 10, el genotipo dentro de tipo también fue significativo ( $P < 0.05$ ). Solo a pH 2, la interacción ambiente x genotipo fue significativa ( $P < 0.05$ ). Dentro de los genotipos Elite, el A5009 tuvo la menor solubilidad de proteínas en toda la escala de pH. La

relación entre la solubilidad promedio de la proteína de los genotipos (%) y el pH se representa en la Figura 4.2.A.

Con el fin de comprender el impacto de la utilización de genotipos de diferentes etapas evolutivas sobre posibles rendimientos en procesos de conversión de la harina en aislados proteicos, se calculó la cantidad de proteína soluble que podría extraerse de las diferentes harinas desgrasadas resultantes (g de proteína solubilizada g de harina<sup>-1</sup>) a diferentes valores de pH (Figura 4.2.B). En cada pH, el tipo Elite solubilizó menos proteína por gramo de harina en comparación con los tipos más antiguos (Tabla 4.6). Esto no se debe solamente a las diferencias en la solubilidad de las proteínas, sino también a las diferencias en la concentración de proteína de las harinas. El tipo Elite tiene menor concentración de proteína en grano y, por lo tanto, también en las harinas resultantes respecto a los tipos ancestrales (Tabla 4.2).

**Tabla 4.5.** Efecto del pH en la solubilidad de la proteína (% soluble del total de la proteína presente en la harina) para los cuatro tipos evaluados. Se describen los efectos principales de tipo y genotipo dentro de tipo. Se muestran los componentes de la varianza (en porcentaje) asociados al ambiente (A), tipo (T), genotipo dentro del tipo (G [T]), residual y todas las interacciones posibles.

Solubilidad de la proteína (% soluble del total)		pH								
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ancestros silvestres ( <i>G. soja</i> )		19,9 b	11,1 b	9,6 b	11,1 b	27,3 a	57,1 b	58,7 b	60,8 b	67,7 b
Variedades locales asiáticas		27,1 a	15,3 a	12,4 a	16,5 a	31,0 a	65,6 a	68,1 a	73,6 a	74,1 a
Ancestros NAm		28,4 a	16,1 a	9,4 cb	12,0 b	23,8 a	55,5 b	59,0 b	60,6 b	64,5 b
Elite		26,4 a	11,5 b	7,6 c	11,1 b	22,7 a	59,8 b	66,7 a	69,2 a	75,1 a
Ancestros silvestres ( <i>G. soja</i> ) PI339871A		16,1	13,7	9,0	9,7	26,4	47,1	51,8	53,5	69,5
PI407027		24,3	13,0	10,3	14,4	20,0	67,1	60,0	63,1	69,2
PI483464A		23,3	11,1	7,5	9,5	17,3	60,1	57,5	64,1	63,9
PI549046		18,9	8,1	10,0	11,0	26,6	54,1	59,6	57,7	65,5
PI597461A		17,1	10,8	11,1	11,1	38,9	55,7	65,2	66,3	70,2
Variedades locales asiáticas FC33243		26,8	21,6	10,7	15,9	22,5	69,3	72,7	78,4	88,6
PI567298		24,5	13,6	10,5	16,5	34,6	61,8	64,7	73,0	75,7
PI567368		22,6	10,5	9,6	12,5	27,2	66,3	70,5	73,8	73,8
PI594615		31,5	18,5	12,1	19,5	59,1	64,4	65,5	71,2	62,3
PI594777		30,2	14,0	18,8	18,4	25,5	65,5	66,0	70,7	70,1
Ancestros NAm PI548362		27,9	15,1	8,3	11,0	20,2	61,7	66,2	70,6	75,1
PI548456		31,2	16,0	13,1	14,2	28,6	62,2	58,4	63,2	64,8

	PI548485	25,4	12,3	9,7	11,5	26,7	49,9	53,8	54,2	57,0
	PI548603	22,2	19,8	6,8	11,5	21,2	55,0	61,7	61,5	68,7
	PI548657	35,3	17,4	9,3	11,6	22,6	48,9	55,0	53,6	56,7
Elite	A5009	23,9	10,0	6,3	8,2	17,6	46,3	53,0	59,4	60,8
	DM3810	26,6	9,4	7,6	8,7	22,4	61,9	64,3	66,8	77,8
	DM4612	28,8	10,0	7,7	12,0	23,9	65,6	70,0	73,5	79,3
	NS4619	26,8	14,9	8,2	12,1	26,7	64,3	78,1	74,3	79,8
	SPS4X4	26,1	13,2	8,1	14,7	23,1	61,1	68,3	72,2	77,6

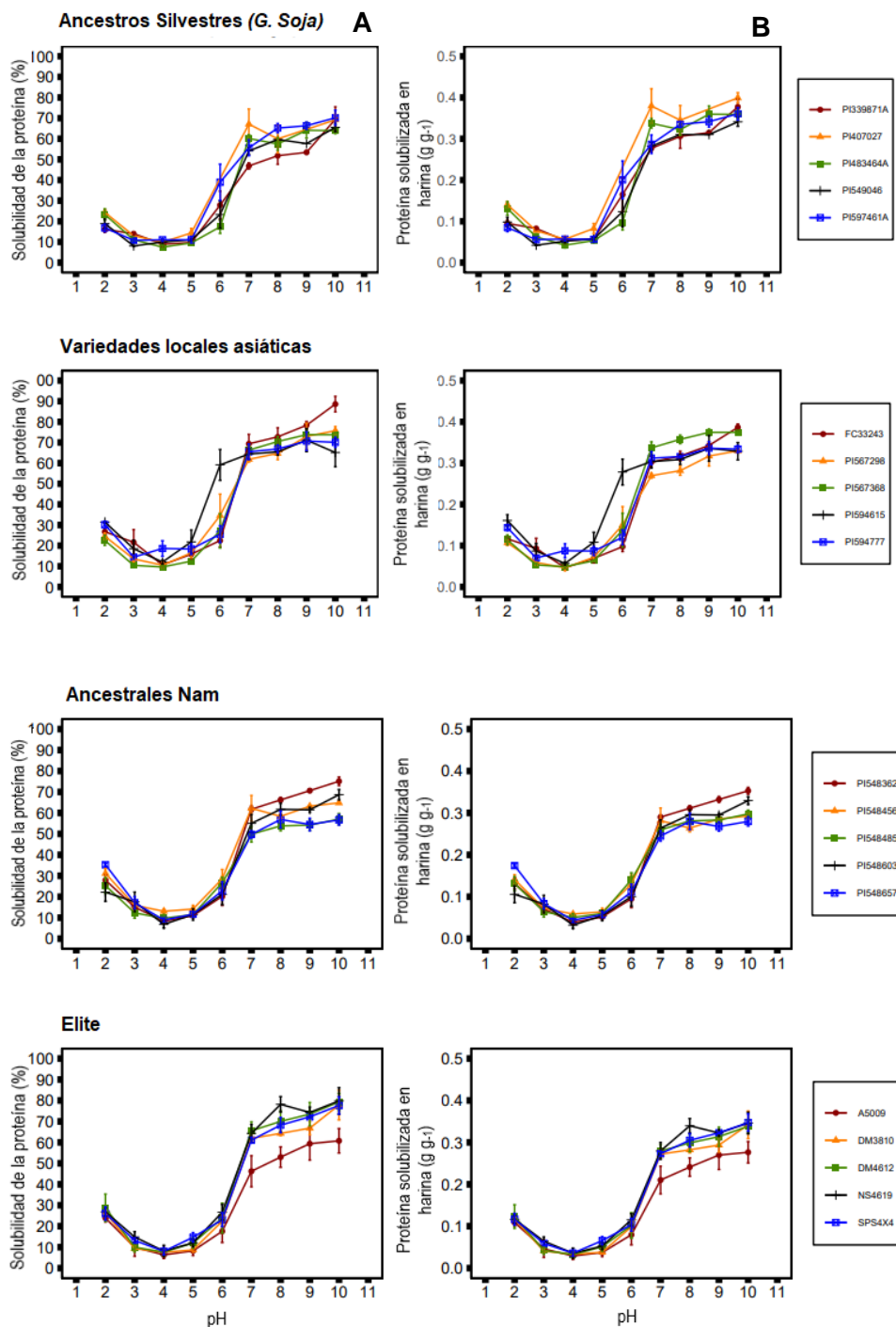
---

Ambiente (A)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Tipo (T)	*** (3,1) <sup>a</sup>	** (3,2)	** (2,0)	*** (2,5)	ns	** (5,0)	*** (4,8)	*** (5,6)	*** (4,8)	
(G[T])	*	ns	* (4,5)	ns	ns	** (11,1)	** (11,3)	ns	*** (10,7)	
A x T	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
A x G[T]	* (9,9)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

---

Variación %										
A	0	0	0	0	1	0	1	0	1	
T	24	15	18	24	8	17	20	29	20	
(G[T])	26	25	29	21	34	36	38	28	39	
A x T	3	4	1	7	1	1	4	3	5	
A x G[T]	21	22	20	15	15	17	9	7	11	
Residual	26	34	32	33	41	30	28	32	25	

\* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; ns: no significativo.<sup>a</sup> Números entre paréntesis representan LSD de las medias a P<0.05.



**Figura 4.2.** Solubilidad de la proteína de la harina de soja (% 4.2.A) y g de proteína solubilizada por g de harina (g g<sup>-1</sup>, 4.2.B) en el rango de pH 2-10 para los genotipos evaluados. Valores medios de dos ambientes y dos repeticiones. Las barras muestran el EE.

**Tabla 4.6.** Efecto del pH sobre la proteína de la harina de soja solubilizada ( $\text{g g}^{-1}$  b.s.) para los cuatro tipos evaluados. Se describen los efectos principales sobre cada tipo y genotipo dentro del tipo. Se muestran los componentes de la varianza (en porcentaje) asociados al ambiente (A), tipo (T), genotipo dentro del tipo (G [T]), residual y todas las interacciones posibles.

Proteína solubilizada/ Harina ( $\text{g g}^{-1}$ b.s.)		pH									
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Ancestros silvestres ( <i>G. soja</i> )		0,11 c	0,06 ab	0,05 ab	0,06 b	0,15 a	0,32 a	0,32 a	0,33 a	0,38 a	
Variedades locales asiáticas		0,13 ab	0,07 a	0,06 a	0,08 a	0,14 a	0,31 a	0,32 a	0,34 a	0,35 b	
Ancestros NAm		0,14 a	0,08 a	0,05 ab	0,06 b	0,12 ab	0,27 b	0,29 b	0,29 b	0,31 b	
Elite		0,12 cb	0,05 b	0,03 c	0,05 b	0,10 b	0,26 b	0,29 b	0,30 b	0,31 b	
Ancestros silvestres ( <i>G. soja</i> )		PI339871A	0,10	0,09	0,05	0,06	0,16	0,28	0,31	0,32	0,41
		PI407027	0,14	0,08	0,06	0,08	0,18	0,38	0,34	0,38	0,40
		PI483464A	0,13	0,06	0,04	0,06	0,10	0,34	0,32	0,36	0,36
		PI549046	0,10	0,04	0,05	0,05	0,14	0,28	0,31	0,31	0,34
		PI597461A	0,09	0,06	0,06	0,06	0,20	0,29	0,34	0,34	0,36
Variedades locales asiáticas		FC33243	0,12	0,10	0,05	0,07	0,10	0,30	0,32	0,34	0,39
		PI567298	0,11	0,06	0,05	0,07	0,15	0,27	0,28	0,32	0,33
		PI567368	0,12	0,05	0,05	0,06	0,14	0,34	0,36	0,38	0,38
		PI594615	0,17	0,09	0,06	0,10	0,28	0,31	0,31	0,34	0,33
		PI594777	0,14	0,07	0,09	0,09	0,12	0,31	0,32	0,34	0,34
Ancestros NAm		PI548362	0,13	0,07	0,04	0,05	0,10	0,29	0,31	0,33	0,35
		PI548456	0,14	0,07	0,06	0,06	0,13	0,28	0,27	0,29	0,30
		PI548485	0,13	0,07	0,05	0,06	0,14	0,26	0,28	0,28	0,30

	PI548603	0,11	0,09	0,04	0,06	0,10	0,27	0,30	0,30	0,33
	PI548657	0,18	0,09	0,05	0,06	0,11	0,24	0,27	0,27	0,28
Elite	A5009	0,11	0,05	0,03	0,04	0,08	0,21	0,24	0,27	0,28
	DM3810	0,12	0,04	0,04	0,04	0,10	0,27	0,28	0,29	0,34
	DM4612	0,12	0,04	0,03	0,05	0,10	0,28	0,30	0,31	0,34
	NS4619	0,12	0,06	0,04	0,06	0,12	0,28	0,34	0,32	0,35
	SPS4X4	0,12	0,06	0,04	0,07	0,10	0,27	0,31	0,32	0,35

---

Ambiente(A)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Tipo (T)	*** (0,01) <sup>a</sup>	** (0,01)	*** (0,01)	*** (0,01)	* (0,04)	*** (0,02)	** (0,02)	*** (0,03)	*** (0,02)	*** (0,02)
G[T]	*** (0,03)	ns	* (0,02)	ns	ns	** (0,05)	* (0,05)	ns	*** (0,05)	*** (0,05)
A x T	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A x G[T]	* (0,05)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	na	ns	ns

---

#### Variancia %

A	0	1	0	0	2	0	0	1	0
T	11	16	24	24	11	22	18	29	27
(G[T])	36	25	27	24	33	34	38	26	32
A x T	3	5	2	7	2	0	3	2	3
A x G[T]	25	21	17	12	14	18	10	9	15
Residual	26	32	31	33	38	25	32	34	23

\* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; ns: no significativo.<sup>a</sup> Números entre paréntesis representan LSD de las medias a P<0.05.

#### 4.4. DISCUSIÓN

Durante las últimas décadas, el enfoque del mejoramiento de soja ha sido la mejora del rendimiento utilizando genotipos élite como progenitores. Este proceso ha dado como resultado una base genética cada vez más estrecha en los programas de mejoramiento actuales. Una consecuencia de tal enfoque es la limitación en el progreso de la calidad industrial de los granos, específicamente respecto a concentración y composición de proteína (Specht et al., 1999; Brown-Guedira et al., 2001; Rowntree et al., 2013; de Felipe et al., 2016). Un objetivo importante relacionado con las variables mencionadas es comprender los factores que impactan sobre su variación. Los resultados del presente capítulo proporcionan un mayor conocimiento sobre la variación de la concentración de proteína en grano, la composición de las subunidades proteicas y la solubilidad de las proteínas de genotipos representativos de diferentes etapas evolutivas del cultivo. Esta información facilitará los esfuerzos en curso para mejorar tanto la concentración como la calidad proteica de la soja. Además, los resultados presentados serán valiosos para comprender cómo la selección del genotipo puede afectar una de las propiedades fundamentales de la harina de soja, la solubilidad de las proteínas. Esta propiedad tiene un impacto directo en la funcionalidad de la harina como ingrediente y como materia prima de diversos procesos industriales (Kinsella et al., 1979; Lee et al., 2003).

Los resultados obtenidos en el presente capítulo evidenciaron que la concentración de proteína en grano (%) varía entre ambientes, tipos y genotipos, de acuerdo con estudios previos (Žilić et al., 2011; Zhang et al., 2018; Bosaz et al., 2019). El efecto tipo representó la mayor parte de la variación del modelo. El rango de concentración de proteína en grano observado fue 36,3 - 42,9%, que se encuentra dentro del intervalo (36,3 - 46,3%) informado por Zhang et al. (2018) al evaluar la diversidad genética de genotipos ancestrales, variedades locales y genotipos modernos.

En cuanto al aceite, se encontraron diferencias significativas entre tipos, y este factor representó la mayor parte de la variación del modelo. En concordancia con Chen y Nelson (2004), quienes evaluaron los tipos *G.soja*, semi-silvestres y *G. max*, los resultados de este capítulo mostraron los valores más altos de concentración de aceite en los genotipos Elite en comparación con los ancestros silvestres (*G.soja*), las variedades locales asiáticas y los ancestros de Nam.

El genotipo, el ambiente y las condiciones de procesamiento pueden influir en la composición de la harina de soja resultante. Grieshop et al. (2003) estudiaron la calidad de las harinas de soja producidas en las plantas procesadoras de EE.UU. y encontraron una amplia variación para la concentración de proteína cruda. Karr-Lilienthal et al. (2004) evaluaron harinas de cinco países productores líderes (Argentina, Brasil, China, India y Estados Unidos). Informaron que la harina de soja de China presentó la concentración de proteína cruda más alta, mientras que la harina de soja de Argentina la más baja. Además, Thakur y Hurburgh (2007) estudiaron la calidad de la harina de origen estadounidense y de otros países. Encontraron que la concentración de proteínas difería significativamente entre los ocho países evaluados, Argentina mostró el valor más bajo (46%). Las diferencias en composición de los granos, determinadas por factores ambientales y de manejo del cultivo, afectan en última instancia a la composición de la harina. En el presente estudio, se encontraron diferencias significativas entre los tipos evaluados. Los ancestros silvestres (*G. soja*) y el tipo Elite mostraron la máxima y la mínima concentración de proteína en harina, con 55,1 y 44,1%, respectivamente.

Además de evaluar la concentración de proteínas como componente principal de los granos, fue interesante caracterizar la composición de las proteínas. Las diferencias en las proporciones de Bc y Gli en las harinas proteicas generalmente se consideran responsables de los cambios en las propiedades funcionales. Una mayor proporción de Gli respecto a Bc tiene un efecto positivo general sobre la calidad nutricional de las proteínas debido a que la Gli contiene más metionina y cisteína por unidad que la Bc (Kitamura et al., 1995). El índice de actividad emulsionante (Pesic et al., 2005), la proteína de la leche de soja y los productos a base de proteína de soja (Tezuka et al., 2000) se correlacionaron con la relación Gli / Bc. La manipulación de la relación Gli / Bc puede mejorar la funcionalidad y el valor nutricional de las proteínas de la soja en numerosos productos alimentarios.

Los resultados mostraron diferencias significativas entre los genotipos evaluados con respecto a las concentraciones de estas proteínas de almacenamiento y sus subunidades, de acuerdo con trabajos previos (Riblett et al., 2001; Khatib et al., 2002; Žilić et al., 2011). Se demostró que los efectos asociados al genotipo dentro de cada tipo representaron el ~50% de la variación hallada en la relación Gli / Bc. Sin embargo, más del 30% de la variación se relacionó con la interacción genotipo x ambiente. Por lo tanto, el uso de genotipos de soja con proporciones contrastantes de Gli y Bc podría ser una estrategia eficaz para el desarrollo de

componentes proteicos con una funcionalidad específica. Se identificaron combinaciones de genotipo x ambiente con proporciones de Gli / Bc entre 1,1 y 3,4. Los valores más extremos correspondieron a genotipos ancestrales, mientras que los genotipos Elite modernos variaron entre 1,4 y 2,0. Por lo tanto, la introducción de germoplasma ancestral en los programas de mejoramiento podría ser una herramienta válida para modificar esta proporción. Estudios previos mostraron resultados variables sobre este rasgo, variando de 1,64 a 2,51 (Cai et al., 1999), Pesic et al., (2005) reportaron valores de 1,54 a 2,08 y Murphy y Resurreccion (1984) mostraron valores de 2,1 a 3,4 para 12 genotipos de soja.

La solubilidad de las proteínas es una propiedad funcional crítica de la harina de soja como componente y como materia prima para la producción de alimentos o productos industriales. Si bien está fuertemente asociada a condiciones de procesamiento, factores intrínsecos (composición y características de las proteínas) también tienen impacto (Kinsella et al., 1979). De acuerdo con otros autores, se encontró que la solubilidad proteica mínima se da a pH 4, la región isoeléctrica. A valores de pH superiores e inferiores del punto isoeléctrico la solubilidad aumentó, con valores máximos a pH 10 (Wolf, 1970; Fernández - Quintela et al., 1997). Los efectos tipo y genotipo dentro de tipo surgieron como los factores significativos que impactan en el perfil de solubilidad, y juntos, representan la mayor parte de la variación observada. El tipo Elite tuvo los valores de solubilidad más bajos alrededor de la región isoeléctrica y, junto con las variedades locales asiáticas, tuvo los valores más altos en condiciones alcalinas. Heywood et al. (2002) evaluaron seis variedades de soja con atributos mejorados (alto contenido de sacarosa, alto contenido de cisteína, bajo contenido de ácido linolénico, bajo contenido de ácidos grasos saturados, alto contenido de ácido oleico y lipoxigenasa nula) y dos variedades comerciales en un rango de pH de 2 a 8. Encontraron diferencias de solubilidad entre las variedades evaluadas, y una relación entre solubilidad e índice de dispersión de proteínas. Mc Watters y Holmes (1979) estudiaron los perfiles de solubilidad de nitrógeno de la harina dispersa en agua, soluciones de NaCl 0,1 M y 1,0 M. El rango de pH evaluado fue de 2 a 10. La solubilidad del nitrógeno respondió a los niveles cambiantes de pH en el agua. Entre pH 4 y 5, los niveles de pH que comprenden la región isoeléctrica, la solubilidad del nitrógeno fue significativamente baja (11,4%). A medida que el pH fue mayor o menor a 4,0, la solubilidad del nitrógeno aumentó significativamente. A pH 10, mostraron 99,9% de nitrógeno soluble en suspensiones preparadas con agua. En el presente estudio, los mayores valores de solubilidad se observaron en las variedades locales asiáticas y

en los genotipos Elite actuales, especialmente en el rango de pH neutro-alcalino (7-10), típico de las condiciones de extracción durante el procesamiento de aislados proteicos (Deak et al., 2008). Esta información sería de importancia a los mejoradores de variedades orientadas a la producción de este ingrediente.

El mejoramiento y la ingeniería genética tradicional prometen mejorar la calidad de las proteínas de los granos de soja. Sin embargo, los programas de mejoramiento comerciales carecen de la diversidad genética necesaria para influir en la composición de las proteínas como factor de calidad (Tanksley and McCouch et al., 1997; de Felipe et al., 2016). Bucear en germoplasma silvestre y ancestral ofrece un vasto recurso que puede ampliar la base genética de la soja. Este estudio ha demostrado una importante diversidad genética en la concentración y composición de proteínas entre los genotipos de soja. Estas diferencias y tendencias relacionadas podrían estar determinadas por genes que se han perdido durante la domesticación de *G. max* (Tanksley and McCouch et al., 1997; Hyten et al., 2006). El complemento genético de *G. max* para desarrollar variedades ricas en proteínas y de alta calidad para la producción comercial puede ser una opción relevante para aumentar la eficiencia de los procesos industriales (Kwanyuen et al., 1997). La explotación de esta diversidad ayudaría a retrasar la erosión de la base genética y facilitaría la obtención de genotipos agronómicamente viables de acuerdo con la demanda de la industria.

## 4.5. CONCLUSIONES

Se demostró que el germoplasma ancestral es un reservorio de rasgos útiles para mejorar la calidad de la soja. Los ancestros silvestres (*G. soja*) y Elite presentaron las concentraciones máximas y mínimas de proteína de grano, respectivamente. Los valores medios de proteína en harina para los tipos, fueron 55,1, 47,7, 48,4 y 44,1% para los ancestros silvestres (*G.soja*), las variedades locales asiáticas, los Ancestros NAm y Elite, respectivamente.

La Bc total mostró un efecto significativo del genotipo dentro del tipo. Éste factor también explicó la mayor parte de la variación total encontrada para Bc, y sus subunidades  $\beta$ ,  $\alpha$  y  $\alpha'$ . Las diferencias en las proporciones de Gli total y todos sus componentes fueron evidentes para el efecto genotipo dentro del tipo y ambas interacciones, el genotipo dentro del tipo representó la mayor parte de la variación del modelo (>35%SC). Para la relación Gli / Bc, el genotipo dentro del tipo representó la mayor parte de la variación del modelo (47%SC), pero las interacciones significativas sugieren que el ambiente también juega un papel importante en la determinación de esta relación. En general, los valores extremos para todos los componentes de las fracciones de proteínas se observaron dentro de los tipos más antiguos (ancestros silvestres, variedades locales asiáticas y Ancestros NAm).

Respecto a la solubilidad, las variedades locales asiáticas tuvieron una mayor solubilidad en comparación con los demás tipos evaluados. Esta tendencia continuó aumentando los valores de pH hasta 8, cuando el tipo Elite alcanzó valores similares a las variedades autóctonas asiáticas. En cada pH, el tipo Elite solubilizó menos proteína por gramo de harina que uno o más de los tipos más antiguos como resultado de una concentración de proteína en grano más baja que los tipos antiguos y, por lo tanto, también en la harina derivada.

## **CAPÍTULO V**

# **DISCUSIÓN GENERAL Y CONSIDERACIONES FINALES**

## **5. DISCUSION GENERAL Y CONSIDERACIONES FINALES**

### **5.1. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS**

El objetivo principal de la presente tesis fue describir la variabilidad y calidad de la proteína en soja. Así como también identificar variables ambientales y de manejo agronómico que permitan maximizar la concentración de proteína en grano, con la consecuente mejora de la calidad de las harinas proteicas resultantes. La problemática mundial asociada a la calidad de los granos de soja demanda una solución a largo plazo que pueda detener o al menos desacelerar la continua disminución del tenor proteico del producto cosechado y, por ende, de sus subproductos derivados. En el marco de un modelo productivo que campaña tras campaña tiene como objetivo maximizar los rendimientos, las decisiones de manejo a escala de productor, así como el mejoramiento de variedades comerciales, no se han focalizado en la concentración proteica de los granos, llevando a nuestros sistemas sojeros a valores críticos en lo que respecta a este componente.

Este contexto impacta directamente a escala industrial, situación que se torna aún más drástica dado el liderazgo mundial de Argentina como exportador de harina de soja, principal subproducto del complejo sojero. Para alcanzar los estándares mundiales de comercialización, la industria argentina debe incurrir en costos adicionales dado el bajo tenor proteico de los granos de soja para procesamiento. Este hecho repercute negativamente sobre la competitividad del complejo agroindustrial nacional, poniendo en riesgo la participación y penetración de la harina de soja argentina en los mercados mundiales en un futuro inmediato. Consecuentemente, para mantener los niveles de exportación de las harinas de soja, generar información referida a los factores ambientales y de manejo que maximicen el tenor proteico de los granos se vuelve crítico, dado que los mercados cada vez demandan más y mejores productos industriales.

La información generada a partir de la tesis se dividió en tres capítulos de resultados. El capítulo II tuvo como objetivo caracterizar espacialmente las principales zonas productoras mediante la construcción de un mapa de concentración de proteína a escala regional, identificando áreas que expresen consistentemente alta concentración de proteína. La variación espacial en la concentración de proteína en grano ha sido documentada a escala de lote de producción (Kravchenko y Bullock, 2002) y a escala regional (Rotundo et al., 2016), sin embargo, la región central de Argentina no contaba con una caracterización específica para sus

condiciones agroecológicas de producción de soja. En base a esto, cabe preguntarse *¿existe una asociación espacial para la concentración de proteína en soja, que permita identificar regiones con concentraciones diferenciales para dichas condiciones?* Los resultados presentados en el capítulo II permitieron caracterizar los sistemas de producción de soja de la región central Argentina de acuerdo con la concentración de proteína en grano, permitiendo a su vez, explorar su distribución geográfica. Se mostró que la concentración de proteína está correlacionada espacialmente para soja de primera, no así para soja de segunda. Por lo tanto, se identificaron áreas consistentes en el tiempo que producen granos con concentración de proteína diferencial. Esta zonificación de la concentración de proteína sirve como una herramienta de producción y de logística para la cadena de la soja. Para los productores esta información es de utilidad ya que brinda información sobre el rango de valores que podría obtener en cuanto a proteína en su zona de producción. Y para el sector industrial permite clasificar granos con calidad diferencial en función de su procedencia geográfica, permitiendo optimizar el proceso de molienda.

A su vez, el capítulo II permitió explorar cómo los factores de manejo y ambiente controlan la variación de la proteína regional. En este sentido, la selección de genotipos surgió como la opción de manejo más importante para alcanzar valores contrastantes de proteína. Se identificaron genotipos comerciales con una mayor concentración de proteína en grano, información sumamente relevante para los productores a la hora de tomar decisiones en cada uno de sus lotes en producción. Por su parte, dentro de las variables ambientales, las precipitaciones y la temperatura fueron factores relevantes para discriminar lotes con alta y baja concentración de proteína. A su vez, se observaron correlaciones negativas consistentes entre el rendimiento y la proteína, pero no entre los sitios, indicando que se pueden explorar situaciones productivas sin una marcada correlación negativa entre ambos, es decir, con alto rendimiento y alta concentración de proteína. Otro hallazgo relevante en dicho capítulo fue que para aumentar simultáneamente la concentración de proteína en grano y el rendimiento, la captura total de N debe aumentar, por lo cual, explorar prácticas de manejo que lo permitan se vuelve relevante.

En este sentido, el aumento de la captura total de N puede obtenerse mediante prácticas agronómicas como la fertilización con N. Sin embargo, su efectividad puede ser variable dado su efecto sobre la FBN. *¿Aumentar la disponibilidad de N en estadios tardíos del cultivo afectará significativamente la concentración proteica de los granos?, ¿Contribuirá al aumento de*

*la captura de N?*, *¿Cómo impactará sobre la FBN?* fueron las tres preguntas directrices del capítulo III de la presente tesis. En el mismo, se evaluaron opciones de manejo de N en ensayos manipulativos en microparcelas, en dos genotipos de alto rendimiento, pero con tenores contrastantes de proteína. Se demostró que la respuesta de la concentración de proteína a la fertilización con N depende de otras prácticas agronómicas como la fecha de siembra, pero es independiente de la elección del genotipo, y la fuente/método de aplicación. La respuesta en proteína a la fertilización con N solamente fue detectable en siembras tardías para todas las fuentes y genotipos evaluados. A su vez, la fertilización tardía con N no tuvo impacto sobre la captura total de N, pero sí sobre FBN dado que fue menor en todos los tratamientos de fertilización con N en comparación con el control. Los resultados del capítulo III sugieren que una reducción en la FBN por grano durante el período de llenado de granos puede ser superada por aplicaciones de N en estadíos tardíos del cultivo.

Dada la factibilidad de control por parte de los productores agropecuarios, los objetivos dos, tres y cuatro se basaron en identificar tecnologías de manejo agronómico que permitan maximizar la concentración de la proteína de soja, los cuales estuvieron abordados parcialmente en los capítulos II y III, y su efecto sobre procesos fisiológicos vinculados, como la FBN y la captura total de N. Y para profundizar el análisis, el objetivo número cinco se basó en caracterizar e identificar cultivares comerciales y ancestrales con alta concentración de proteína en grano y calidad diferencial respecto a la composición de la fracción proteica. A través de esta caracterización, se evaluaron rasgos diferenciales respecto a las propiedades funcionales de las harinas proteicas. Comenzando desde un enfoque observacional, seguido de una evaluación experimental de prácticas de manejo y finalizando en una caracterización minuciosa de laboratorio, la presente tesis permitió obtener resultados que enriquecen la bibliografía existente para los distintos eslabones de la cadena de la soja.

Considerando los resultados de los capítulos II y III, y demostrada la importancia de la correcta elección del genotipo sobre la concentración de proteína en grano, surgieron nuevos cuestionamientos *¿Existe variación genotípica entre cultivares ancestrales y actuales respecto a concentración y composición de la proteína?* *¿Cómo influyen estas diferencias en las propiedades funcionales de las harinas?* Éstos interrogantes fueron respondidos en el capítulo IV donde se evaluaron genotipos de distintas etapas evolutivas del cultivo de soja. Se realizó una caracterización de la fracción proteica de los granos, como así también la evaluación de una de las propiedades funcionales más relevantes de las harinas de soja, la solubilidad de las

proteínas. Se encontraron diferencias entre los tipos evaluados encontrando una amplia variación genotípica respecto a los atributos de interés. Los ancestros silvestres (*G. soja*) y el tipo Elite tuvieron las concentraciones máximas y mínimas de proteína en grano, respectivamente. De acuerdo a estudio previos, donde se encontraron diferencias entre cultivares (Riblett et al., 2001; Khatib et al., 2002; Žilić et al., 2011), en el presente capítulo se demostró que el genotipo surge nuevamente como la variable de manejo que más influye sobre la concentración de proteína total, así como también sobre las concentraciones de las subunidades que la componen.

Además de su valor nutricional, la proteína de soja proporciona propiedades funcionales muy importantes para usos industriales. La solubilidad de las proteínas se considera un marcador de su funcionalidad (Kinsella et al., 1979). Las tecnologías de procesamiento de la harina de soja se han desarrollado ampliamente para producir subproductos proteicos altamente solubles como los aislados. La producción de aislados proteicos se basa en la solubilidad diferencial de las proteínas de soja en condiciones de pH contrastantes. La información generada sobre la calidad y la funcionalidad de las proteínas es relevante para aumentar la eficiencia de los procesos industriales en la cadena de valor de la soja. En el capítulo IV se evaluaron distintos genotipos y los resultados mostraron que las variedades locales asiáticas tuvieron una mayor solubilidad en comparación con el resto de tipos evaluados. En cada pH, el tipo Elite solubilizó menos proteína por gramo de harina que uno o más de los tipos más antiguos. Esto puede deberse a una concentración de proteína más baja en grano y, por lo tanto, también en la harina resultante. Es por esto y frente a una industria que valoriza cada vez más el componente proteico, que una pregunta relevante para la cadena de la soja es, *¿Existe la posibilidad de incorporar a los programas de mejoramiento genotipos ancestrales para ampliar la base genética utilizada?*

El presente proyecto de investigación condensado en esta tesis aporta nuevos conocimientos respecto a factores ambientales y de manejo que influyen en la concentración de proteína en grano. Es imprescindible, además, la evaluación continua de los materiales genéticos utilizados en el mejoramiento y los objetivos que persigue este proceso. Esta información resulta de gran valor identificando caracteres de interés potencialmente disponibles en programas de mejora y estrategias de manejo agronómico.



## 5.2. CONTRASTE DE HIPÓTESIS ASOCIADAS A LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Durante el desarrollo de esta tesis se han presentado y analizado evidencias según los objetivos planteados, permitiendo responder a las hipótesis originales. A continuación, se resaltan los resultados de la contrastación de cada hipótesis con su respectivo objetivo.

El objetivo específico 1 fue describir los niveles de proteína en grano en los sistemas de producción templados de la región central de Argentina y explorar patrones espaciales de variación de proteína en toda la región. La hipótesis 1, asociada a dicho objetivo fue que “la interacción clima, genotipo y manejo determina la existencia de regiones productivas que consistentemente expresan un mayor porcentaje de proteína comparada con otras regiones”.

Los resultados presentados en el capítulo II demostraron que es posible realizar una caracterización espacial de las principales regiones productivas mediante un mapa de concentración de proteína en granos. Se identificaron zonas con altos valores de proteína influenciadas por la interacción del ambiente y el manejo realizado. La caracterización regional solo pudo realizarse para soja de primera, no encontrando una asociación espacial para soja de segunda. *Los resultados del Capítulo II no aportaron evidencia para rechazar la Hipótesis 1 debido al cumplimiento de su predicción.*

El objetivo específico 2 fue identificar la importancia relativa del manejo y los efectos ambientales sobre la concentración de proteína en grano complementando un enfoque observacional y experimental. La hipótesis asociada a dicho objetivo fue que “a pesar de existir una determinante regional, existen opciones de manejo que posibilitan maximizar la concentración de proteína en grano”. *Los resultados del Capítulo II no aportaron evidencia para rechazar la Hipótesis 2 debido al cumplimiento de su predicción.*

Se demostró que a nivel de lote de producción existen opciones de manejo como la elección del genotipo que permite maximizar la concentración de proteína en grano a pesar de presentar una determinante regional. La correcta elección de genotipo ocupa el primer lugar en el ranking de las variables de manejo evaluadas, como, por ejemplo, fecha de siembra, grupo de madurez y fertilizaciones fosforadas.

El objetivo específico 3 fue explorar las correlaciones entre la concentración de proteína, el rendimiento y la captura total de N mediante el análisis de ensayos multiambientales en la

región bajo estudio. La hipótesis asociada a este objetivo fue que “existe una correlación negativa entre rendimiento y proteína. A mayor captura total de N mayor es la concentración de proteína en grano.” *Los resultados del Capítulo II no aportaron evidencia para rechazar la Hipótesis 3 debido al cumplimiento de su predicción.*

Se observó una correlación negativa entre rendimiento y proteína para los genotipos evaluados, pero no así para los sitios de producción, pudiendo concluir que es posible encontrar sitios con altos rendimientos y alta concentración de proteína en grano. Se identificó un valor máximo de captura de N que imposibilitaría la obtención de mayores rindes juntos a altos valores de proteína.

El objetivo 4 fue evaluar el efecto de tratamientos de fertilización nitrogenada en estadíos tardíos del cultivo sobre la concentración de proteína en grano, la FBN y la absorción de nitrógeno mineral, y si la cantidad de N proveniente de la absorción mineral o la FBN modula la respuesta de la proteína a la fertilización. La hipótesis asociada a dicho objetivo fue que “los genotipos de alta concentración de proteína y siembras tardías mostrarán menores aumentos de dicha concentración después de las fertilizaciones nitrogenadas porque comúnmente muestran una mayor disponibilidad de N por grano en crecimiento”. *Los resultados del capítulo III permitieron rechazar la presente hipótesis.*

Se demostró que la fertilización con N aumentó la concentración de proteína solo en la fecha de siembra tardía para los dos genotipos evaluados. Bajo estas condiciones, ambos tratamientos (foliar y del suelo) tuvieron ganancias similares. Además, se evidenció una disminución de la FBN cuando aumentó la disponibilidad de N en el suelo y en las aplicaciones foliares. Cuando el N se aplicó en el suelo, la FBN fue la más afectada, en todos los genotipos probados y las fechas de siembra.

El objetivo específico 5 fue identificar genotipos de diferentes etapas evolutivas del cultivo (cultivares ancestrales y comerciales actuales) con alta concentración de proteína en grano y calidad diferenciada en la composición de la fracción proteica y como esto influye en la solubilidad de las proteínas de las harinas de soja. La hipótesis asociada a este objetivo fue que en estadios evolutivos más tempranos se encontrará mayor concentración de proteína que en los actuales por no haber estado sujeto a selección por rinde. Esto además impactará sobre la composición y la solubilidad de las proteínas de las harinas derivadas”.

Se comprobó en el capítulo IV que existe una amplia variación genética entre genotipos de las distintas etapas evolutivas estudiadas y que los genotipos más antiguos presentan los valores máximos de concentración proteica. Se encontraron diferencias respecto a la concentración de proteína en grano, como así también en la composición de la misma. También se evaluó como estas diferencias afectan la solubilidad de la proteína de las harinas derivadas. *Los resultados del Capítulo IV no aportaron evidencia para rechazar la Hipótesis 5 debido al cumplimiento de su predicción.*

### 5.3. IMPLICANCIAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES

No obstante, los avances logrados en el entendimiento de la calidad del cultivo de soja, numerosos aspectos de interés no han sido totalmente dilucidados y/o al mismo tiempo surgen nuevos interrogantes, aproximaciones o temas a resolver en investigaciones futuras. Algunos de estos temas se plantean a continuación.

#### 5.3.1. Efectos de la mejora de los sitios de producción sobre la concentración de proteína en grano

Los resultados presentados en el Capítulo II no evidenciaron una correlación significativa entre la concentración de proteína en grano y rendimiento para los sitios de producción evaluados. Es decir que es posible obtener altos rendimientos acompañados de alta concentración de proteína en determinados ambientes productivos. De esta manera podría evaluarse el aporte que haría tanto al rendimiento como a la proteína un esquema de rotaciones a largo plazo para encontrar una asociación entre alto índice ambiental y alta proteína. Son escasos los estudios que han evaluado el efecto de las rotaciones sobre la calidad de grano. Abordar este tema podría ser complementario al enfoque observacional referido a lotes de producción presentados en la tesis. En la bibliografía existente, fundamentalmente se estudió el efecto de las rotaciones sobre el rendimiento (Andrade et al., 2016) y la biota del suelo (D'Acunto et al., 2018) por lo que es relevante ampliar la información disponible referida al efecto de dicha herramienta de manejo sobre la concentración proteica. Temperly y Borges (2006) evaluaron el efecto de las rotaciones maíz-soja sobre rendimiento y proteína en Wisconsin bajo dos sistemas de labranza (convencional y siembra directa), solo encontraron

resultados en los ambientes donde se realizó labranza convencional. Bellaloui et al. (2010) evaluaron efectos de un esquema de rotaciones de tres años con maíz y encontraron efectos significativos sobre la concentración de proteína en grano. Trabajos recientes evaluaron el contenido de proteína en respuesta a la interacción de hongos micorrízicos y poblaciones microbianas nativas de suelos con monocultivo y con rotaciones (Marro et al., 2020). Los autores encontraron diferencias significativas respecto proteína. Por estos motivos investigar sobre este tema sería de utilidad y serviría para ampliar y dilucidar efectos de la mejora del sitio de producción a través de rotaciones de largo plazo sobre la calidad de los granos en soja.

### 5.3.2. Efectos del mejoramiento genético sobre la fijación biológica de nitrógeno. Variación genética entre cultivares ancestrales y actuales

En el capítulo IV esta tesis se mostró que existe variación genética respecto a la concentración y composición proteica de genotipos de soja derivados de diferentes etapas evolutivas. No se conocen datos concretos acerca de si existe una variación en el porcentaje de FBN expresado por los cultivares comerciales actuales. Diversos estudios describen diferencias significativas en los atributos relacionados con rendimiento, eficiencia de uso del N y calidad industrial en genotipos actuales y ancestrales (Thompson y Nelson, 1998; Rotundo y Borrás, 2016, CAPITULO IV), sin embargo, poco se conoce respecto de la FBN. Conocer el porcentaje de N proveniente de la FBN y del suelo, y su relación con la concentración de proteína en grano sería útil para el mejoramiento y ampliaría la bibliografía disponible relacionada a la evolución de los cultivares de soja. Esta información permitiría seleccionar genotipos específicos para optimizar procesos fisiológicos relevantes para obtener altos rendimientos y alta concentración de proteína en grano como lo es la FBN.

### 5.3.3. Evaluación de genotipos no GMO de alta proteína

La proteína de soja es una fuente de proteína valiosa e importante en la dieta humana y animal. Más del 90% de los genotipos utilizados en Argentina actualmente son genéticamente modificados buscando la mejora de la calidad y la productividad del cultivo. Trabajos previos evaluaron y compararon la fracción proteica de cultivares transgénicos y no genéticamente modificados (Carrera et al., 2011, 2014; Natarajan et al., 2010 y 2014). Dado que los rasgos de valor agregado se están desarrollando continuamente mediante modificaciones genéticas, es importante realizar una caracterización de cultivares actuales no genéticamente modificados

para evaluarlos respecto a la concentración de proteína en grano y en harina y así poder ampliar la variación de usos y consumidores posibles. Para garantizar la seguridad del cultivo, es importante determinar la variación natural en los componentes de la proteína en grano, así como cualquier cambio no intencionado que pueda ocurrir en los organismos genéticamente modificados como resultado de la transgénesis. Identificar aquellos cultivares que puedan ser una fuente rica en proteína es clave para la sustentabilidad del cultivo de soja. Además, esta información podría ser de utilidad para abordar nuevos mercados y comercializar granos y /o harinas como una especialidad de alto valor. Esta información sería relevante para los procesadores y exportadores, que podrían utilizarlos directamente como materia prima para el procesamiento de harina de soja y sus derivados de alta concentración proteica.

## 6. REFERENCIAS

- Abdala, L.J., Gambin, B.L., Borrás, L., 2018. Sowing date and maize grain quality for dry milling. *Eur. J. Agron.* 92, 1–8.
- Afza, R., Hardarson, G., Zapata, F., Danso, S.K.A., 1987. Effects of delayed soil and foliar N fertilization on yield and N<sub>2</sub> fixation of soybean. *Plant Soil.* 97, 361–368.
- Andrade, J.F., Poggio, S.L., Ermácora, M., Satorre, E.H., 2015. Productivity and resource use in intensified cropping systems in the rolling pampa. Argentina *Eur. J. Agron.* 67, 37–51.
- Andrade, J.F., Satorre, E.H., 2015. Single and double crop systems in the Argentine Pampas: environmental determinants of annual grain yield. *F. Crop. Res.* 177, 137–147.
- Aramburu Merlos, F., Monzon, J.P., Mercau, J.L., Taboada, M., Andrade, F.H., Hall, A.J., Jobbagy, E., Cassman, K.G., Grassini, P., 2015. Potential for crop production increase in Argentina through closure of existing yield gaps. *F. Crop. Res.* 184, 145–154.
- Archontoulis, S. V., Miguez, F.E., 2015. Nonlinear regression models and applications in agricultural research. *Agron. J.* 107, 786–798.
- Assefa, Y., Purcell, L.C., Salmeron, M., Naeve, S., Casteel, S.N., Kovács, P., Archontoulis, S., Licht, M., Below, F., Kandel, H., Lindsey, L.E., Gaska, J., Conley, S., Shapiro, C., Orłowski, J.M., Golden, B.R., Kaur, G., Singh, M., Thelen, K., Laurenz, R., Davidson, D., Ciampitti, I.A., 2019. Assessing variation in US soybean seed composition (protein and oil). *Front. Plant Sci.* 10, 1-13.
- Barker, D.W., Sawyer, J.E., 2005. Nitrogen application to soybean at early reproductive development. *Agron. J.* 97, 615-619.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. lme4: Linear Mixed-effects Models Using Eigen and S4. R Package Version 1.1-14. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Bellaloui N., Bruns H.A., Abbas H.K., Mengistu A., Fisher D.K., Reddy K.N. (2015) Agricultural practices altered soybean seed protein, oil, fatty acids, sugars, and minerals in the Mid south USA. *Front. Plant Sci.* 6, 31-45.
- Bivand, R.S., Keitt, T., Rowlingson, B., 2016. Rgdal: Bindings for the Geospatial Data. Breiman, L., Friedman, J., Stone, C.J., Olshen, R.A., 1984. *Classification and Regression Trees*. CRC press.
- Bivand, R.S., Pebesma, E.J., Gomez-Rubio, V., 2013. *Applied Spatial Data Analysis with R*, second edition. Springer, NY.

- Bosaz, L.B., Gerde, J.A., Borrás, L., Cipriotti, P.A., Ascheri, L., Campos, M., Gallo, S., Rotundo, J.L., 2019. Management and environmental factors explaining soybean seed protein variability in central Argentina. *F. Crop. Res.* 240, 34-43.
- Brown-Guedira, G.L., Thompson, J.A., Nelson, R.L., Warburton, M.L. 2001. Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers. *Crop Sci.* 40: 815-823.
- Brumm, T.J., Hurburgh, C.R., 2006. Changes in long-term soybean compositional patterns. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 981-983.
- Brumm, T.J., Hurburgh, C.R., Jr Naeve, S. 2005. Quality of the soybean crop from the United States prepared for the American Soybean Association quality mission to Asia 2004 ([wwwsoy-growers.com/international/quality/US-05-Quality.pdf](http://wwwsoy-growers.com/international/quality/US-05-Quality.pdf)).
- CAC. Cámara Arbitral de Cereales, 2018. Bolsa De Comercio De Rosario. Available at URL. <http://www.cac.bcr.com.ar/pages/infojaindustrial.aspx>.
- Cafaro La Menza, N., Monzon, J.P., Specht, J.E., Grassini, P., 2017. Is soybean yield limited by nitrogen supply? *F. Crop. Res.* 213, 204-212.
- Cafaro La Menza, N., Monzon, J.P., Specht, J.E., Lindquist, J.L., Arkebauer, T.J., Graef, G., Grassini, P., 2019. Nitrogen limitation in high-yield soybean: Seed yield, N accumulation, and N-use efficiency. *F. Crop. Res.* 237, 74-81.
- Cai, T. and Chang, K.C. 1999. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality. *Ibid* 47,720 -727.
- Carrera, C., Martinez, M.J., Dardanelli, J., Balzarini, M., 2009. Water deficit effect on the relationship between temperature during the seed fill period and soybean seed oil and protein concentrations. *Crop Sci.* 49, 990–998.
- Chen, Y. and Nelson, R.L. 2004. Genetic variation and relationships among cultivated, wild, and semiwild soybean. *Crop Sci.* 44, 316-325.
- Ciampitti, I.A., Kimball, J., Adee, E.A., Ortez, O., Carmona, G.I., 2016. High-yielding soybean: genetic gain x fertilizer nitrogen interaction. *Kans. A.E.S. Res. Publ.* 2, 5.
- Cianzio, S.R., Cavins, J.F., Fehr, W.R., 1985. Protein and oil percentage of temperate soybean genotypes evaluated in tropical environments. *Crop Sci.* 25, 602–606.
- Cordone, G., C. Vidal, R. Albrecht, F. Martínez, H. Pescetti, G. Almada, L. Angeloni, E. Casasola, G. Cavallero, M. De Emilio, M. Gatti, G. Gerster, S. Guerra, L. Martins, J. Méndez, R. Pagani, J. Pabón, G. Prieto, L. Quevedo, N. Trentino, A. Malmantile, J. Rossi,

- y J. Scarel. 2010. Evaluación de la calidad industrial de soja en la provincia de Santa Fe para mejorar la producción - INTA EEA Oliveros. 45,131-136.
- Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Cressie, N.A., Hawkins, D., 1980. Robust estimation of the variogram: I. J. Int. Assoc. Math. Geol. 12, 115–125.
- Cuniberti, M., Herrero, R., 2018. Problemática de la baja proteína en soja. Informe de actualización técnica. INTA ediciones. 12, 9-3.
- Cuniberti, M. y Herrero, R., 2013. Caída en la proteína de la soja en la Argentina. <http://inta.gob.ar/documentos/caida-en-la-proteina-de-la-soja-en-la-argentina>
- Cuniberti, M., Herrero, R., Masiero, B. 2011. Evolución del contenido de proteína y de aceite en la región sojera argentina. Mercosoja, Rosario.
- Cuniberti, M., Rossi, R., Herrero, R., Ferrari, B., 2004. Industrial quality of soybean in Argentina. Proc. of the VII World Soybean Res. Conf., IV Int. Soybean Processing and Utilization Conf. and III Congresso Mundial de Soja, Foz de Iguaçu, Brazil. 961–970.
- Dardanelli, J.L., Balzarini, M., Martínez, M.J., Cuniberti, M., Resnik, S., Ramunda, S.F., Herrero, R., Baigorri, H., 2006. Soybean maturity groups, environments, and their interaction define mega-environments for seed composition in Argentina. Crop Sci. 46, 1939–1947.
- de Felipe, M., Gerde, J.A., Rotundo, J.L. 2008. Soybean genetic gain in maturity groups III to V in Argentina from 1980 to 2015. Crop Sci. 56, 3066-3077.
- Deak, N.A., Johnson, L.A., Lusas, E.W., Rhee, K.C. 2008. Soy protein products processing and utilization in soybeans. AOCS. 19, 661-724.
- Di Mauro, G., Cipriotti, P.A., Gallo, S., Rotundo, J.L., 2018. Environmental and management variables explain soybean yield gap variability in Central Argentina. Eur. J. Agron. 99, 186–194.
- Diaz, D.A.R., Pedersen, P., Sawyer, J.E., 2009. Soybean response to inoculation and nitrogen application following long-term grass pasture. Crop Sci. 49, 1058–1062.
- FAOSTAT, 2018. Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://faostat3.fao.org/home>.
- FAOSTAT, 2019. Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://faostat3.fao.org/home>.
- FAOSTAT, 2020. Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://faostat3.fao.org/home>.

- Farmaha, B.S., Fernández, F.G., Nafziger, E.D., 2012. Soybean seed composition, above-ground growth, and nutrient accumulation with phosphorus and potassium fertilization in no-till and strip-till. *Agron. J.* 104, 1006–1015.
- Fehr, W.R., Hoeck, J.A., Johnson, S.L., Murphy, P.A., Nott, J.D., Padilla, G.I., Welke, G.A., 2003. Genotype and environment influence on protein components of soybean. *Crop Sci.* 43,511-514.
- Fehr, W.R., and Caviness, C.E., 1977. Stages of soybean development. *Spec. Rep. 80. Iowa Agric. and Home Economics Exp. Stn., Ames.* 3-11.
- Fernández-Quintela, A., Macarulla, M.T., Del Barrio, A.S., Martínez, J.A., 1997. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods Hum Nutr* 51, 331-341.
- Ferreira, A.S., Balbinot Junior, A.A., Werner, F., Zucareli, C., Franchini, J.C., Debiassi, H., 2016. Plant density and mineral nitrogen fertilization influencing yield, yield components and concentration of oil and protein in soybean grains. *Bragantia.* 75, 362–370.
- García-Rebollar, P., Cámara, L., Lázaro, R.P., Dapoza, C., Pérez-Maldonado, R., Mateos, G.G., 2016. Influence of the origin of the beans on the chemical composition and nutritive value of commercial soybean meals. *Anim. Feed Sci. Tech.* 221, 245-261.
- Gaspar, A.P., Laboski, C.A.M., Naeve, S.L., Conley, S.P., 2017. Dry matter and nitrogen uptake, partitioning, and removal across a wide range of soybean seed yield levels. *Crop Sci.* 57, 2193-2204.
- Goovaerts, P., 1997. *Geostatistics for Natural Resources Evaluation. Applied Geostatistics Series.* Oxford University Press, New York, pp. 496.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
- Grieshop, C.M., Kadzere, C.T., Clapper, G.M., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Frazier, R.L., Fahey, G.C., 2003. Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals. *J. Agr. Food Chem.* 51, 7684-7691.
- Guinn, J.M., 2002. *Domestic Quality Standards and Trading Rules and Recommended Export Contract Specifications for U.S. Soybeans and Products.*
- Hall, A.J., Feoli, C., Ingaramo, J., Balzarini, M., 2013. Gaps between farmer and attainable yields across rainfed sunflower growing regions of Argentina. *F. Crop. Res.* 143, 119–129.
- Hall, A.J., Rebella, C.M., Ghersa, C.M., Culot, J.P., 1992. Field-crop ecosystems of the pampas. *Ecosystems of the world.* 19, 413–450.

- Ham, G.E., Liener, I.E., Evans, S.D., Frazier, R.D., Nelson, W.W., 1975. Yield and composition of soybean seed as affected by N and S fertilization. *Agron. J.* 67, 293-297.
- Hartwig, E.E. and 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.
- Hermansson, A.M., 1978. Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. *J. Texture Stu.* 9,33-58.
- Heywood, A.A., Myers, D.J., Bailey, T.B., Johnson, L.A., 2002. Functional properties of extruded-expelled soybean flours from value enhanced soybeans. *JAOCS.* 79, 699-702.
- Houx III, J.H., Wiebold, W.J., Fritschi, F.B., 2014. Rotation and tillage affect soybean grain composition, yield, and nutrient removal. *F. Crops Res.* 164, 12–21.
- Hurburgh, C.R., 1994. Long term soybean composition patterns and their effect on processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 1425-1427.
- Hurburgh, C.R., Brumm, T.J., Gulnn, J.M., Harhnig, R.A., 1990. Protein and oil patterns in U.S. and world soybean markets. *JAOCS.* 67, 966-973.
- Hyten, D.L., Song, Q.J., Zhu, Y.L., Choi, I.Y., Nelson, R.L., Costa, J.M., Specht, J.E., Shoemaker, R.C., Cregan, P.B., 2006. Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 16666–16671.
- Johnson, L.A., 2000. Recovery of fats and oils from plant and animal sources. *Introduction to fats and oils.* JAOCS, Champaign 108–135.
- Jung, S., Rickert, D.A., Deak, N.A., Aldin, E.D., Recknor, J., Johnson, L.A., Murphy, P.A., 2003. Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. *JAOCS.* 80,1169–1173.
- Karr-Lilienthal, L.K., Grieshop, C.M., Merchen, N.R., Mahan, D.C., Fahey, G.C., 2004. Chemical composition and protein quality comparisons of soybeans and soybean meals from five leading soybean-producing countries. *J. Agr. Food. Chem.* 52, 6193-6199.
- Khatib, K.A., Herald, T.J., Aramouni, F.M., MacRitchie, F., Schapaugh, W.T., 2002. Characterization and functional properties of soy  $\beta$ -conglycinin and glycinin of selected genotypes. *J. Food Sci.* 67, 2923-2929.
- Kinsella, J.E., 1979. Functional properties of soy proteins. *AOAC.* 56, 242-258.
- Kim, M., Hyten, D. L., Niblack, T. L., and Diers, B. W., 2011. Stacking resistance alleles from

- wild and domestic soybean sources improves soybean cyst nematode resistance. *Crop science*, 51, 934-943.
- Kitamura, K., 1995. Genetic improvement of nutritional and food processing quality in soybean. *Jpn. Agric. Res. Quart.* 8, 291.
- Kofsky, J., Zhang, H., and Song, B. H., 2018. The untapped genetic reservoir: the past, current, and future applications of the wild soybean (*Glycine soja*). *Front. Plant Sci.* 9, 949.
- Kong, L., Lu, S., Wang, Y., Fang, C., Wang, F., 2018. Quantitative trait locus mapping of flowering time and maturity in soybean using next-generation sequencing-based analysis. *Front. Plant Sci.* 9, 1–20.
- Kravchenko, A.N., Bullock, D.G., 2002. Soybean quality data as a function of field topography :I.SPatial data analysis. *Crop Sci.* 42, 804–815.
- Krishnan, H.B., Wiebold, W.J., Bennett, J.O., Mahmoud, A.A., Natarajan, S.S., Mawhinney, T.P., 2006. Effect of six decades of selective breeding on soybean protein composition and quality: A biochemical and molecular analysis. *J. Agr. Food Chem.* 54, 3916-3922.
- Krueger, K., Goggi, A.S., Mallarino, A.P., Mullen, R.E., 2013. Phosphorus and potassium fertilization effects on soybean seed quality and composition. *Crop Sci.* 53, 602–610.
- Kwanyuen, P., Pantalone, V.R., Burton, J.W., Wilson, R.F., 1997. A new approach to genetic alteration of soybean protein composition and quality. *JAOCS.* 74, 983–987.
- Kwanyuen, P., Wilson, R.F., Burton, J.W., 1998. Soybean protein quality in emerging technologies current practices quality control technology transfer and environmental issues. In the proceedings of the world conference on oilseed and edible oils processing AOAC.
- La, T., Large, E., Taliercio, E., Song, Q., Gillman, J.D., Xu, D., Scaboo, A., 2019. Characterization of select wild soybean accessions in the USDA germplasm collection for seed composition and agronomic traits. *Crop Sci.* 59, 233-251.
- Lee, K. H., Ryu, H. S., and Rhee, K. C., 2003. Protein solubility characteristics of commercial soy protein products. *JAOCS*, 80, 85-90.
- Leamy, L. J., Zhang, H., Li, C., Chen, C. Y., and Song, B. H., 2017. A genome-wide association study of seed composition traits in wild soybean (*Glycine soja*). *BMC genomics*, 18, 18.
- Maestri, D.M., Labuckas, D.O., Meriles, J.M., Lamarque, A.L., Zygadlo, J.A., Guzmán, C.A., 1998. Seed composition of soybean cultivars evaluated in different environmental regions. *J. Sci. Food Agric.* 77, 494–498.
- Maruyama, N., Salleh, M., Ramlan, M., Takahashi, K., Yagasaki, K., Goto, H., Hontani, N.,

- Nakagawa, S., Utsumi, S., 1999. Structure-physicochemical function relationships of soybean  $\beta$ -conglycinin heterotrimers. *J. Agr. Food Chem.* 50, 4323-4326.
- McKenzie, H.A., Wallace, H.S., 1954. The Kjeldahl determination of nitrogen: a critical study of digestion conditions-temperature catalyst and oxidizing agent. *Aust. J. Chem.* 7, 55-70.
- McWatters, K.H., Holmes, M.R., 1979. Influence of pH and salt concentration on nitrogen solubility and emulsification properties of soy flour. *J. Food Sci.* 44, 770-773.
- Medic, J., Atkinson, C., Hurburgh, C.R., 2014. Current knowledge in soybean composition. *JAOCS.* 91, 363-384.
- Moreira, A., Moraes, L.A.C., Schroth, G., Mandarino, J.M.G., 2015. Effect of nitrogen, row spacing, and plant density on yield, yield components, and plant physiology in soy- bean-wheat intercropping. *Agron. J.* 107, 2162–2170.
- Morrison, M.J., Voldeng, H.D., Cober, E.R., 2000. Agronomic changes from 58 years of genetic improvement of short-season soybean cultivars in Canada. *Agron. J.* 92, 780–784.
- Mourtzinis, S., Gaspar, A.P., Naeve, S.L., Conley, S.P., 2017. Planting date, maturity, and temperature effects on soybean seed yield and composition. *Agron. J.* 109, 2040–2049.
- Murphy, P.A., 2008. Soybean proteins, In L.A. Johnson, et al., eds. *Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization.* AOCS Press, Urbana, IL.
- Murphy, P.A., Resurreccion, A.P., 1979. Varietal and environmental differences in soybean glycinin and  $\beta$ -conglycinin content. *J. Agr. Food Chem.* 32, 911-915.
- 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.
- Nielsen, N.C., Dickinson, C.D., Cho, T.J., Thanh, V.H., Scallon, B.J., Fischer, R.L., Sims, T.L., Drews, G.N., Goldberg, R.B., 1989. Characterization of the glycinin gene family in soybean. *The Plant cell.* 1, 313-328.
- Orf, J. H., Diers, B. W., and Boerma, H. R., 2004. Genetic improvement: Conventional and molecular-based strategies. *Soybeans: Improvement, production, and uses.* 16, 417-450.
- Ortez, O.A., Salvagiotti, F., Enrico, J.M., Prasad, P.V.V., Armstrong, P., Ciampitti, I.A., 2018. Exploring nitrogen limitation for historical and modern soybean genotypes. *Agron. J.* 110, 2080-2090.
- Patil, G., Mian, R., Vuong, T., Pantalone, V., Song, Q., Chen, P., Shannon, G.J., Carter, T.C., Nguyen, H.T., 2017. Molecular mapping and genomics of soybean seed protein : a review and perspective for the future. *Theor. Appl. Genet.* 130, 1975–1991.

- Pebesma, E.J., 2004. Multivariable geostatistics in S: the gstat package. *Comput. Geosci.* 30, 683–691.
- Peoples, M.B., Faizah, A.W., Rerkasem, B., Herridge, D.F., 1989. Method for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Australian Centre for Int. Agric. Res, 118041, Canberra.
- Pesic, M.B., Vucelic-radovic, B.V., Barac, M.B., Stanojevic, S.P., 2005. The influence of genotypic variation in protein composition on emulsifying properties of soy proteins. *JAOCS.* 82: 667-672.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy S., Sarkar D., R Core Team, 2020. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-148, <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Pyrzcz, M.J., Deutsch, C.V., 2003. The whole story on the hole effect. *Geostat. Assoc. Aust.* 18, 3–5.
- R Core Team R: a language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing Vienna 2013 <http://wwwR-project.org>.
- Radeloff, V.C., Miller, T.F., He, H.F., Mladenoff, D.J., 2000. Periodicity in spatial data and geostatistical models: autocorrelation between patches. *Ecography* 23, 81–91.
- Radushev, D., 2007. Graph Pad Prism Version 5.0. Graph Pad Software. Inc., San Diego, CA.
- Riblett, A.L., Herald, T.J., Schmidt, K.A., Tilley, K.A. 2001. Characterization of  $\beta$ -conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. *J. Agr. Food Chem.* 49, 4983-4989.
- Rickert, D.A., Johnson, L.A., Murphy, P.A., 2004. Improved fractionation of glycinin and  $\beta$ -conglycinin and partitioning of phytochemicals. *J. Agr. Food Chem.* 52, 1726-1734.
- Robinson, G.K., 1991. That BLUP is a good thing: the estimation of random effects. *Stat. Sci.* 6, 15–32.
- Rotundo, J.L., Borrás, L., 2016. Reduced soybean photosynthetic nitrogen use efficiency associated with evolutionary genetic bottlenecks. *Funct. Plant Biol*, 43, 862-869.
- 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., Borrás, L., Westgate, M.E., Orf, J.H., 2009. Relationship between assimilate supply per seed during seed filling and soybean seed composition. *F. Crop. Res.* 112, 90-96.

- 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.
- Rotundo, J.L., Westgate, M.E., 2009. Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. *F. Crop. Res.* 110, 147-156.
- Rotundo, J.L., Westgate, M.E., 2010. Rate and duration of seed component accumulation in water-stressed soybean. *Crop Sci.* 50, 676–684.
- Rowntree, S.C., Suhre, J.J., Weidenbenner, N.H., Wilson, E.W., Davis, V.M., Naeve, S.L., Conley, S.P., 2013. Genetic gain × management interactions in soybean: I. Planting date. *Crop Sci.* 53, 1128-1138.
- Salvagiotti, F., Cassman, K.G., Specht, J.E., Walters, D.T., Weiss, A., Dobermann, A., 2008. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: a review. *F. Crop. Res.* 108, 1-13.
- Santachiara, G., Borrás, L., Salvagiotti, F., Gerde, J.A., Rotundo, J.L., 2017. Relative importance of biological nitrogen fixation and mineral uptake in high yielding soybean cultivars. *Plant Soil* 418, 191–203.
- Santachiara, G., Salvagiotti, F., Gerde, J.A., Rotundo, J.L., 2018. Does biological nitrogen fixation modify soybean nitrogen dilution curves? *F. Crop. Res.* 223, 171-178.
- Santachiara, G., Salvagiotti, F., Rotundo, J.L., 2019. Nutritional and environmental effects on biological nitrogen fixation in soybean: A meta-analysis. *F. Crop. Res.* 240, 106-115.
- Schmitt, M.A., Lamb, J.A., Randall, G.W., Orf, J.H., Rehm, G.W., 2001. In-season fertilizer nitrogen applications for soybean in Minnesota. *Agron. J.* 93, 983-988.
- Specht, J.E., Hume, D.J., Kumudini, S.V., 1999. Soybean yield potential - A genetic and physiological perspective. *Crop Sci.* 39, 1560–1570.
- Streeter, J., Wong, P.P., 1988. Inhibition of legume nodule formation and N<sub>2</sub> fixation by nitrate. *Crit. Rev. Plant Sci.* 7, 1-23.
- Tamagno, S., Greco, I.A., Almeida, H., Di Paola, J.C., Martí Ribes, F., Borrás, L., 2016. Crop management options for maximizing maize kernel hardness. *Agron. J.* 108, 1561–1570.
- Tamagno, S., Sadras, V.O., Haegele, J.W., Armstrong, P.R., Ciampitti, I.A., 2018. Interplay between nitrogen fertilizer and biological nitrogen fixation in soybean: implications on seed yield and biomass allocation. *Sci. Rep.* 8, 1-11.
- Tanksley, S. D. and McCouch, S. R., 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277, 1063-1066.

- Tezuka, M., Taira, H., Igarashi, Y., Yagasaki, K., Ono, T., 2000. Properties of tofus and soy milks prepared from soybeans having different subunits of glycinin. *J. Agr. Food Chem.* 48, 1111–1117.
- Thakur, M., Hurburgh, C.R., 2007. Quality of US soybean meal compared to the quality of soybean meal from other origins. *JAOCs.* 84, 835-843.
- Verón, S.R., de Abelleira, D., Lobell, D.B., 2015. Impacts of precipitation and temperature on crop yields in the Pampas. *Clim. Change* 130, 235–245.
- Welch, L.F., Boone, L.V., Chambliss, C.G., Christiansen, A.T., Mulvaney, D.L., Oldham, M.G., Pendleton, J.W., 1973. Soybean yields with direct and residual nitrogen fertilization. *Agron. J.* 65, 1-4.
- Wilcox, J., Shibles, R., 2001. Interrelationships among seed quality attributes in soybean. *Crop Sci* 41, 11–14.
- Weidenbenner, N.H., Rowntree, S.C., Wilson, E.W., Suhre, J.J., Conley, S.P., Casteel, S.N., Davis, V.M., Diers, B.W., Esker, P.D., Specht, J.E., Naeve, S.L., 2014. Fungicide management does not affect the rate of genetic gain in soybean. *Agron. J.* 106, 2043–2054.
- Wilson, R.F., 2004. Seed composition. *Soybeans: Improvement, production, and uses.* 16, 621-677.
- Wolf, W.J., 1970. Soybean proteins Their functional chemical and physical properties. *J. Agr. Food Chem.* 18: 969-976.
- Yamauchi, F., Yamagishi, T., Iwabuchi, S., 1991. Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. *Food Rev. Int.* 7, 283-322.
- Zhang, J., Wang, X., Lu, Y., Bhusal, S.J., Song, Q., Cregan, P.B., Jiang, G.L., 2018. Genome-wide scan for seed composition provides insights into soybean quality improvement and the impacts of domestication and breeding. *Mol. plant.* 11,460-472.
- Žilić, S.M., Barać, M.B., Pešić, M.B., Mladenović Drinić, S.D., Ignjatović Micić, D.D., Srebrić, M.B., 2011. Characterization of proteins from kernel of different soybean varieties. *J. Sci. Food Agric.* 9, 60-67.
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N.J., Saveliev, A.A., Smith, G.M., 2009. *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R.* Springer, New York.

# ANEXO I

**Tabla Suplementaria 2.1.** Descripción de los 52 sitios donde se realizaron ensayos multiambientales para soja de primera y de segunda.

Soja de primera / segunda	Sitio	Coordenadas geográficas		Cantidad de genotipos
		Latitud	Longitud	
Soja de primera	AL 14/15	-33,5147	-62,6411	14
	CP 14/15	-32,0373	-61,8155	17
	CL 14/15	-31,3628	-61,7094	17
	GA 14/15	-34,1788	-61,2370	17
	IN 14/15	-32,9693	-62,1600	12
	IV 14/15	-33,1522	-62,4135	13
	LR 14/15	-32,4515	-61,5710	20
	LC 14/15	-32,3567	-61,5796	12
	MT 14/15	-33,9970	-61,9917	12
	MG 14/15	-33,7374	-63,9486	17
	OLI 14/15	-32,5325	-60,9130	12
	PU 14/15	-32,9970	-60,9917	17
	AM 15/16	-33,8727	-63,9250	13
	ALB 15/16	-34,4910	-61,7483	8
	ALR 15/16	-33,3500	-63,7167	13
	BY 15/16	-30,8394	-64,1483	17
	BE 15/16	-34,7500	-65,2500	14
	CS 15/16	-34,4333	-62,9500	10
	CO 15/16	-34,0638	-61,2042	8
	DLS 15/16	-34,3861	-64,7058	13
	GP 15/16	-31,1790	-64,1616	16
	GL 15/16	-34,0167	-63,9167	14
	GLN 15/16	-33,6358	-64,0158	13
	HER 15/16	-32,4167	-63,7333	13
	IN 15/16	-32,9714	-62,1595	14
	JM 15/16	-30,9686	-63,9739	16

	JU 15/16	-34,5795	-60,7799	8
	LT 15/16	-31,2359	-63,0917	17
	LL 15/16	-31,7887	-63,8103	17
	LB 15/16	-30,8119	-63,6656	17
	LE 15/16	-33,4907	-64,4311	14
	LM 15/16	-32,4460	-65,0276	15
	MA 15/16	-37,0618	-57,2185	13
	MT 15/16	-33,9972	-62,0440	14
	MO 15/16	-32,6092	-59,8817	19
	PI 15/16	-31,2452	-63,6838	17
	SAA 15/16	-34,3000	-59,5312	8
	SAC 15/16	-31,5585	-63,0010	17
	SA 15/16	-34,3988	-60,3596	8
	SJD 15/16	-30,4219	-63,8697	17
	SP 15/16	-33,9918	-59,7601	8
	SF 15/16	-33,2783	-64,3497	13
	TI 15/16	-32,7333	-65,3000	12
Soja de segunda	AR 14/15	-33,6835	-62,3546	10
	CE 14/15	-32,4539	-61,4574	9
	PU 14/15	-32,9970	-60,9917	9
	SE 14/15	-33,8273	-61,5049	10
	SI 14/15	-33,8815	-61,7810	8
	VI 14/15	-33,6430	-63,0726	9
	AR 15/16	-33,6835	-62,3546	13
	MO 15/16	-32,6092	-59,8817	19
	NOE 15/16	-32,3567	-62,3868	13

---

**Tabla Suplementaria 2.2.** Mejor predictor lineal insesgado (BLUP) para concentración de proteína en grano, rendimiento y N en granos para los genotipos evaluados en ensayos multiambientales en las campañas 2014/2015 y 2015/2016.

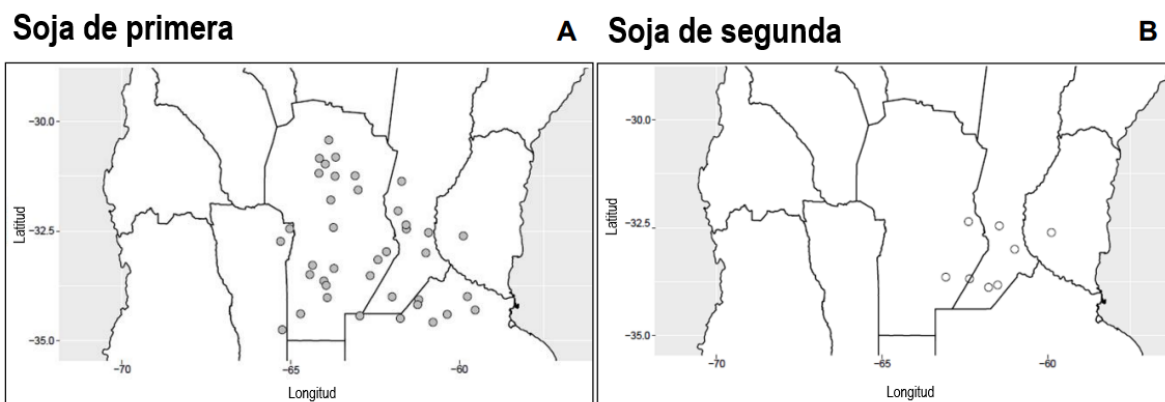
<b>Soja de primera</b>				<b>Soja de segunda</b>			
Genotipo	Proteína (%)	Rendimiento (kg ha <sup>-1</sup> )	N en grano (kg N ha <sup>-1</sup> )	Genotipo	Proteína (%)	Rendimiento (kg ha <sup>-1</sup> )	N en grano (kg N ha <sup>-1</sup> )
A 5009	37,6	3.878	232	AW 5714	37,3	4.005	240
AW 5714	37,2	4.069	241	AW 6211	37,6	3.821	231
AW 5815	37,2	4.038	239	CZ 4.97	37,3	3.943	236
AW 6211	37,0	4.124	243	CZ 4306	37,8	3.953	240
CZ 3906	37,2	3.977	236	CZ 4505	37,8	3.874	235
CZ 4.97	36,0	4.129	238	DM 3815	37,5	3.914	235
CZ 4306	37,4	4.090	243	DM 4014	36,7	4.027	236
CZ 4505	37,4	3.976	237	DM 4612	36,6	3.911	229
CZ 5905	37,5	3.920	234	DM 4614	37,9	3.943	240
CZ 6205	36,9	3.946	233	DM 4615	37,7	3.894	235
DM 3312	35,9	4.018	236	DM 53i53	37,0	4.003	238
DM 3810	36,7	3.925	231	DM 5958	37,8	3.831	232
DM 3815	36,7	4.021	236	DM 61i61	37,5	3.965	238
DM 4014	36,4	4.101	239	DM 6263	37,9	4.046	244
DM 4016	36,8	4.022	237	DS 1470	37,7	3.952	239
DM 4214	37,4	4.014	238	LDC 3.8	36,9	3.692	218

DM 4612	36,2	4.150	240	LDC 4.7	37,9	3.802	230
DM 4614	37,1	4.030	239	LDC 4.9	37,7	4.006	242
DM 4615	36,4	4.110	239	LDC 5.3	37,1	3.604	218
DM 4913	36,9	4.126	242	LDC 5909	37,9	3.787	230
DM 4915	36,3	4.148	241	M 5410	38,0	3.869	235
DM 5351	36,6	3.996	235	MS 4.4	37,7	3.761	227
DM 53i53	36,5	4.188	244	MS 6.3	38,0	3.751	228
DM 5958	37,3	4.024	239	NS 4619	39,0	3.967	248
DM 61i61	37,1	4.125	242	NS 4955	38,3	3.842	236
DM 6263	37,0	3.990	236	NS 5258	37,3	3.788	228
DS 1470	37,6	4.060	244	NS 5419	37,4	3.915	235
FN 3.85	36,7	3.957	233	NS 6248	38,3	3.997	244
FN 4.35	37,6	3.904	234	SPS 6x1	37,6	3.782	229
FN 5.55	37,2	3.767	225	SRM 4222	38,0	3.905	237
HO 4919	36,5	4.195	245	SYN 4x3	37,9	3.925	238
HO 5010	36,9	4.023	237	SYN 5x1	37,5	3.760	226
LDC 3.7	36,4	4.027	235	SYN 5x2	38,0	3.874	235
LDC 4.7	36,4	3.985	232				
LDC 5.3	36,6	4.039	237				
LDC 5909	37,2	4.056	239				
M 5410	36,8	4.012	237				
MS 4.0	36,9	4.192	246				
MS 4.4	37,2	4.075	241				
MS 4.9	36,3	3.984	232				

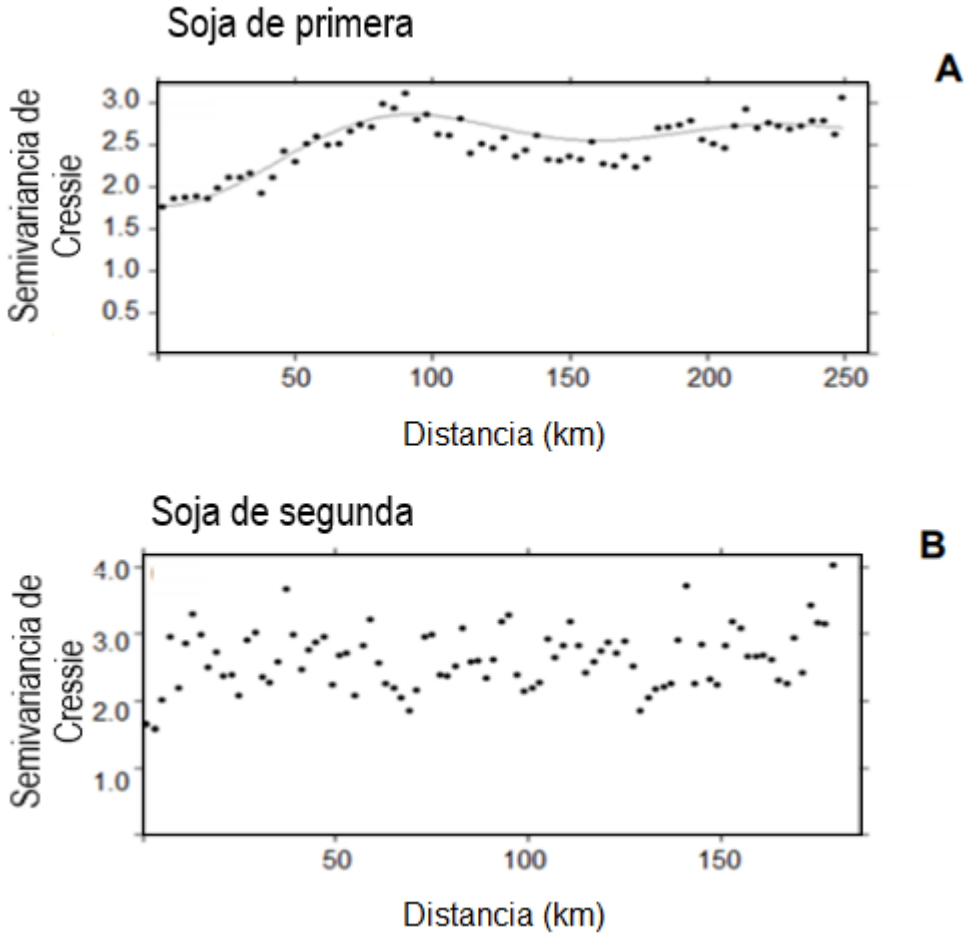
MS 6.3	36,9	3.991	236
MS 5901	37,6	3.901	233
NS 3809	36,5	4.052	237
NS 4309	37,4	4.040	240
NS 4619	38,2	4.004	244
NS 4955	37,5	4.058	243
NS 5258	37,1	4.010	237
NS 5419	37,0	3.991	236
NS 6909	37,2	3.975	236
SPS 3x7	36,1	3.963	230
SPS 4x4	36,8	3.984	235
SPS 6x1	37,4	4.012	237
SRM 4222	36,8	3.946	233
SRM 4602	36,7	3.992	235
SYN 4x1	36,6	3.947	232
SYN 4x3	37,1	3.880	231
SYN 5x1	37,2	4.079	240
SYN 5x2	37,1	3.815	227

---

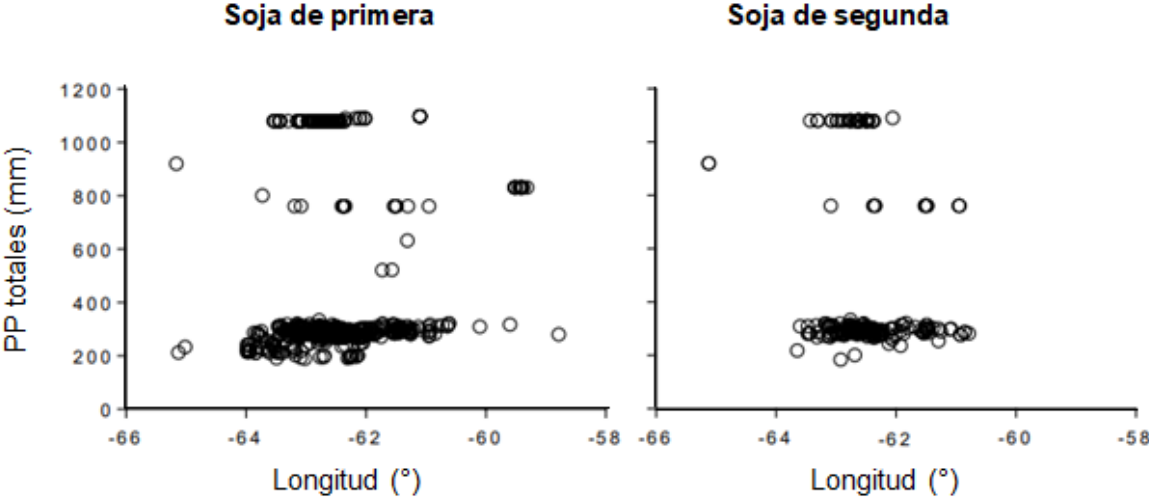
**Figura Suplementaria 2.1.** Ubicación de los sitios de los ensayos multiambientales en la región central de Argentina durante las campañas 2014/15 y 2015/16 para soja de primera (43 experimentos) y de segunda (9 experimentos) Cada símbolo puede representar más de una prueba debido a la proximidad.



**Figura Suplementaria 2.2.** Variogramas muestrales omnidireccionales de concentración de proteína en grano para soja de primera y de segunda. La línea continua representa el modelo ajustado para soja de primera.

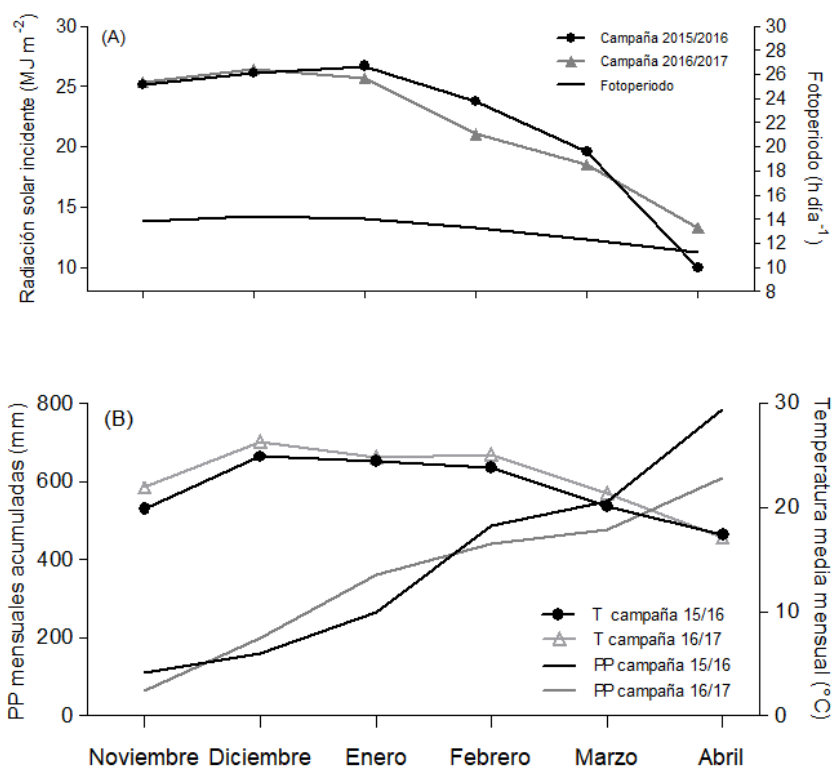


**Figura Suplementaria 2.3.** Correlación entre las precipitaciones totales (mm) y la longitud geográfica del ambiente de crecimiento.



## **ANEXO II**

**Figura Suplementaria 3.1.** Radiación solar media mensual y fotoperíodo diario (A) y temperatura media mensual y precipitaciones acumuladas (B) para el período noviembre-abril en las dos campañas evaluadas.



## **ANEXO III**

**Tabla Suplementaria 4.1.** Efectos de genotipo, interacción tipo x ambiente e interacción genotipo dentro de tipo x ambiente sobre proteína en grano, proteína de harina, aceite y proporción de tegumento.

Ambiente	Tipo	Genotipo (Tipo)	Proteína en grano (%)	Proteína en harina (%)	Aceite (%)	Proporción de teg. (%)
	Ancestros silvestres ( <i>G. soja</i> )	PI339871A	45,3	59,2	7,4	25,0
		PI407027	44,6	57,8	5,3	26,1
		PI468400A	41,3	53,8	7,3	32,6
		PI483464A	42,7	56,1	5,3	28,1
		PI549046	40,7	52,1	7,5	16,0
		PI597459D	45,7	57,3	7,0	23,0
		PI597461A	39,0	51,5	11,2	28,2
	Variedades locales asiáticas	FC33243	37,0	43,8	15,8	8,5
		PI567298	37,0	43,6	19,0	10,2
		PI567368	43,2	50,8	13,3	9,4
		PI594615	45,8	52,8	12,7	23,4
		PI594777	42,7	47,7	13,3	9,5
	Ancestrales NAm	PI548362	39,2	47,0	18,2	8,8
		PI548456	39,1	45,2	20,0	25,8
		PI548485	41,8	52,4	14,2	20,2
		PI548603	39,3	48,0	19,5	8,5
		PI548657	40,8	49,4	13,0	5,9
	Elite	A 5009	36,5	45,5	20,4	9,9

		DM 3810	36,5	43,9	19,6	11,2
		DM 4612	36,3	42,7	18,8	10,7
		NS 4619	35,8	43,4	20,2	11,8
		SPS 4X4	36,4	44,7	21,0	11,0
Temprano	Ancestros silvestres ( <i>G. soja</i> )	PI339871A	44,1	59,6	7,4	19,4
		PI407027	43,1	57,9	5,4	19,6
		PI468400A	41,3	53,8	7,3	32,6
		PI483464A	41,8	55,5	5,7	25,7
		PI549046	40,3	52,1	7,9	35,6
		PI597459D	47,5	58,4	5,4	23,2
		PI597461A	36,9	48,7	11,1	35,2
	Variedades locales asiáticas	FC33243	36,1	42,9	18,6	10,0
		PI567298	34,9	43,0	20,4	10,5
		PI567368	41,3	50,9	14,0	10,2
		PI594615	41,0	47,2	12,8	9,8
		PI594777	41,7	46,3	14,6	9,9
	Ancestros NAm	PI548362	37,2	46,1	21,1	9,2
		PI548456	38,7	43,9	18,5	12,6
		PI548485	40,6	51,1	15,1	20,5
		PI548603	38,1	47,7	21,0	8,8
		PI548657	39,2	49,5	14,6	3,1
Elite	A 5009	34,4	44,9	21,9	10,5	
	DM 3810	35,0	43,0	23,9	11,2	
	DM 4612	35,8	43,4	19,4	11,5	
	NS 4619	33,9	42,9	23,7	11,1	
	SPS 4X4	35,4	44,6	21,0	10,9	

Tardío	Ancestros silvestres ( <i>G. soja</i> )	PI339871A	46,4	58,8	8,2	30,6
		PI407027	46,1	57,6	5,2	32,6
		PI483464A	43,6	56,8	4,8	30,5
		PI549046	41,2	52,1	7,2	16,0
		PI597459D	43,9	56,3	8,6	22,7
		PI597461A	41,2	54,3	11,3	21,2
	Variedades locales asiáticas	FC33243	38,0	44,7	13,1	7,1
		PI567298	39,0	44,2	17,7	9,9
		PI567368	45,0	50,7	12,7	8,6
		PI594615	50,6	58,5	12,7	37,1
		PI594777	43,6	49,1	12,0	9,0
	Ancestrales NAm	PI548362	41,1	48,0	15,3	8,4
		PI548456	39,4	46,4	21,5	39,1
		PI548485	43,0	53,7	13,4	20,0
		PI548603	40,5	48,4	18,1	8,2
		PI548657	42,5	49,3	11,4	8,8
	Elite	A 5009	38,6	46,1	19,0	9,4
		DM 3810	37,9	44,8	15,3	7,1
		DM 4612	36,7	42,1	18,3	10,0
		NS 4619	37,8	44,0	16,8	11,8
		SPS 4X4	37,4	44,8	20,9	11,2

---