

**El cultivo de soja (*Glycine max*) y la respuesta a la herbivoría bajo
exposición a ozono.**

Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,

Área: Producción Vegetal (cultivos extensivos).

Natalia Lorena Cantelmi

Ingeniera Agrónoma. Universidad de Buenos Aires. (2001)

Lugar de trabajo: Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Directora de Tesis

Analía Menéndez

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Agropecuarias (Facultad de Agronomía UBA, Argentina)

Co-director de Tesis

Jorge Alberto Zavala

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor Rerum Naturalis (Friedrich Schiller Universität, Alemania)

Consejera de Estudios

Vanesa Gisela Jacobi

Licenciado en Genética (Universidad Nacional de Misiones)

Doctora en Ciencias Agropecuarias (Facultad de Agronomía UBA, Argentina)

A mi familia (incluso los que ya no están), a mi Rita, a mis amigos.

Agradecimientos

Para mí la más importante página de esta tesis corresponde a ésta, a los agradecimientos. Porque como dice el proverbio: Si quieres ir rápido ve solo, si quieres llegar lejos ve acompañado. Y son tantos los que me ayudaron a llegar a esta meta que quiero remarcar la importancia del trabajo en grupo. Quiero comenzar por la palabra GRACIAS, que espero resuene en todas esas personas que estuvieron de algún u otro modo ayudándome a alcanzar este acontecimiento para mí muy importante. Quiero en primer lugar agradecer a mi familia por haber estado desde el primer instante apoyándome, a mi gran padre (que no es la traducción del inglés 😊) sino mi papá el que me ayudo a instalar hace unos años el primer ensayo de la tesis en el campito del IFEVA, no fue fácil sembrar tantas macetas, trasladando tierra hasta las cámaras con el calor de verano. A mi mamá, por haber escuchado tanto y tanto de ozono que ya puede postularse para una tesis. A mis amigas y amigos por haber bancado tantas salidas y encuentros frustrados por años porque tenía que estudiar o escribir para la tesis. Voy a extrañar la pregunta: ¿cómo va la tesis? lo juro.

Un párrafo especial para mi comité, mi directora Analía Menéndez por tantas horas de reuniones y apoyo, hoy es más que mi directora, es una amiga. Para Jorge Zavala, por haber aceptado ser el codirector de mi tesis, un honor para mí. Un curso que dicto en la EPG sería el punto de partida para que despertara mi pasión por la interacción insecto- planta. En ese curso tan especial conocí a mi codirector y mi consejera de tesis. Tiempo después me animaría a solicitarle a Jorge que sea mi codirector y su aceptación fue para mí muy emocionante por todo lo que lo admiro. Mas tarde, Vanesa Jacobi sería mi consejera y lo más importante para mí, una gran amiga. Imprescindible para mí desde hace mucho tiempo, ayudándome en todo, cebándome los exquisitos mates entrerrianos, llenándome siempre de buena energía. Con ellos, llegué a la cátedra de Bioquímica, y conocí a ese grupo maravilloso que acompaña a Jorge. Esos cerebritos que también me re bancaron y ayudaron: Florencia, Gerardo, Camila, Bruno. Mariana, Fran. A la gran Dani por haberme dado la primera ayuda cuando entre al labo. A Mariana Manetti, Daniela Tejedor y Vanesa Jacobi por haberme ayudado largas horas en los ensayos. También a Andrés, Vero, Alina y todos los de la cátedra de bioquímica por la buena onda.

A Laura Ventura, no solo por haberme cedido a sus larvitas para mis ensayos, sino por haberme ayudado en esos momentos de extrema precisión de las posturas con

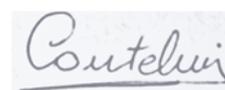
todas sus palabras de esperanza. A Violeta Jakubowicz de Agidea por salvarme en el segundo ensayo con las larvas. Al IFEVA por haberme permitido utilizar sus instalaciones.

Me siento inmensamente orgullosa por haber tenido el privilegio de cursar mi maestría en la EPG, intento día a día reclutar alumnos porque sé que es de excelencia. Agradezco a la Facultad de Agronomía por haberme permitido, siendo docente cursar este posgrado y estimularme a la formación académica. A cada uno de los excelentes profesores que tuve por el soporte que me dieron. Especialmente a Juan que sé que desde su “nuevo lugar” me ayudó.

A Gustavo Striker por siempre estar ahí cuando necesite hacer alguna consulta, un director de carrera de lujo. A Gustavo Madonni y la comisión académica por su apoyo. A todos los administrativos de la EPG, TODOS y cada uno con Mabel a la cabeza (sí, una entrerriana más en mi camino, gracias). ¡A Susy!

Años muy intensos, mucho estudio, pero también muchos nuevos amigos que conocí haciendo cursos en la EPG, Rodri y Fanny que me ayudaron...

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

A handwritten signature in cursive script, reading "Cantelmi", written in black ink on a light-colored background.

Ing. Agr. Natalia Lorena Cantelmi

INDICE GENERAL

CAPITULO I	1
Introducción general, objetivos e hipótesis.....	1
1.1 INTRODUCCION GENERAL.....	2
1.1.1 El ozono troposférico	4
1.1.2 Efectos del ozono troposférico sobre los componentes bióticos.....	5
1.1.3. Interacción planta–insecto.	7
1.1.3.1 Interacción soja – <i>Spodoptera frugiperda</i>	11
1.1.4. Triple interacción: cultivo-ozono-herbívoro	15
1.1.4.1. Interacción ozono y herbivoría	16
1.2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	18
1.2.1 Objetivos	18
1.2.2 Hipótesis.....	18
CAPITULO II	22
El cultivo de soja y la reducción del rendimiento bajo contaminación por ozono crónico.	22
2.1 INTRODUCCION	23
2.1.1 La soja en Argentina.....	23
2.1.2 Soja y Ozono.....	24
2.2 MATERIALES Y METODOS.....	28
2.2.1 Diseño experimental y tratamientos:	28
2.2.2 Relevamiento, cosechas y mediciones.....	29
2.2.3 Análisis estadístico	31
2.3 RESULTADOS	33
2. 4 DISCUSIÓN.....	36
2.5 CONCLUSIÓN	39
CAPITULO III	45
El ozono troposférico como modulador de los compuestos de defensas de la soja frente a la herbivoría.....	45
3.1 INTRODUCCION	43
3.1.1 La interacción de la soja con <i>Spodoptera frugiperda</i>	45
3.2 MATERIALES Y METODOS.....	47
3.2.1 Material vegetal	47

3.2.2 Insectos	48
3.2.3 Efecto de la exposición de ozono en la supervivencia, el peso y la longitud de larvas de <i>S. frugiperda</i>	48
3.2.3.1 Supervivencia de neonatos de <i>S. frugiperda</i>	48
3.2.3.2 Peso y longitud de las larvas	49
3.2.4 Efecto de la exposición a ozono sobre compuestos de defensas de las plantas de soja frente a la herbivoría	49
3.2.5 Determinación de la actividad de inhibidores de tripsina y cuantificación de proteína soluble.....	50
3.2.6 Cuantificación de compuestos fenólicos	51
3.2.7 Determinación de la actividad de tripsina del extracto del intestino de <i>S. frugiperda</i>	51
3.2.8 Análisis estadísticos:	55
3.3 RESULTADOS	56
3.3.1 Supervivencia de las larvas de <i>S. frugiperda</i>	56
3.3.2 Crecimiento y desarrollo de larvas de <i>S. frugiperda</i>	57
3.3.3 Inhibidores de proteasas en hojas de soja.....	60
3.3.4 Actividad de tripsina	62
3.3.5 Cuantificación de los compuestos fenólicos en hojas.....	62
3.4 DISCUSION.....	64
3.4.1 El ozono crónico como modulador de los flavonoides presentes en soja.....	65
3.4.2 Efecto del ozono crónico en la supervivencia, el peso y la longitud de las larvas de <i>S. frugiperda</i>	65
3.4.3 El impacto de los inhibidores de tripsina sobre desempeño de las larvas de <i>S. frugiperda</i>	67
3.5 CONCLUSIÓN	69
CAPITULO IV	70
DISCUSION GENERAL	70
4.1 CONTEXTO GENERAL.....	71
4.1.1 "Implicancias de la contaminación ambiental por ozono crónico en la productividad y fenología de la soja"	71
4.1.2 "Exposición crónica al ozono: Interacción entre la soja y la larva de <i>Spodoptera frugiperda</i> - Desafiando las defensas"	73
4.2 CONTRASTE DE LAS HIPÓTESIS.....	76
4.3 ANÁLISIS DE LAS APLICACIONES E IMPLICANCIAS DE LOS RESULTADOS	79
4.3.1 Rol de los compuestos de defensa.....	79

4.3.2 El rol del ozono en las defensas de las larvas	82
4.3.3 El rol del mejoramiento genético en el desarrollo de defensas en la soja:	83
4.3.4 El rol del ozono en las interacciones tritróficas:	83
4.4 PERSPECTIVAS FUTURAS	84
BIBLIOGRAFÍA.....	87

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Foto de <i>Spodoptera frugiperda</i> en su último estadio larval, del ensayo (2021).....	12
Figura 1.2 Distribución actual a nivel mundial de <i>Spodoptera frugiperda</i>	13
Figura 1.3: Esquemática representación de la triple interacción entre la soja, la larva de <i>Spodoptera frugiperda</i> en un ambiente con ozono crónico.....	17
Figura 2.1: Detalle de las seis cámaras que se utilizaron para el ensayo.	31
Figura 2.2. Disposición de las macetas donde se sembraron semillas de soja	31
Figura 2.3 Dispositivo de medición de concentración de O ₃ en las cámaras	32
Figura 2.4: Plantas de soja en las cámaras donde se realizó el experimento.....	32
Figura 2.5: Hojas de soja que presentan daño visible por efecto del ozono crónico.	34
Figura 2.6 Esquema de la duración de las diferentes fases del cultivo en el tiempo, desde la siembra hasta la cosecha.	35
Figura 2.7. Número de plantas de soja en floración	35
Figura 2.8. Biomasa aérea total de soja bajo tratamiento con ozono crónico	36
Figura 3. 1. Distribución de las macetas dentro de las cámaras.....	48
Figura 3.2 A: Dieta artificial de neonatos de <i>Spodoptera frugiperda</i> B. masa de huevos de <i>S. frugiperda</i>	49
Figura 3.3 Detalle de las bolsas de tul que se utilizaron en el tratamiento con herbivoría	52
Figura 3.4 Registro de longitud de las larvas provenientes de ambos tratamientos	53
Figura 3.5 Larvas de <i>S. frugiperda</i> alimentándose de soja	53
Figura 3.6 Material vegetal de soja siendo molido en mortero con nitrógeno líquido	53
Figura 3.7 Supervivencia de neonatos de <i>S. frugiperda</i> , que se alimentaron de trifolios de soja durante una semana en cámaras con ambiente enriquecido con ozono (O ₃) y en cámaras control o (Ambiental). Ensayo Año 2021.	52
Figura 3.8 Supervivencia de neonatos de <i>S. frugiperda</i> , que se alimentaron de trifolios de soja durante una semana en cámaras con ambiente enriquecido con ozono (O ₃) y en cámaras control (Ambiental). Ensayo Año 2022.	56
Figura 3.9: Peso promedio de larvas de <i>S. frugiperda</i> que se alimentaron de trifolios de soja durante una semana en cámaras con ambiente enriquecido con ozono (O ₃) y en cámaras control o (Ambiental). Ensayo Año 2021	57
Figura 3.10 Peso promedio de larvas de <i>S. frugiperda</i> que se alimentaron de trifolios de soja durante una semana en cámaras con ambiente enriquecido con ozono (O ₃) y en cámaras control (Ambiental). Ensayo Año 2022	57
Figura 3.11 Longitud de larvas de neonatos de <i>S. frugiperda</i> , medida en milímetros, que se alimentaron de trifolios de soja durante una semana.....	58
Figura 3.12 Longitud de larvas de neonatos de <i>S. frugiperda</i> , medida en milímetros, que se alimentaron de trifolios de soja durante una semana.....	58
Figura 3.13 Actividad de inhibidores de tripsina en hojas de soja	60
Figura 3.14 Actividad de proteínas Bradford en hojas de soja,	60
Figura 3.15 Actividad enzimática de serin proteasas de extractos digestivos de intestinos de larvas de <i>S. frugiperda</i> que se alimentaron de soja.....	61
Figura 3.16. Isoflavonoide (Genistina) presente en las hojas de soja.....	62
Figura 3.17. Isoflavonoide (Diadzina) presente en las hojas de soja	62

ABREVIATURAS

O₃: ozono

ppb: partes por billón

ROS: especies reactivas de oxígeno

SA: ácido salicílico

JA: ácido jasmónico

IP: inhibidores de proteasas.

N: nitrógeno

POD: peroxidasas

CAT: catalasas

SOD: Superóxido dismutasa.

NO_x: óxido de nitrógeno

RESUMEN

La soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (Fabales: Fabaceae) es uno de los cultivos más relevantes en todo el mundo y particularmente para la Argentina. Fuente de proteínas para la alimentación animal y humana. Sin embargo, se encuentra amenazado por la contaminación de ozono. Este gas de efecto invernadero, ejerce un efecto oxidante que impacta significativamente en los sistemas naturales y en los agroecosistemas. De este modo puede afectar las interacciones de las plantas con los insectos. Se realizaron bioensayos para evaluar el efecto del ozono crónico en la fenología y en el rendimiento de la soja y el impacto en las defensas de la soja y en el desempeño de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Para ello se expusieron plantas de soja a dos concentraciones de ozono: O₃ - (0 ppb) y O₃+ (40-60 ppb), desde estado vegetativo hasta la cosecha, en cámaras de techo abierto. Además, se permitió que larvas de *Spodoptera* se alimentaran de la soja y luego se cosechó el tejido foliar a las 24h y 72h. Se analizaron los cambios en los compuestos fenólicos y en la actividad de los inhibidores de proteasas (IP). Por otro lado, se evaluó la supervivencia de las larvas. La exposición crónica a ozono provocó la anticipación de la floración de la soja en cuatro días y la disminución en el peso de semillas en alrededor de 33 por ciento. Se observó un efecto modulador del ozono en las respuestas frente a herbivoría, ya que recién a las 72 horas los IP duplicaron su concentración, provocando un descenso en la supervivencia de larvas de *Spodoptera* sp. El aumento del ozono troposférico no solo impactó en la producción de soja, sino que interfirió en la fenología y modificó la interacción con las larvas de *Spodoptera frugiperda*.

Palabras clave: cultivo de soja, contaminación ambiental, *Spodoptera frugiperda*, interacción planta-herbívoro.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) (Fabales: Fabaceae) is one of the most relevant crops worldwide and particularly for Argentina. Source of protein for animal and human nutrition. However, it is threatened by ozone pollution. This greenhouse gas exerts an oxidizing effect that significantly impacts natural systems and agroecosystems. In this way it can affect the interactions of plants with insects. Bioassays were carried out to evaluate the effect of chronic ozone on the phenology and yield of soybean and the impact on soybean defenses and the performance of *Spodoptera frugiperda* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). To do this, soybean plants were exposed to two concentrations of ozone: O₃ - (0 ppb) and O₃+ (40-60 ppb), from the vegetative state until harvest. in open roof chambers. In addition, *Spodoptera* larvae were allowed to feed on soybeans and then the leaf tissue was harvested after 24 hours and 72 hours. Changes in phenolic compounds and in the activity of protease inhibitors (PIs) were analyzed. On the other hand, the survival of the larvae was evaluated. Chronic exposure to ozone caused the anticipation of soybean flowering by four days and a decrease in seed weight by around 33 percent. A modulating effect of ozone was observed in the responses to herbivory, since only after 72 hours the PIs doubled their concentration, causing a decrease in the survival of *Spodoptera* sp. larvae. The increase in tropospheric ozone not only impacted soybean production, but also interfered with phenology and modified the interaction with *Spodoptera frugiperda* larvae.

Key words: soybean, environmental pollution, *Spodoptera frugiperda*, plant-herbivore interactions.

CAPITULO I

Introducción general, objetivos e hipótesis

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo de soja (*Glycine max* [L.] Merrill) (Fabales: Fabaceae) es el quinto cultivo más sembrado y la leguminosa más importante en todo el mundo (Kothari et al., 2022). Particularmente en Argentina, representa casi el 20% de las exportaciones totales. Se trata del cultivo que más aumentó su comercialización en nuestro país, al crecer 4.3 Mtn, seguido por el maíz y el trigo (Informe de Comercialización Agrícola, 2019/20). Bajo este contexto, Argentina se ha convertido y consolidado como el tercer productor mundial de soja (FAOSTAT, 2021). Un informe técnico expone que las exportaciones de origen agroindustrial representaron aproximadamente el 70% del total exportado por el país en el año 2020 (INDEC, 2021). La soja y sus derivados representaron en promedio el 24% del valor total de las exportaciones del país entre los años 2003 y 2020. El complejo sojero ocupa el primer lugar, aportando el 27% al total exportado por el sector y alcanzando ventas por un total de 14,8 mil millones de dólares. La mayor parte de la producción de soja se utiliza en la obtención de aceite y harina de extracción para la alimentación del ganado y también para el consumo humano, aumentando su valor económico. Argentina concentra el 40% del comercio internacional de molienda de soja, siendo el actor más importante de ese mercado. A nivel nacional, la soja representa el 81% de la producción agrícola y el 77% del área sembrada durante los últimos años (Bolsa de Rosario, 2021; USDA, 2021, INDEC, 2021).

Todos los cultivos de granos tienen durante su ontogenia un período crítico, en el cual disminuciones en la tasa de crecimiento inciden marcadamente sobre el rendimiento. Durante el período crítico, se maximiza la producción y se define el número de granos. Un período crítico para la determinación del rendimiento en soja se indica alrededor del inicio del cuajado y llenado de semillas, entre las etapas reproductivas R3 y R6 de acuerdo con la escala de Fehr & Caviness, (1977) ; (Kantolic & Slafer, 2007). En las primeras etapas del período reproductivo, la capacidad de producción de semillas puede limitarse si las condiciones ambientales distan de ser óptimas (Kantolic, 2008). En el cultivo de soja, el rendimiento está determinado tanto por la tasa de fotosíntesis como por la disponibilidad de nitrógeno en el suelo (Salvagiotti et al., 2008; Santachiara et al., 2018), a lo largo del ciclo de vida (Kantolic, 2008). Por lo tanto, si se produce una disminución de la fotosíntesis durante el período crítico, impactará directamente en el rendimiento. Sin embargo, puede existir un efecto

compensatorio entre el peso y el número de semillas, siempre y cuando este último no esté aun establecido (Kantolic, 2008 Kantolic et al., 2010). Conforme va avanzando el ciclo del cultivo y precisamente durante el período de llenado, el número de semillas va siendo fijado, la capacidad de compensación frente a eventos de estrés disminuye y, por lo tanto se obtienen menores rendimientos. Si luego de la fase R5 mejoran las condiciones ambientales, el peso de las semillas puede aumentar, pero las compensaciones son parciales y queda determinado un menor rendimiento final (Kantolic, 2008).

Dentro de los factores que pueden afectar el rendimiento de la soja, el ozono troposférico es de extrema relevancia. Las pérdidas económicas ocasionadas por disminuciones en el rendimiento debido al ozono en distintos países del mundo se encuentran cuantificadas. En Estados Unidos, por ejemplo, se produjeron pérdidas de cinco millones de dólares por año (McGrath et al., 2015; Leung et al., 2022). Diferentes estudios plantean pérdidas de rendimientos del orden de 7% al 35% en los cultivos por efectos de contaminación por ozono en distintos países de Asia (Sattar & Islam, 2007; Feng & Kobayashi, 2009; Mao et al., 2017).

Actualmente existe una base de datos conteniendo las observaciones de ozono a nivel global, sin embargo, África, América Central, Sudamérica, centro y sur de Asia, y medio oriente cuentan con poca información al respecto (Harmens et al., 2020). Un estudio de 2022 muestra que desde el año 2012 al 2021 se incrementaron significativamente el número de publicaciones sobre contaminación por ozono, demostrando el creciente interés en la temática por parte de los científicos en los últimos años. Desde los comienzos de la investigación, EE.UU. encabeza la lista, siendo el país con el mayor número de artículos publicados, también se puede mencionar a Canadá, Japón y los países que integran Europa, pero con niveles mucho más moderados. China incrementó sustancialmente el número de publicaciones, ya que la concentración de ozono en muchas de las ciudades de este país se encuentra en aumento. Dentro de los diez principales trabajos de investigación sobre la contaminación por ozono, el área de las ciencias ambientales concentra el mayor número de publicaciones, seguido por publicaciones referentes a la meteorología, las ciencias atmosféricas, la ingeniería ambiental, el medio ambiente público, la salud ocupacional y la toxicología. Asimismo, los temas de investigación se centraron en cómo se forma el ozono y en las concentraciones regionales del mismo. En los últimos años, la motivación en los estudios estuvo dada por las consecuencias para la salud humana y en la generación de

fuentes de ozono. Cambiando el interés de décadas anteriores en las que se estudiaban las propiedades oxidantes del ozono, cómo afectaba a las plantas y sus consecuentes pérdidas en los rendimientos (Hou & Shen, 2022).

En 2017, Cionco et al. estimaron las variaciones a largo plazo del ozono troposférico en cuatro zonas distribuidas de norte a sur de Argentina, Para ello utilizaron 10 años de observaciones satelitales realizadas con el instrumento OMI (Ozone Monitoring Instrument) del satélite de teleobservación terrestre AURA, de la NASA.

Hasta la fecha no se documentan, trabajos que describan relevamientos sistemáticos de ozono en Argentina. Los resultados obtenidos por estos autores arrojaron tendencias lineales positivas, estadísticamente significativas por lo que puede sugerirse que Argentina se encuentra cada vez más inmersa en un escenario global de aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (Cionco et al., 2017).

1.1.1 El ozono troposférico

Dentro del marco del cambio climático, el ozono troposférico es uno de los gases de efecto invernadero que continúa en aumento, principalmente, como consecuencia de las actividades humanas (Grulke & Heath, 2020; Agathokleous et al., 2020; Li et al., 2021). El ozono es un gas que está presente tanto en la estratósfera, en la llamada "capa de ozono" (10-40 km sobre la tierra), como en la troposfera (0-10 km sobre la tierra) (Sattar & Islam, 2007). El ozono en la troposfera es un contaminante secundario, ya que se forma a partir de reacciones fotoquímicas que involucran compuestos primarios como óxidos de nitrógeno (NO_x) y compuestos orgánicos volátiles, de distinto origen tanto natural como antrópico. Por ejemplo, compuestos residuales provenientes de la quema de combustibles fósiles (Archibald et al., 2020; Agathokleous et al., 2020).

Las concentraciones troposféricas de ozono están controladas tanto por las emisiones, como por el clima (Mills et al., 2018; Leung et al., 2022). Son muy dinámicas, dependen de factores temporales, estacionales y espaciales. Su variación es anual y regional, y está influenciada por la localización geográfica y por la proximidad a fuentes de precursores de ozono (Ladányi et al., 2012; Harmens et al., 2020). La concentración es significativamente mayor en el hemisferio norte y menor en el hemisferio sur. Y son más altas en el centro de Europa, este de China y EE. UU (Saxena et al., 2019). El ozono troposférico se caracteriza por su transporte a grandes distancias,

desde áreas urbanas a rurales y desde un continente a otro. Su vida media mundial se estima en unos 25 días, facilitando su transferencia no solo a escala regional sino también intercontinental. Así por ejemplo se cita que el nitrato de peroxiacetilo, que es un reservorio importante de NO_x (precursor de ozono), se puede transportar a una distancia intercontinental, por lo que es muy relevante considerar que se puede producir ozono lejos de su fuente (Dewan & Lakhani, 2022; Singh et al., 2022). Su formación y persistencia se asocia a condiciones de altas temperaturas y ambiente seco, intensificando así sus efectos durante condiciones de sequía y olas de calor. Se pronostica que en los próximos años la ocurrencia de olas de calor, aumento de temperatura y episodios de sequías extremas serán cada vez más frecuentes y esto conduciría a un aumento de su concentración superando en algunas regiones del planeta, el umbral aceptado para la salud (40 ppb AOT.) (Wu et al., 2008; Ainsworth et al., 2019). Las concentraciones suelen alcanzar su punto máximo pasado el mediodía y en el comienzo de la tarde en los veranos, coincidente con niveles altos de [NO_x] y luz solar, y varían en cada estación del año. En los meses de invierno las concentraciones son bajas. Además, la deposición de ozono varía con la cobertura vegetal en la superficie terrestre (Hardacre et al., 2015). Los pastizales, las tierras agrícolas y los bosques caducifolios tienden a mostrar mayores flujos de ozono y tasas de deposición anual que la tundra y los bosques de coníferas (Ainsworth et al., 2019).

1.1.2 Efectos del ozono troposférico sobre los componentes bióticos

Entre los gases contaminantes, el ozono es el más importante por su poder oxidante. Su forma de interacción con las plantas se puede describir en tres etapas: en primer lugar, se desplaza por la capa límite de la hoja, para en la segunda etapa ingresar al mesófilo principalmente por los estomas. En el apoplasto se producen diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), superóxido (O₂⁻), radicales hidroxilo[•] (HO[•]) y radicales peroxi (HO₂[•]) (Agrawal et al., 2001). Finalmente, se produce un proceso de desintoxicación y reparación por parte de la planta. Sin embargo, las plantas tienen capacidad limitada para detoxificar los ROS, lo hacen por la vía no enzimática (ac. ascórbico, flavonoides, fenólicos) o por la vía enzimática a través de la SOD (superóxido dismutasa), la CAT (catalasa) y POD (peroxidasas). Estas reacciones iniciales son críticas para reducir las concentraciones de los productos de degradación oxidativa del ozono (Agrawal et al., 2001). Los ROS en

bajas concentraciones, actúan como señales de defensa, cumplen una función fundamental en el cierre de estomas, responden al estrés ambiental modificando la actividad de proteínas y la expresión génica, pero a altas concentraciones actúan como un potente agente oxidante y entonces pueden causar muerte celular ya sea por su toxicidad o través de la activación de una cascada de señales que desencadena la muerte celular programada (Supriya et al., 2018). El ozono oxida la membrana tilacoidal de los cloroplastos, también produce un descenso de la proteína rubisco, de los pigmentos y del contenido de nitrógeno. Degrada la clorofila, produciendo clorosis y senescencia temprana (Papazian et al., 2016). Al mismo tiempo que se incrementa la respiración y provoca un cambio en el balance de antioxidantes (Long & Naidu, 2002; Ainsworth, 2017). Entonces pueden aparecer síntomas visibles del efecto del ozono en las hojas, de acuerdo con la especie y el cultivar, y según el tipo y duración de la exposición. Por lo tanto, altas concentraciones ambientales de ozono causan disminución en las tasas fotosintéticas, y en el crecimiento de las plantas (Sandermann Jr, 1996; Long & Naidu, 2002; Morgan et al., 2003). Ya que produce daño oxidativo impactando negativamente en el rendimiento de muchos cultivos (Hauglustaine & Brasseur, 2001; Ashmore, 2005; Booker & Fiscus, 2005; Burkey, 2005; Fuhrer, 2009; Monks et al., 2015; Montes et al., 2021). En la naturaleza pueden diferenciarse dos maneras de exposición a ozono, una episódica y otra crónica. La exposición episódica o aguda se produce cuando las plantas están expuestas a altas concentraciones de ozono por periodos cortos de tiempo. Está bien caracterizada y se asemeja a las respuestas de la planta ante el ataque de patógenos. El ozono puede provocar lesiones visibles en las hojas, como punteado, moteado, decoloración de la superficie, necrosis bifacial, senescencia prematura y pigmentación en las plantas de hojas anchas y en las coníferas: bandas cloróticas, puntas quemadas, manchas, moteado clorótico y/o senescencia prematura de sus hojas (Singh et al., 2022). Por el contrario, los mecanismos que conducen al daño crónico por ozono no están tan claramente caracterizados, pero los síntomas fisiológicos incluyen: disminución de la fotosíntesis, disminución de la actividad de la rubisco, menor conductancia estomática, clorosis foliar, senescencia acelerada, disminución del área foliar, resultando así en una menor productividad y disminución de los rendimientos de los cultivos (Gillespie et al., 2011; Emberson et al., 2018; Mills et al., 2018).

De los trabajos científicos que estudiaron el efecto del ozono troposférico en el cultivo de soja, revisados por Li et al., (2021), se establece que son pocos los estudios que refieren al efecto crónico. En este contexto, se reconoce que es muy necesario

caracterizar el efecto del ozono en la fenología del cultivo. Además, se considera necesario volver a evaluar el impacto del ozono crónico en el crecimiento, la fisiología, las defensas de la soja y en su rendimiento en un escenario dinámico con aumento de las emisiones de gases contaminantes. Resulta importante describir el efecto del ozono crónico sobre la productividad de la soja, uno de los cultivos más importantes de Argentina y del mundo. (Archibald et al., 2020).

1.1.3. Interacción planta–insecto

Para defenderse del ataque de herbívoros, las plantas ponen en marcha un sistema de defensa, sofisticado y eficaz (Austin & Ballare, 2014). Durante gran parte del siglo XX, los estudios sobre plantas se enfocaron en explicar cómo respondían las plantas a distintos factores abióticos, como agua, nutrientes y luz. Sin embargo, en las últimas dos décadas se incorporaron al estudio los componentes bióticos del ambiente, incluyendo la interacción con otras plantas, con animales consumidores, detritívoros, polinizadores, benéficos y microorganismos patógenos. Este avance permitió comprender la evolución en la adaptación por parte de las plantas, los mecanismos moleculares que median la plasticidad fenotípica en escenarios bióticos complejos, y cómo finalmente estas interacciones influyen en el ecosistema. La investigación se centró en el estudio de la interacción de las plantas con patógenos y herbívoros ya que resulta de interés para la actividad agronómica (Austin & Ballare, 2014). Por lo tanto, comprender los mecanismos moleculares que intervienen en esa intrincada coevolución entre plantas e insectos es muy valioso (Barbero & Maffei, 2023). Un punto muy importante que pudo conocerse a través de las investigaciones es que participan frecuentemente, dos hormonas claves, modulando la interacción de las plantas con los insectos. Y estas son el ácido salicílico y el ácido jasmónico. El ácido jasmónico participa en la defensa contra herbívoros y muchos patógenos. La interacción entre la molécula que interviene y la vía de señalización es de interés en la actualidad. Y se piensa que la planta se basa en ese mecanismo para responder mejor a múltiples factores, tanto bióticos como abióticos a los que se somete en el ambiente donde crece (Austin & Ballare, 2014).

Las plantas y los insectos conviven en esta tierra desde hace más de 400 millones de años. En todos los niveles tróficos se producen interacciones. Algunas de las interacciones son beneficiosas para ambos seres vivos, como, por ejemplo, la

polinización. Sin embargo, en otras la planta es consumida por los insectos por lo tanto esta tiene que defenderse. Como la planta es un ser sin posibilidad de escapar físicamente a un ataque por parte de un herbívoro o patógeno, emplea diversas líneas de defensa. Las plantas censan rápidamente los peligros, lo que les permite por ejemplo distinguir la herbivoría de un daño mecánico. Son capaces de reconocer señales a través de los compuestos químicos de las secreciones bucales del insecto. Luego identifican el ataque y entonces producen compuestos en respuesta a esa interacción y activan una serie de compuestos de defensa (Zavala, 2010; Giacometti et al., 2016).

Ciertos componentes estructurales de la planta actúan como una barrera física (pelos, tricomas, espinas y hojas más gruesas). También se producen compuestos químicos (metabolitos secundarios y proteínas), con el propósito de ocasionar un efecto tóxico, repelente o antinutricional sobre el insecto (Fürstenberg-Hägg et al., 2013). La planta despliega una serie de mecanismos de resistencia ante el ataque de insectos para evitar o tolerar la herbivoría (Schoonhoven, 2005; Peruca et al., 2018; Romero et al., 2020). Las defensas físicas son la primera línea de defensa y juegan un rol fundamental en la resistencia de la planta frente al ataque de un insecto. Constituyen la barrera primaria contra el ataque del herbívoro. Sin embargo, si el insecto se instala en la planta, esta puede generar metabolitos químicos como segunda barrera de defensa (Hanley et al., 2007).

Los mecanismos de resistencia de las plantas frente a insectos pueden describirse como: antixenosis, involucra factores morfológicos (ej. pubescencia de las hojas y vainas en la soja) como químicos que afectan el comportamiento del insecto para evitar la oviposición, la colonización o la alimentación. Por otro lado, la antibiosis implica un efecto negativo en el crecimiento o reproducción (reducción en la longitud y el peso, reducción de fecundidad, fertilidad, etc.) después que el insecto se alimenta de la planta. Esto es consecuencia de la producción de metabolitos secundarios y proteínas de defensa por parte del vegetal. Por último, la tolerancia se relaciona con la habilidad de una planta para mantenerse o recuperarse del daño ocasionado por el insecto, sin afectar significativamente el rendimiento.

Las plantas pueden enfrentar al herbívoro de dos maneras, a través de defensas directas, provocando que sus tejidos sean poco preferidos o menos palatables, o bien por medio de defensas indirectas. Estas últimas resultan en la liberación de compuestos orgánicos volátiles para atraer a los enemigos naturales, parásitos, parasitoides y depredadores de los herbívoros (Dicke, 1998). Como ejemplo de defensas directas se

puede citar la protección física de la superficie vegetal (tricomas, espinas y el grosor de la hoja) o bien pueden afectar la biología del insecto por la producción de compuestos tóxicos (terpenoides, alcaloides, fenólicos, etc). Estas últimas pueden retrasar el crecimiento del insecto o directamente matarlo. Ambos mecanismos de defensa (directos e indirectos), se pueden presentar de manera constitutiva o ser inducidos por el daño ocasionado por el herbívoro (Karban, 2008).

Las defensas químicas directas, generan un cambio en la susceptibilidad de la planta huésped ante el ataque del insecto, y pueden ser:

- * producción de metabolitos secundarios (terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados),
- * inhibidores de enzimas digestivas,
- * Lecitinas,
- * enzimas antinutricionales (que pueden degradar los aminoácidos libres del intestino de los insectos removiendo nutrientes del herbívoro),
- * enzimas antinutritivas que catalizan la oxidación de fenoles a quinonas reduciendo el valor nutritivo de la planta huésped atacada.
- * lipoxigenasas (involucradas en la biosíntesis de hormonas de las plantas tales como el ácido jasmónico (JA),
- * peroxidasas (generan especies reactivas de oxígeno que regulan la transducción de señales relacionadas con la defensa y refuerzan las paredes celulares a través de la lignificación) (Bailey et al., 2019).

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos restringidos a ciertos grupos de plantas que entre otras funciones se les atribuyen defensas ante el ataque de herbívoros. Algunos autores consideran que los mismos intervienen también en la respuesta frente a factores ambientales como la deficiencia nutricional en el suelo, la sequía y la radiación ultravioleta, entre otros. Estos compuestos son mayoritariamente producidos a partir de precursores universales como diversos aminoácidos, el ácido shikímico y el acetil-coenzima A (Mohamed et al., 2021).

La síntesis de metabolitos secundarios está regulada por distintas fitohormonas, como el ácido salicílico (SA), el JA y el etileno (cuyo precursor es el ACC o 1-aminociclopropano-1-carboxilato), que pueden ser combinadas de manera diferencial para obtener una respuesta específica frente a cada estímulo. El JA y sus compuestos derivados, conocidos como jasmonatos, son indicadores del daño tisular y provocan la

activación de respuestas de defensa contra una gran variedad de insectos herbívoros. Estas respuestas incluyen la síntesis del ácido metil-jasmónico (MeJA, volátil), la formación de jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) así como de otros conjugados (JACs) y enzimas. La hormona puede actuar sinérgicamente con el etileno, aumentando los niveles de respuesta de las plantas frente al ataque de insectos. Cuando Howe & Jander, (2008) trabajaron con plantas mutantes del gen CO11, que interviene en la ruta de señalización del ácido jasmónico, observaron que los mutantes resultaron ser muy susceptibles al ataque de distintos artrópodos, permitiendo concluir que los jasmonatos tienen un papel central en la regulación de las respuestas de defensa contra la herbivoría. La tercera hormona que participa en las respuestas inmunológicas de las plantas es el SA, que en general regula la inducción de defensas relacionadas con el ataque de patógenos y de algunos insectos picadores, como los áfidos. Es interesante destacar que el SA actúa en forma antagónica con el JA, la inducción del SA disminuye la acumulación de JA. La importancia de estas hormonas se pone en evidencia en el trabajo de (Selig et al., 2016), quienes evaluaron el desarrollo de poblaciones de trips en plantas de soja tratadas con las fitohormonas SA y MeJA (precursor disponible comercialmente del JA). Este trabajo demuestra que la aplicación de MeJA provoca una disminución del 47% del tamaño poblacional de los trips, el efecto antagonista del SA con el JA al aplicarlos conjuntamente, y no descartan que el etileno también podría estar involucrado en las respuestas comportamentales registradas (Howe & Jander, 2008; Selig et al., 2016).

Los compuestos fenólicos pueden clasificarse en fenólicos simples o complejos. Dentro de los simples se encuentran los fenilpropanoides lactonas y derivados de ácido benzoico. Los fenólicos complejos están constituidos por las flavonas, flavonoles, isoflavonoles, antocianinas, ligninas y taninos. Está documentado que cuando una planta es dañada por un insecto, los niveles de compuestos fenólicos aumentan. Los compuestos fenólicos, como el ácido clorogénico pueden oxidarse en el tracto digestivo de insectos y transformarse en quinonas, y causar estrés oxidativo en larvas, pero otros como los carotenoides, funcionan como antioxidantes. Estos compuestos son potencialmente beneficiosos para los insectos que necesitan reducir el daño oxidativo, especialmente durante los períodos de estrés. Aumentan en gran proporción en comparación a una planta sana. A su vez estos valores serán mayores en el caso que el insecto posea aparato bucal masticador (ej. oruga de lepidópteros) comparado con uno de aparato bucal picador (pulgones) según muestran los resultados

de (Wallis & Galarneau, 2020) en su estudio. Además, tienen distintas funciones en las plantas, en el crecimiento, el desarrollo y en la reproducción. Los compuestos fenólicos participan en la defensa frente a herbívoros, y también participan en la defensa frente a estresores del ambiente (ej. protección UV), reforzando el sistema antioxidante enzimático endógeno celular, como también ayudando a eliminar especies reactivas de oxígeno (Król-Grzymała & Amarowicz, 2020).

Dentro de los compuestos nitrogenados podemos nombrar a los compuestos cianogénicos, los glucosinolatos, los alcaloides y las proteínas de defensa. El daño producido por un herbívoro puede activar la expresión de una batería de proteínas de defensa que ejercen un efecto directo sobre el insecto. Esto incluye, inhibidores de proteasas (IP) del tracto digestivo del insecto, y otras proteínas que intervienen negativamente en la fisiología y anatomía digestiva. Se pueden citar como ejemplo a ciertas proteínas: Las arginasas, las ascorbato oxidasas, las lipoxigenasas, las polifenol oxidasas y las peroxidasas, que pueden tener propiedades anti-nutricionales. Mientras que otras, como las quitinasas, cisteína proteasas, lectinas y leucina aminopeptidasas, pueden resultar tóxicas para el animal. La inhibición de proteasas genera una deficiencia de aminoácidos que afecta el crecimiento y desarrollo del herbívoro. Otras proteínas como las cistein-proteasas y las quitinasas interactúan con el epitelio del tracto digestivo produciendo un daño irreversible (Lawrence & Novak, 2006).

1.1.3.1 Interacción soja – *Spodoptera frugiperda*

El cultivo de soja, durante todo su ciclo, interactúa con factores tanto abióticos como bióticos. En la sección anterior se describieron los efectos del ozono como factor abiótico, pero también este cultivo es atacado por plagas de insectos, que ocasionan pérdidas en el rendimiento. Una de las plagas típicas que ataca a la soja y otros cultivos en toda América, son las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), comúnmente llamada gusano cogollero u oruga militar (Barros et al., 2010; Formentini et al., 2015; Dias Peruca et al., 2018). Es un insecto holometábolo que pasa por cuatro estados, huevo-larva-pupa y adulto. En su fase larval, puede presentar 6 estadios larvales. Siendo los últimos los más voraces.

La larva puede alimentarse de extensa cantidad de cultivos, incluido la soja, debido a su plasticidad. Sin embargo, tiene preferencia por la poáceas. En su estado adulto es una polilla nocturna. Vulgarmente lo denominan gusano cogollero del maíz u oruga militar tardía ya que, si el alimento se hace escaso, las larvas se trasladan a otros

cultivos desplazándose en masa como un “regimiento”. Se describió por primera vez en 1797 a partir de especímenes recolectados en Georgia, Estados Unidos. Boisduval & Guenée lo renombraron como *Laphygma macra* en 1852, y Zimmerman finalmente lo sinonimizó como *Spodoptera* en 1958 (Rizzo & Rossa, 1993.; Romero et al., 2020; Sataral et al., 2023).

La larva del género *Spodoptera*, es generalista y originaria de América, por lo que fue considerada plaga de maíz en América del norte (EE. UU), ya que es su cultivo de preferencia. Sin embargo, en la actualidad se alimenta de más de 180 especies de cultivos. *S. frugiperda* puede alimentarse de muchas especies de plantas, incluyendo maíz, algodón y soja. Se distribuyen por el mundo, principalmente en áreas tropicales y subtropicales. Es considerada una plaga primaria por el alto nivel de defoliación que produce en los cultivos con su aparato bucal masticador (Sa et al., 2009). Como un herbívoro polífago, *S. frugiperda* se beneficia de la rotación de cultivo y del sistema de doble cultivo (trigo-soja), aumentando el riesgo de brote epidémico y pérdidas económicas debido a las altas tasas de supervivencia en dichos cultivos (Barros et al., 2010).



Figura 1.1 *Spodoptera frugiperda* en su último estadio larval, del ensayo (2021).

Se citan hasta alrededor de 186 hospederos repartidos en 42 familias de plantas. El 35,5% pertenece a la familia Poaceae, el 11,3% a la familia Fabaceae, y 4,3 % a las familias Solanaceae y Asteraceae, siguiéndoles las Rosaceae y Chenopodiaceae y finalmente las Brassicaceae y Cyperaceae. En Argentina, las especies más citadas fueron (en orden decreciente): maíz, soja, algodón, alfalfa, tomate, lino, papa y sorgo. *S. frugiperda* puede alimentarse de distintos órganos de la planta, dependiendo del

huésped y el estado ontogénico de este. Es muy versátil en su alimentación pudiendo comportarse como defoliadora, cogollera, cortadora, granívora. Se reportó, para diferentes provincias de Argentina, que puede actuar como perforadora y barrenadora en maíces no Bt, (Juárez et al., 2010). Actualmente se encuentra distribuida en todas las regiones agrícolas del mundo, su distribución es amplia a lo largo de toda América, desde el sureste de Canadá hasta Argentina. Puede localizarse en regiones tropicales como en zonas templadas (Firake & Behere, 2020)(Figura 1.2). *S. frugiperda* no sobrevive a los fríos invernales dado que carece de mecanismos de diapausa (Juárez et al., 2010). En los últimos años fue colonizando nuevas zonas y desde 2016 fue reportada en África, Asia y Australia. Por lo que se volvió de distribución global, causando importantes pérdidas económicas. Se documentaron pérdidas de 8,3-20,6 millones de toneladas por año (Hruska, 2019; Sataral et al., 2023). En Brasil dejó de ser una plaga secundaria para tener mayor importancia en los cultivos de verano como la soja (de Araújo et al., 2023).

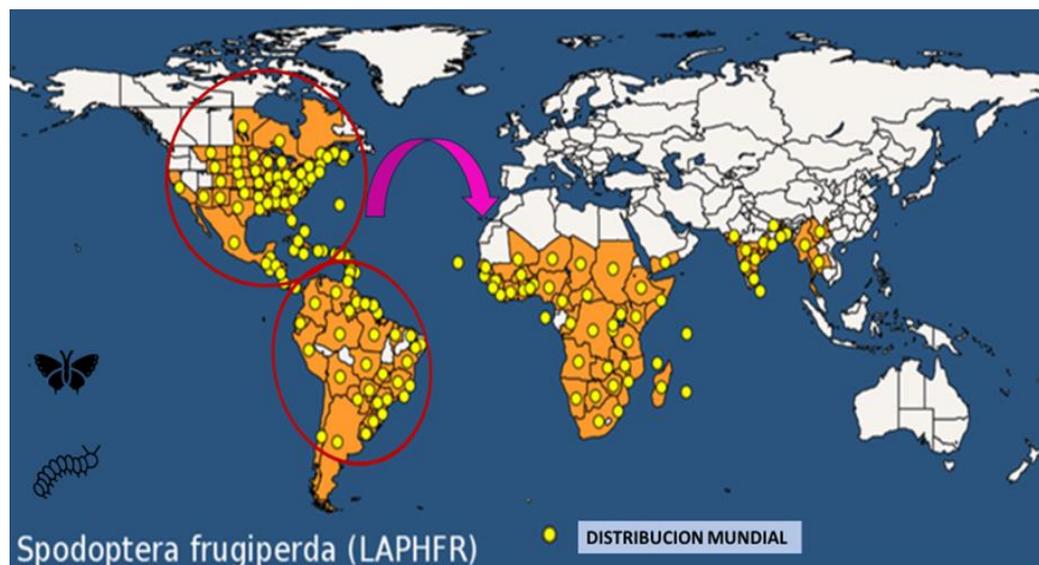


Figura 1.2 Distribución actual a nivel mundial de *Spodoptera frugiperda* (puntos amarillos). Origen occidental del insecto se muestra con (círculos rojos). EPPO Global Database. Adaptado de Chiara Rosace et al., (2019).

Durante el ciclo de vida, las hembras pueden oviponer un promedio de $1.044 \pm 391,8$ huevos, la forma de postura es en masas que promedian los 100 a 150 huevos cada una. Las posturas están cubiertas por hilos de seda y escamas de coloración grisácea. Los huevos son esféricos, blanquecinos, estriados, de 0,5 mm de diámetro. El período larval dura un promedio de 25 días, pasando generalmente por seis estadios larvales. En la figura 1.1 puede verse la larva de último estadio. Empupan debajo del

suelo en los primeros centímetros, donde forman una cámara pupal, en la cual permanecen por 10 días aproximadamente, para posteriormente emerger como adultos. El período comprendido entre que nace y se convierte en adulto, dura aproximadamente entre 35 y 40 días dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad. En un estudio realizado en 1993 en Argentina, se caracterizó a las larvas como de comportamiento caníbal, a partir del tercer estadio, cualquiera sea el tipo de alimento y la cantidad de larvas confinadas, la supervivencia se veía disminuída (Rizzo & Rossa, 1993).

Los insectos se alimentan de las plantas buscando cubrir sus requerimientos nutritivos. Las plantas les proveen de ciertos nutrientes para crecer, desarrollarse y reproducirse. Otros componentes son sintetizados por el mismo insecto, y otras veces como ciertos aminoácidos (arginina, lisina, metionina) deben ser incorporados a través de la dieta como ocurre en humanos (Chen, M.S. 2008). También puede ocurrir que otros microorganismos contribuyan a su nutrición (ej. los que están en su tracto digestivo; simbiosis). En ocasiones cuando el alimento no es de calidad para satisfacer sus requerimientos, ingiere y procesa cantidades excesivas de alimentos con el fin de obtener suficiente cantidad de un determinado componente que está presente sólo en bajas concentraciones en la dieta. Junto con estos componentes alimentarios pueden ingerirse otros que pueden resultar tóxicos para el insecto. En ciertas ocasiones los nutrientes de la dieta pueden interactuar con otros químicos. Por ejemplo, los fenólicos de las hojas, pueden provocar menor digestibilidad de las proteínas en orugas de lepidópteros (Saleem et al., 2001).

Los insectos realizan la digestión del alimento, a través de una transformación química de moléculas grandes en otras más pequeñas, para entonces ser absorbidas. La digestión está mediada por enzimas (proteinasas, lipasas, carbohidrasas). Las endopeptidasas se encargan de la digestión de proteínas, rompiendo los enlaces peptídicos dentro de la proteína, y las exopeptidasas, que eliminan los aminoácidos terminales de la molécula. Se identificaron tres tipos de endoproteasas en insectos: las serin proteasas (tripsina y quimotripsina), que tienen serina en el sitio activo; cisteína (tiol) proteasas (incluida la Familias B y L de catepsinas), con residuos de cisteína en el sitio activo; y proteasas aspárticas (carboxilo) con residuos de aspartato en los sitios activos. Las larvas de lepidópteros suelen tener serin proteasas, especialmente tripsinas y quimotripsinas, que tienen un pH alto como óptimo (Zhu-Salzman & Zeng, 2014).

1.1.4. Triple interacción: cultivo-ozono-herbívoro

En un escenario de cambio climático, existe un interés creciente por conocer las respuestas de los cultivos ante múltiples factores de estrés. Se encontraron evidencias de que la exposición a un estrés abiótico puede predisponer a las plantas a una mayor tolerancia ante una situación de estrés abiótico posterior (Gillespie et al., 2011). Se estudió bastante sobre cómo interactúan los factores abióticos en la planta, sin embargo, no se conoce bien cómo responden los cultivos luego de dos factores de estrés consecutivos. La convergencia de respuestas del cultivo frente a herbivoría y a exposición crónica al ozono no permanece estable. Por ejemplo, en un estudio con ozono y herbivoría cuando se analizaron como afectan los procesos primarios, tales como el metabolismo de los aminoácidos y de los carbohidratos, mostraron patrones opuestos de regulación entre el ozono y la herbivoría (Papazian et al., 2016).

El estrés ambiental originado por la contaminación del aire puede interferir en las interacciones tróficas. En especial, el ozono podría tener efectos adversos tanto en forma directa como indirecta, provocando cambios bioquímicos que modifican el valor nutricional de ciertos tejidos y también cambios en la composición fenólica (Booker & Miller, 1998; Booker & Fiscus, 2005). Modificando las defensas de las plantas frente a herbívoros (Cotrozzi et al., 2021). Por lo tanto, se proponen dos escenarios futuros alternativos: las plantas serán más vulnerables o bien las plantas serán más resistentes frente a la herbivoría.

Se conoce como responden las plantas cuando son dañadas por insectos herbívoros y por otro lado está documentado en trabajos científicos los cambios producidos por la contaminación de ozono ambiental en las plantas. Aun así, se conoce muy poco acerca de cómo la combinación de estos factores puede impactar en los rendimientos de los cultivos. El ozono reduce el desarrollo y la expansión de hojas nuevas provocando la acumulación de carbohidratos y la disminución de nitrógeno (N) en las hojas más viejas (Jøndrup et al., 2002), lo que disminuye su palatabilidad. El ozono elevado podría provocar cambios en los carbohidratos de las hojas, alterando la calidad nutricional de la planta (Mishra et al., 2015). Por otro lado, el ozono elevado disminuyó el crecimiento de larvas de *E. autumnata* jóvenes a través de reducciones en la calidad de los tejidos vegetales, debido a cambios en la partición de fotoasimilados como el N (Peltonen et al., 2010). Sin embargo, en otros estudios el ozono no tuvo efectos en el contenido de N, por lo que no modificó el ataque de los herbívoros. En

otros estudios, soja cultivada en ambientes ricos en ozono no mostraron modificaciones en la susceptibilidad frente a la herbivoría producida por coleópteros (Hamilton et al., 2005). Cabe destacar que este tipo de resultado es variable dependiendo de la concentración de ozono, de la especie de insecto y de planta. En un ensayo del año 2001 observaron la activación de la vía de los fenilpropanoides en plantas cultivadas con alto ozono ambiental, y un aumento de los flavonoides (Paolacci et al., 2001). El ozono induce cambios en los compuestos fenólicos vinculados con la mayor demanda de energía y consecuente aumento en la respiración de plantas. La inducción de fenólicos antioxidantes como la quercetina podría incrementar la resistencia a estrés por ozono (Saleem et al., 2001). Por lo tanto, las hojas de las plantas sometidas a ozono tienen una respuesta física y fisiológica, que afecta a los herbívoros que se alimentan de ellas. Sin embargo, ciertas larvas defoliadoras son capaces de detoxificar los compuestos fenólicos, pero depende del estadio o de la especie de insecto. La información acerca de los efectos sobre los insectos masticadores es contradictoria. Algunos trabajos muestran un aumento, otros una disminución y otros muestran que no se observan cambios en el crecimiento de los insectos (Peltonen et al., 2010).

Si bien, se ha avanzado mucho en el estudio de los mecanismos fisiológicos específicos que despliegan las plantas para contrarrestar los efectos del ozono, como por ejemplo el sistema antioxidante en soja (Li et al., 2021), todavía falta mucho por conocer sobre las interacciones en las comunidades y agroecosistemas (Agathokleous et al., 2020). En la revisión bibliografía no se encontraron publicaciones que hayan abordado la interacción del cultivo de soja y la herbivoría por larvas de *Spodoptera* sp. bajo efectos de ozono ambiental, por lo que motivó la realización de este trabajo

1.1.4.1. Interacción ozono y herbivoría

Es importante destacar que existen puntos en común entre las vías de señalización inducidas, a nivel de transcripción, en respuesta a altas concentraciones de ozono y a la herbivoría (Ellis et al., 2002; Tamaoki et al., 2003; Van Wees et al., 2003; Zhu-Salzman et al., 2004; Thompson & Goggin, 2006). La soja produce una respuesta transcripcional similar frente al daño por insectos masticadores y por la exposición a ozono, aumentando la producción de metabolitos secundarios relacionados con la defensa como los compuestos fenólicos (Casteel et al., 2008). En hojas de soja se ha informado que *lox 7* y *lox 8* están involucradas en la inducción de la síntesis de JA por

daño mecánico y por el daño de coleópteros (Zavala et al., 2008). A su vez el JA regula la expresión de genes relacionados con la síntesis de compuestos fenólicos, como isoflavonoides. Los genes más importantes en las hojas de soja que regulan la expresión de las enzimas pertenecientes al paso metabólico de los fenilpropanoides son las pofeniloxidasas (*ppo*) chalcona sintasa (*chs7* y *8*), isoflavona sintasa (*iss2*), fenil amonia liasa (*pal*) (Dillon, 2017). En la (figura 1.3) se proponen algunas respuestas de la planta y del herbívoro que pueden cambiar con la presencia de ozono crónico.

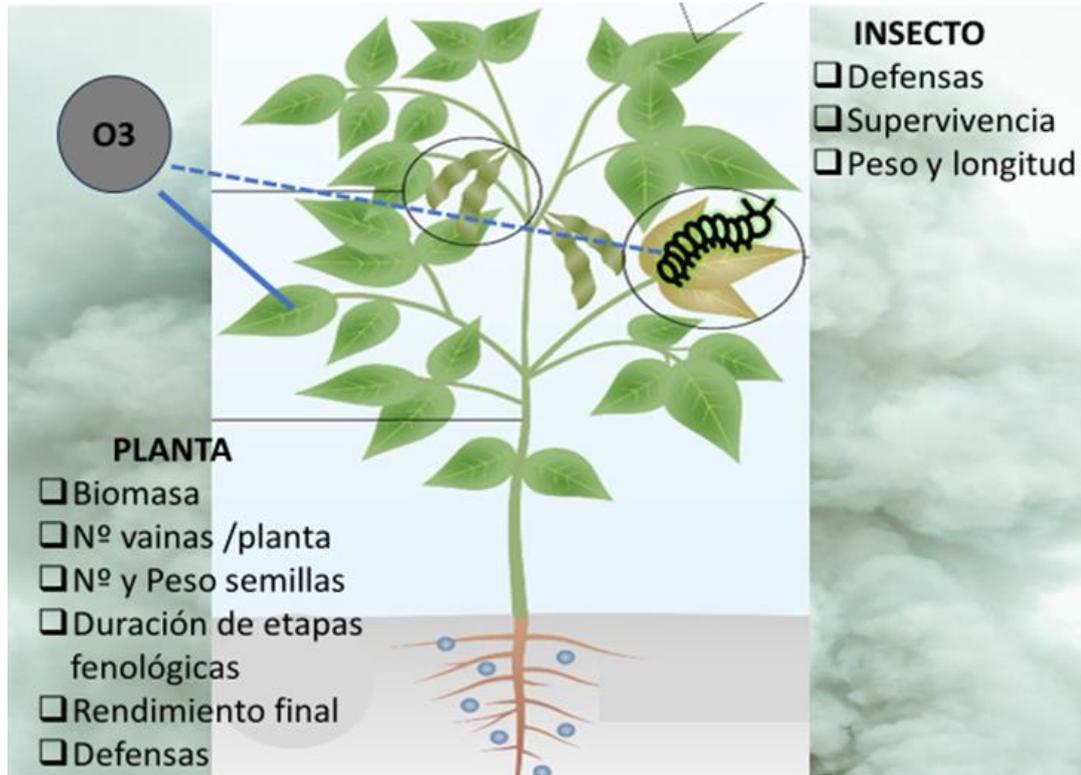


Figura 1.3: Esquema representativo de la triple interacción entre el cultivo de soja, la larva *Spodoptera frugiperda* en un ambiente con ozono crónico. Variables de la planta y del herbívoro que fueron medidas en esta tesis.

1.2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general:

Estudiar la interacción de la soja, frente a herbivoría por *Spodoptera frugiperda* en un ambiente oxidante generado por las altas concentraciones de ozono troposférico.

Objetivos particulares:

- * Evaluar el efecto del O₃ crónico sobre el rendimiento y la fenología de la soja (Capítulo 2).
- * Determinar la producción de defensas contra los herbívoros en hojas de soja cultivada con altos niveles de O₃ troposférico y evaluar el efecto en el desempeño de los herbívoros (Capítulo 3)

Según el marco teórico desarrollado y a partir de los objetivos se plantearon las siguientes hipótesis:

1.2.2 Hipótesis

Hipótesis 1) Las altas concentraciones de O₃ ambiental provocan un estrés oxidativo que resulta en una disminución del rendimiento del cultivo de soja. (Capítulo 2)

- * **Predicción 1A)** Altas concentraciones de O₃ ambiental crónico disminuirán la biomasa aérea de las plantas de soja.
- * **Predicción 1B)** Altas concentraciones de O₃ ambiental crónico disminuirán el peso de semillas y el peso de vainas.
- * **Predicción 1C)** Altas concentraciones de O₃ ambiental crónico disminuirán el número de semillas y el número de vainas.

Hipótesis 2) Las altas concentraciones de O₃ ambiental crónico provocan cambios en la fenología del cultivo de soja. (Capítulo 2)

- * **Predicción 2A)** Altas concentraciones de O₃ ambiental crónico acelerarán el comienzo de la floración en soja.

Hipótesis 3) Las altas concentraciones de O₃ ambiental crónico tienen un efecto acumulativo en las plantas que provoca la disminución en los compuestos de defensa. Esto se evidencia en el estadio V4. (Capítulo 3)

- * **Predicción 3A)** las altas concentraciones de O₃ ambiental disminuirán los niveles de inhibidores de proteasas en las hojas.
- * **Predicción 3B)** las altas concentraciones de O₃ ambiental crónico aumentarán la concentración de compuestos fenólicos, como los flavonoides.
- * **Predicción 3C)** las altas concentraciones de O₃ ambiental, en combinación con la herbivoría de larvas de *Spodoptera* por 72h inducen menos niveles de compuestos defensivos en las hojas respecto del control inducido por herbivoría y con niveles de O₃ ambiental.

Hipótesis 4) Altos niveles de O₃ tienen un impacto negativo en el crecimiento y desarrollo de larvas de *S. frugiperda* porque disminuye la calidad nutricional de sus hojas (Capítulo 3).

- * **Predicción 4A)** las altas concentraciones de O₃ ambiental disminuirá la supervivencia, el peso y longitud de las larvas herbívoras.
- * **Predicción 4B)** la exposición a altas concentraciones de O₃ ambiental aumentará la actividad de tripsina en el intestino.

CAPITULO II

El cultivo de soja y la reducción del rendimiento bajo contaminación por ozono crónico.

2.1 INTRODUCCIÓN

La obtención de rendimientos óptimos en el cultivo de soja depende en gran medida de las condiciones ambientales durante su ciclo de vida. Las fases de floración, fructificación y llenado de semillas son determinantes para el rendimiento y se consideran el periodo crítico en el desarrollo del cultivo. La plasticidad de la soja permite que los efectos negativos sufridos en las etapas tempranas sean compensados con un aumento en el peso de las semillas en etapas posteriores (Kantolic et al., 2010). En consecuencia, la sincronización adecuada entre la ontogenia de la soja y las condiciones ambientales es esencial para evitar la coincidencia de factores desfavorables con las fases críticas para el rendimiento (Kantolic, 2008).

La relación directa entre el número de vainas, semillas y el rendimiento final de la soja es crucial. Los factores abióticos que impactan negativamente en la fotosíntesis después de la floración influyen en el rendimiento en términos de cantidad de vainas y semillas por unidad de superficie. Es notable que las fases posteriores a la floración, en lugar de las fases vegetativas, tienen una influencia más significativa en el rendimiento, como evidenciaron estudios de fisiología de la soja realizados por Denis Egli (Egli, D. 1993). En estos estudios se resalta, que las etapas de crecimiento previas no resultan críticas para la definición del rendimiento. Las reducciones en el crecimiento durante el periodo crítico ejercen un impacto marcado en el rendimiento (Kantolic, 2008). Los factores abióticos, como el fotoperíodo y la temperatura, regulan la duración de las etapas previas y posteriores a la floración (Kantolic & Slafer, 2007). No obstante, el efecto del ozono, otro factor de estrés abiótico, en la duración de las etapas de desarrollo de la soja, aún es poco comprendido. Este capítulo aborda precisamente este tema.

2.1.1 La soja en Argentina

Argentina es el tercer productor de soja a nivel mundial (FAO, 2021). Por muchos años la producción de soja en Argentina se concentró en aumentar el área sembrada, sin embargo, en los últimos años hubo un cambio de objetivos, centrándose en mejorar la eficiencia productiva, de la mano del mejoramiento genético y la aplicación de tecnologías innovadoras como medio para alcanzar mayores rendimientos (Satorre & Andrade, 2021; Kahlon & Board, 2017). En la temporada 2021/22, la producción alcanzó un volumen de 43,86 millones de toneladas (Bolsa de Cereales, 2021). Sin embargo, los productores enfrentan el desafío de seguir incrementando los

rendimientos de la soja, especialmente en la región templada central. Una gestión óptima de los recursos ambientales es clave para mejorar la productividad del cultivo (Vitantonio-Mazzini et al., 2021). Factores ambientales como temperatura, disponibilidad de agua y condiciones del suelo son las principales limitantes de los rendimientos. Para cerrar la brecha entre los rendimientos obtenidos y los potenciales, es esencial comprender los factores bióticos y abióticos que afectan el rendimiento (Di Mauro et al., 2022).

Aunque en 2017 se publicó un estudio de (Rodolfo et al., 2017) que presentó las primeras mediciones de ozono troposférico en Argentina, mostrando que el país está experimentando un aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero, la contaminación del aire y la presencia de ozono no han sido ampliamente consideradas en las prácticas agrícolas. A pesar de que la soja es altamente sensible al ozono y que su concentración mundial se espera que supere los 60 ppb para 2050, pocos estudios se han centrado en esta problemática en Argentina y la región.

2.1.2 Soja y Ozono

Estas altas concentraciones de ozono presentan una limitación para la productividad agrícola a nivel global (Chaudhary et al., 2022). La soja, al igual que otros cultivos, es especialmente sensible al ozono, lo que presenta una amenaza creciente para los agricultores (Li et al., 2021).

Aunque una disminución en las emisiones de los precursores condujo a una reducción de las concentraciones medias de ozono en América del Norte, Europa y Asia se proyecta un aumento debido al cambio climático en los próximos años (Meleux et al., 2007; Pierre, 2021). A pesar de que la legislación establece umbrales de ozono en ciertas regiones, como el límite de 40 ppb (AOT40) en la Unión Europea (Proietti et al., 2021), se espera que para 2050 esta concentración sea superada, una realidad ya común en gran parte del hemisferio norte (Morgan et al., 2004). Estas altas concentraciones de ozono presentan una limitación para la productividad agrícola a nivel global (Chaudhary et al., 2022).

El cultivo de soja experimenta cambios morfológicos y fisiológicos al interactuar con factores abióticos (Chaudhary et al., 2022) El ozono interfiere en procesos clave como son el intercambio de gases, la respiración y la fotosíntesis. Lo que implica una menor longevidad de las hojas y finalmente la senescencia temprana de la planta (Fuhrer, 2002). El ozono reduce la eficiencia del cultivo para convertir energía en

biomasa (Betzberger et al., 2012; Papazian et al., 2016; Oikawa & Ainsworth, 2016), provoca menor altura de las plantas, menor área foliar, menor número de flores, frutos y semillas y la aceleración de la senescencia. Y finalmente una reducción del rendimiento final (Morgan et al., 2006; Singh et al., 2009; Gillespie et al., 2011; Agathokleous, 2018; Tisdale et al., 2021; Chaudhary et al., 2022; Li et al., 2021).

Como respuesta al daño oxidativo inducido por el ozono, la planta produce antioxidantes (Andersen, 2003; Booker & Fiscus, 2005). Sin embargo, este proceso demanda una cantidad significativa de carbohidratos para la síntesis de estos antioxidantes, lo que reduce el crecimiento y la producción de biomasa. La capacidad antioxidante total de las células involucra antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Algunos estudios indican que las concentraciones de ácido ascórbico y flavonoides en la planta determinan su capacidad de defensa (Mao et al., 2017; Chaudhary et al., 2022;), lo que permite a la soja modular sus rendimientos en respuesta a la exposición crónica al ozono.

Como respuesta al daño oxidativo, la maquinaria de reparación se pone en marcha. Comienza la detoxificación por la vía no enzimática y enzimática (con aumento en la actividad de las POD y la disminución en la actividad de las CAT). Se favorece la actividad del metabolismo secundario en lugar del metabolismo primario. El aumento de POD está asociado con la destrucción de las membranas celulares y la liberación de proteínas previamente inmovilizadas. Algunos autores documentaron que altas concentraciones de ozono causan un aumento del ácido ascórbico en soja (Betzberger et al., 2010 ;Singh & Agrawal, 2011; Osborne et al., 2016). Otros estudios, sin embargo, muestran que la actividad de los flavonoides y catalasas fue inhibida con el aumento del ozono en el ambiente (Chaudhary et al., 2022). Y para otros es difícil establecer el papel de los antioxidantes contrarrestando la oxidación por ozono (Booker & Fiscus, 2005). Un estudio mostró que, por el aumento en la concentración del ozono, se produce una reducción en la concentración de ácido ascórbico que se utiliza para la eliminación de radicales libres (Singh et al., 2010). Por lo que demuestra la capacidad limitada en el reciclaje de antioxidantes. Y si la capacidad de desintoxicación se excede ante una concentración alta de ozono, los valores de antioxidantes finalmente disminuyen y el daño a la planta sería inevitable. El compromiso entre crecer o defenderse podría comprometer la capacidad de defensa de la planta de acuerdo con la etapa fenológica que atravesase (Betzberger et al., 2012; Ainsworth et al., 2012; Zavala et al., 2004).

En un estudio de 2017, se documentó que las concentraciones de flavonoides totales, rutina y quercetina bajo estrés por ozono, aumentaron en las etapas de floración y formación de vainas. Este evento está relacionado con la edad de las hojas, ya que la capacidad de formación de metabolitos depende de la edad de las hojas. Las hojas más jóvenes tienen mayores valores de ácido ascórbico. Se observó que durante la etapa vegetativa de la soja la capacidad antioxidante total no se ve afectada por exposición a ozono (Betzberger et al., 2010; Mao et al., 2017; Bailey et al., 2019). Sin embargo, el efecto en la concentración de antioxidantes y compuestos fenólicos se vislumbra con el tiempo. El contenido de flavonoides totales podría significar un aporte a la planta para responder ante el estrés abiótico. Permitiendo así a la planta de soja modular la disminución de los rendimientos debido a la exposición crónica a ozono. Por lo tanto, podría decirse que estas fitohormonas tienen un efecto regulador en la pérdida de rendimiento de este cultivo (Paolacci et al., 2001; Bilgin et al., 2008; Gillespie et al., 2011; Mao et al., 2017; Zhang et al., 2018).

La fase reproductiva representa un período crítico para la soja, ya que es altamente vulnerable a la influencia de factores abióticos. Investigaciones previas (Booker & Miller, 1998) exploraron el efecto del ozono crónico en el desarrollo reproductivo de la soja, concluyendo que el ozono ambiental anticipa el inicio de la etapa reproductiva y aumenta el peso de las vainas, aunque este efecto no se sostiene a lo largo de toda la etapa. Estudios posteriores respaldaron estos hallazgos al confirmar que la exposición al ozono acelera el desarrollo reproductivo de la soja, provocando un adelanto en el período de floración (Reid et al., 1999).

Investigaciones un poco más recientes sugieren que el ozono interactúa con la edad de la hoja y con los estados de desarrollo del cultivo. Aunque han pasado años desde que estos autores comenzaron a estudiar los efectos del ozono en el ciclo de vida de la soja, se debe tener en cuenta que estos estudios consideraron múltiples factores en conjunto (Sun et al., 2014). Esta complejidad puede dificultar la identificación precisa del impacto individual del ozono. Además, es evidente que la mayoría de los estudios previos han focalizado su atención en cuantificar los efectos del ozono en los distintos componentes del rendimiento, como el peso de las vainas y la producción de semillas. No obstante, esta tesis no solo se ha enfocado en evaluar los componentes del rendimiento sino también en evaluar cómo el ozono influye en la etapa de floración, un evento que reviste una importancia fundamental para el ciclo de vida de la soja y para su rendimiento global. Debido a la creciente amenaza que la contaminación por ozono

representa para la producción de soja, esta investigación busca avanzar en el conocimiento sobre un aspecto esencial pero poco estudiado de la interacción entre el ozono y la soja. Al identificar cómo el ozono afecta el inicio de la inducción a la floración, se espera proporcionar información valiosa tanto para los productores agrícolas como para los formuladores de políticas, quienes buscan mitigar los efectos negativos del ozono en la producción agrícola.

En resumen, la contaminación por ozono representa un desafío significativo para la producción de soja en Argentina y en otras regiones donde este cultivo tiene un papel destacado. Por eso nos planteamos el siguiente objetivo para este capítulo: actualizar y profundizar el tema de estudio a través de bioensayos, para lograr una comprensión más exhaustiva de cómo el ozono modula la ontogenia de la soja y, en última instancia, impacta en sus rendimientos. A partir de nuestros resultados encontrar estrategias más efectivas para gestionar los efectos adversos del ozono y asegurar la sostenibilidad y seguridad alimentaria en la producción de soja y otros cultivos sensibles en el futuro.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en parcelas experimentales del campo de IFEVA (Facultad de Agronomía UBA – Latitud: 34°35'28,5"S Longitud 58°28'48,4"O). Se utilizaron semillas de soja (*Glycine max*) variedad Williams (G. Madurez IV), un cultivar comercial definido, de hábito de crecimiento corto y determinado.

2.2.1 Diseño experimental y tratamientos:

La fumigación con ozono se realizó en cámaras cilíndricas con techo abierto de ocho m³. Las cámaras tienen tres metros de alto, dos metros de diámetro y están cubiertas por láminas de PVC cristal sobre una estructura de aluminio con forma de hongo para prevenir la entrada de agua por precipitaciones. Se utilizaron tres cámaras para el tratamiento control o Ambiental (sin fumigación de O₃) y otras tres para el tratamiento con ozono (aire filtrado con el agregado de O₃) (Figura 2.1). El ozono es generado mediante un tipo de descarga por chispeo por un generador de O₃ (Hogsett et al., 1985) y el aire ambiental es bombeado a través de un filtro de carbón activado. La concentración de ozono se monitorea con un monitor de O₃ Modelo 450 API-Teledyne Instruments (Teledyne Advanced Pollution Instrumentation San Diego, Ca). Además, cada cámara posee un aire acondicionado frío-calor, que regula la temperatura. Estas cámaras son de una tecnología de exposición a contaminación de aire desarrolladas para proveer un ambiente semejante a las condiciones ambientales, en experimentos a campo (Heagle et al., 1998).

Se sembraron dos semillas de soja por maceta, en 80 macetas plásticas de cinco litros con un sustrato de mezcla de tierra fértil, arena y turba (50:25:25), (Figura 2.2) Luego de la siembra se cubrieron las macetas con una media sombra para evitar que las plántulas (en particular, los cotiledones recién emergidos) sean consumidos por las aves. Una vez expandidas las primeras hojas se quitó la media sombra y se ralearon las plántulas excedentes dejando una planta por maceta. Estas plantas se mantuvieron en las cámaras bajo ciclo día-noche e intensidad de luz natural y condiciones de temperatura controladas (20 - 28°C).

Durante los experimentos las plantas fueron regadas diariamente de forma tal que el sustrato de todas las macetas se mantuvo a capacidad de campo, y expuestas a las mismas condiciones ambientales de temperatura y radiación solar (Figura 2.4) La mitad

de las plantas (39 plantas) recibieron fumigación con O₃ en un rango de 40 - 50 ppb (Oikawa & Ainsworth, 2016) desde que las hojas unifoliadas estuvieron desplegadas, mientras que las otras 39 estuvieron en las cámaras control (Ambiental). La fumigación fue continua hasta el momento de cosecha. Las plantas se expusieron a un tratamiento de siete horas de ozono por día, excepto los días nublados o lluviosos. Durante el ensayo se realizó el monitoreo de concentración de ozono con un medidor para tal fin. (Figura 2.3) El monitoreo se realizó todos los días durante la mañana y la tarde, para asegurar que la concentración de ozono en las cámaras bajo tratamiento estuviera en el rango de 40-50 ppb (Oikawa & Ainsworth, 2016)

2.2.2 Relevamiento, cosechas y mediciones

Durante todo el ciclo del cultivo se observaron las plantas, para relevar el efecto del ozono en las hojas. Se siguió diariamente la fenología del cultivo, desde el estado vegetativo hasta que comenzó a florecer. A partir de floración, se registró el número de flores en cada una de las 13 plantas, tanto en las tres cámaras con tratamiento (O₃) como en las tres cámaras control (Ambiental). En cada una de las cámaras se dispusieron 13 plantas. Cada cámara es una repetición. Todas las plantas fueron cosechadas al alcanzar la plena madurez (R8, según (Fehr & Caviness, 1977)). Este estadio fenológico fue reconocido porque la mayor parte de las vainas eran de color marrón pajizo. La cosecha se realizó en febrero del año 2020 (Figura 2.6) de manera manual, siguiendo una metodología propia con el objetivo de medir los distintos componentes del rendimiento. A cada planta cosechada se la dividió en sus ramificaciones, y para cada ramificación se separaron las vainas presentes en cada nudo, a la cuales se les contaron las semillas. Además, se registró número de vainas y número de semillas por planta. Se cosechó la biomasa aérea de cada planta y se conservó en sobres para luego proceder a secado en estufa por 48 horas. Las semillas fueron almacenadas en un sobre cerrado enumerado por cada planta y se colocaron en una estufa (60°C) durante 48 horas.

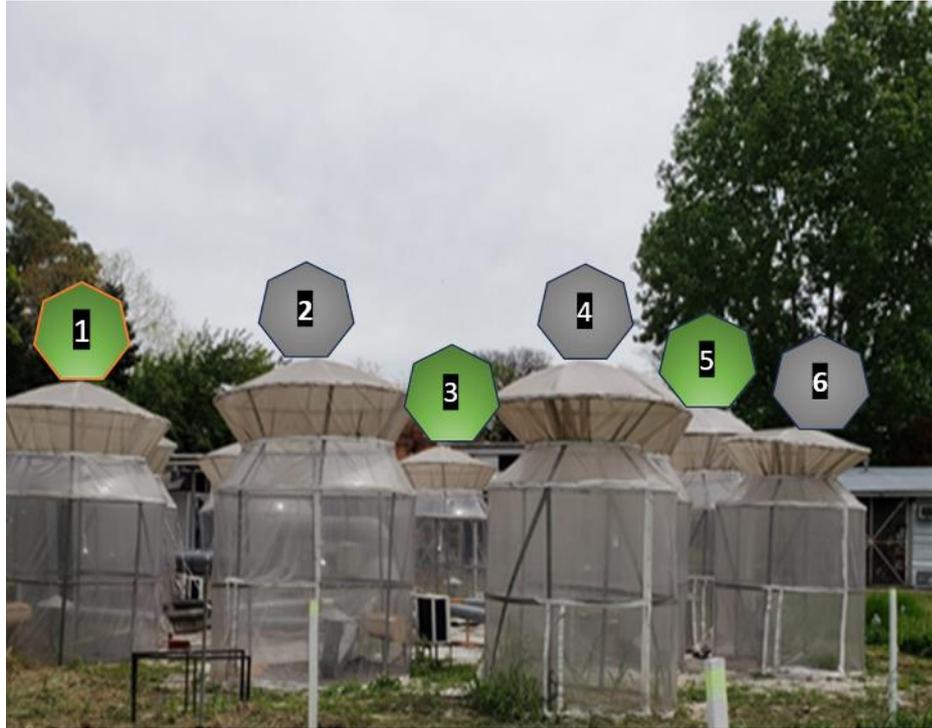


Figura 2.1: Cámaras utilizadas en el ensayo. Los tratamientos fueron: tres cámaras con fumigación crónica de ozono (40-50 ppb O_3) y tres para el ambiente control (Ambiental).



Figura 2.2. Disposición de las macetas donde se sembraron semillas de soja (*Glycine max*) cv. Williams.



Figura 2.3 Dispositivo de medición manual de concentración de O₃ en las cámaras.



Figura 2.4: Plantas de soja en las cámaras experimentales.

2.2.3 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con Análisis de Varianza y en los casos donde los términos de interacción resultaron significativos, las diferencias de medias entre tratamientos se evaluaron mediante la prueba de Tukey, utilizando el software estadístico de Infostat versión 2018 y utilizando el software R (versión 4.3.1). Cuando

se utilizó ANOVA se probó el cumplimiento de los supuestos de normalidad, independencia y homocedasticidad de las varianzas.

Para analizar el efecto del tratamiento con ozono sobre el comienzo de la floración de soja se realizó el ajuste a un modelo lineal usando el método de los mínimos cuadrados generalizados (también conocido como GLS). En este modelo se consideró la interacción entre el número de plantas en cada repetición que entraban en período de floración y el tratamiento (Ambiental u Ozono) en función de los días desde la emergencia de las plantas. Se determinó la significancia estadística de los modelos mediante un ANOVA y las comparaciones se realizaron utilizando el test de Tukey.

2.3 RESULTADOS

Las plantas que estuvieron en las cámaras bajo tratamiento con ozono (O_3) entraron en el estado fenológico R1 aproximadamente cuatro días antes que las plantas de las cámaras control (Ambiental) (Figura 2.6 y 2.7) y también alcanzaron el estado de madurez fisiológica con anterioridad (evento que no se pudo cuantificar) (Figura 2.6). En las plantas bajo tratamiento con ozono se observaron manchas foliares o clorosis característica de la exposición a ozono y senescencia temprana (Figura 2.5).



Figura 2.5: Hojas de soja que presentan daño visible por efecto del ozono crónico.

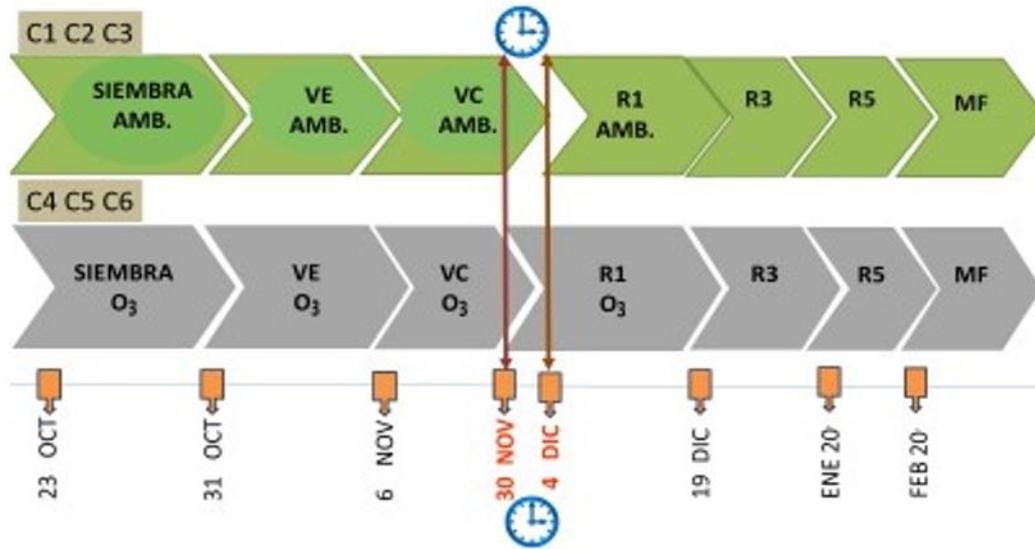


Figura 2.6 Esquema de la duración de las diferentes fases del cultivo en el tiempo, desde la siembra hasta la cosecha. C1, C2, C3 (cámaras control); C4, C5, C6 (cámaras con O₃). El reloj indica las diferencias en las fechas en las que las plantas provenientes de ambos tratamientos alcanzaron el inicio de R1. VE: emergencia de cotiledón VC: estado de plántula, R1: comienzo de floración, R3: comienzo de fructificación, R5: inicio formación de semillas, MF: madurez fisiológica. (Escala de Fehr y Caviness, 1977).

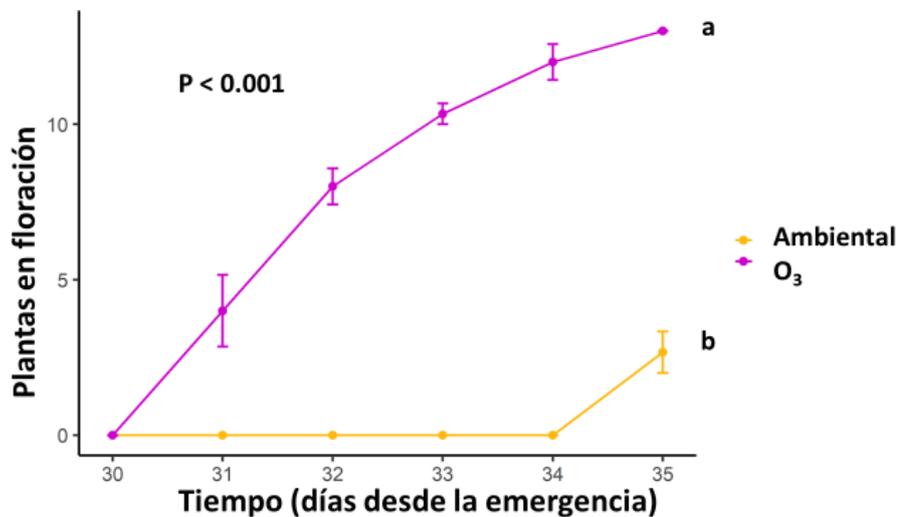


Figura 2.7. Número de plantas de soja en floración para el tratamiento con ozono crónico (color morado) y para el tratamiento control (Ambiental). Se realizó el ajuste a un modelo lineal usando el método de los mínimos cuadrados generalizados (también conocido como GLS). Interacción entre el número de plantas en cada repetición que entraban en floración y el tratamiento (Ambiental u Ozono) en función de los días desde la emergencia de las plantas. (GLS; ANOVA $P < 0,0001$, $n = 3$).

A pesar de los efectos del ozono crónico observados en la etapa de floración de la soja, no se encontraron diferencias en el peso seco de biomasa total área de las

plantas que estuvieron en las cámaras con tratamiento con ozono (O_3) y las plantas control (Ambiental) (Figura 2.8)

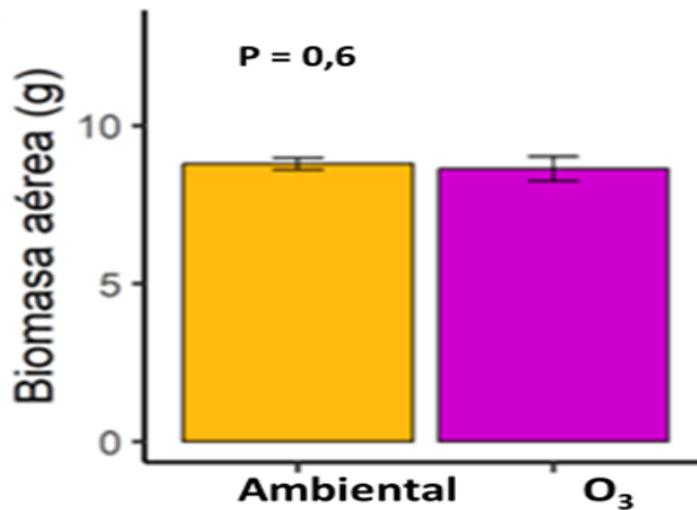


Figura 2.8. Biomasa aérea/planta bajo tratamiento con ozono crónico (O_3) (barra color morado) y control (Ambiental) (barra color amarillo). (ANOVA, $P=0,6$; $n=3$).

El ozono crónico tuvo un efecto en detrimento del peso de las semillas de soja ($F_{1,4}=28$; $P < 0,01$) y en el peso de las vainas por planta ($F_{1,4}=20$; $P=0,01$) (Figura 2.9 A, B). Además, se observó un leve incremento en el número de vainas en las plantas provenientes de las cámaras con ozono ($F_{1,4}=1,6$; $P > 0,05$), pero con un menor número de semillas por planta ($F_{1,4}=2,54$; $P > 0,05$), sin diferencias significativas (Figura 2.9 C, D).

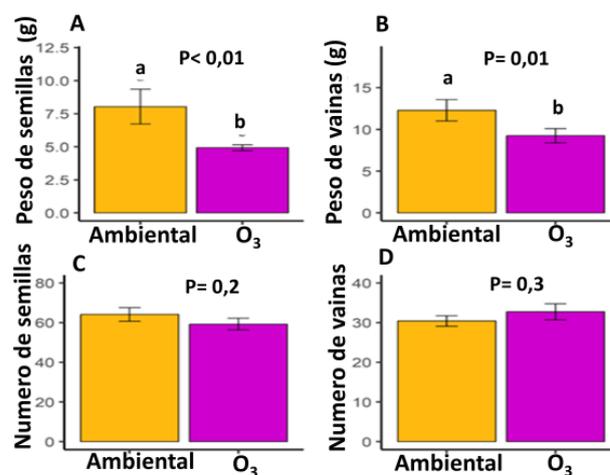


Figura 2.9. Efecto del ozono crónico sobre los diferentes componentes del rendimiento: Peso de semillas (A) y de vainas de soja por planta (medición en gramos). (C) y (D) representan la medición del parámetro número de semillas y número de vainas por planta respectivamente. Barras de color morado representan al tratamiento con ozono crónico (O_3) y las de color amarillo representan al control (Ambiental). (ANOVA, Test de Tukey $\alpha=0,05$. $n=3$; $P \leq 0,01$).

2.4 DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este capítulo revelan que la exposición crónica a ozono induce un adelanto en la etapa de floración en el cultivo de soja, con consecuencias negativas en el rendimiento, lo que confirma la predicción planteada en la Hipótesis 2. Es importante destacar que este resultado es inédito, ya que no se ha documentado previamente este efecto específico del ozono crónico en la etapa reproductiva de la soja. Aunque existen estudios en la década de los noventa que señalaron el efecto del ozono en esta fase del desarrollo, estos trabajos combinaron el ozono con otros factores abióticos (CO₂ y UVB), lo que limita la interpretación de los resultados (Miller et al., 1994 ; Reid et al., 1999 Sun et al., 2014). No hay bionesayos sobre el efecto del ozono en la fenología en el cultivo de soja. Según nuestros resultados, el impacto del ozono crónico adelantó la etapa de floración entre cuatro a cinco días. Esto señala una interacción particular entre el ozono crónico y los estados de desarrollo del cultivo de soja.

De acuerdo con la Hipótesis 1 planteada, el peso de las semillas resultó ser la variable más afectada por la exposición crónica al ozono. Esta observación es consistente con resultados bibliográficos que mostraron una disminución de los rendimientos en condiciones bajo ozono (Zhang et al., 2014; Betzelberger et al., 2012; Sun et al., 2014). Si bien en la mayoría de los casos este efecto se ha expresado como una disminución relativa del rendimiento, nuestro estudio respalda este concepto al evaluar los componentes del rendimiento en presencia de ozono.

Con relación al efecto del ozono en las variables de crecimiento del cultivo, los resultados de esta tesis difieren de las conclusiones presentadas en otros estudios. Los resultados obtenidos revelan que la biomasa aérea de las plantas, medida a través del peso de la biomasa aérea seca por planta, no experimentó alteraciones significativas bajo la influencia del tratamiento con ozono crónico (Figura 2.8, A). Es importante destacar que, a lo largo del desarrollo vegetativo del experimento, las plantas sometidas al tratamiento con ozono crónico mostraban hojas sanas durante este periodo. Las plantas expuestas al ozono crónico presentaron un mayor desarrollo foliar y una mayor altura en comparación con las plantas que crecían en las cámaras control (Ambiental).

En concordancia con las observaciones de (Egli, 1993) los resultados obtenidos sugieren que el rendimiento de la soja está más influenciado por el crecimiento en las

fases posteriores a la floración que en las fases previas, como el crecimiento vegetativo. Esta conclusión podría también estar relacionada con las afirmaciones de (Betzberger et al., 2012; Mao et al., 2017; Bailey et al., 2019), quienes mencionaron que la capacidad antioxidante total de la soja durante su etapa vegetativa no se ve afectada por la exposición al ozono. Como resultado, no se registran diferencias significativas al medir la biomasa aérea en este momento. Esto sugiere que la planta puede contrarrestar los efectos del ozono hasta llegar al período crítico, momento que resulta crucial para la definición del rendimiento. En otras palabras, cuando la capacidad de la planta para neutralizar los radicales libres se agota, los antioxidantes se consumen y se produce daño irreversible en la planta (Singh et al., 2010). Este daño repercute en los componentes del rendimiento.

Por otra parte, los componentes de las hojas, como los pigmentos, los carbohidratos y las enzimas, comienzan a disminuir cuando se acerca el evento de la floración (Reid et al., 1999). Esto guarda coherencia con lo planteado por (Morgan et al., 2003) y (Tisdale et al., 2021) quienes demostraron que las altas concentraciones de ozono durante la etapa vegetativa no tenían un impacto en el rendimiento, siendo determinantes al final del ciclo, durante el llenado y maduración de las semillas. En efecto, el impacto acumulativo del ozono a lo largo del ciclo de crecimiento se intensifica a medida que el cultivo avanza en sus estados fenológicos (Morgan et al., 2003). Es decir, que el efecto del ozono crónico no se vislumbra en las primeras etapas de crecimiento del cultivo, ya que la planta cuenta con su mecanismo de defensa para contrarrestar el estrés abiótico. Sin embargo, este mecanismo antioxidante para compensar los daños por ozono tiene un impacto en el rendimiento. Otros estudios mostraron que la capacidad antioxidante total no se ve afectada por exposición a ozono, durante la etapa vegetativa de la soja. La disminución en la concentración de antioxidantes y compuestos fenólicos se detectó en las etapas tardías del ciclo de cultivo (Betzberger et al., 2010; Mao et al., 2017; Bailey et al., 2019).

El compromiso entre crecer y defenderse parece ser crítico a medida que avanza la fenología del cultivo. En este sentido, se observa un daño por ozono crónico resultando en un menor número de semillas por planta, a su vez con semillas de menor peso (Gosselin et al., 2020). En disonancia con otros autores la soja muestra una plasticidad que le permite compensar los efectos negativos sufridos en las etapas iniciales con aumento en el peso de las semillas en etapas más avanzadas (Kantolic, 2008). La soja tiene la capacidad de equilibrar la reducción en el número de semillas mediante un aumento en

el peso de estas, según se observó en ciertas condiciones de estrés (Andriani et al., 1991). Sin embargo, según los resultados de esta tesis, habría que distinguir entre el efecto del ozono crónico y otros factores abióticos. A diferencia de otros estresores, el ozono crónico no permite que la planta compense el menor número de semillas con semillas de mayor peso. Por el contrario, se refleja una disminución tanto en el número como en el peso de las semillas. Además, el impacto del ozono en el número de vainas por planta exhibió una tendencia al aumento, aunque no alcanzó significancia estadística, resultando en un menor peso total de las semillas. Sin embargo, estas vainas no pudieron llenarse y formar semillas en su interior, resultando en un menor peso total, ocurriendo un menor número de semillas por planta en el tratamiento con ozono. Otra vez, se observa el compromiso de la planta entre crecer, fructificar y defenderse. Según la literatura, cuando el cultivo de soja es sometido a estrés abiótico, muchas semillas no llegan a desarrollarse normalmente. El aborto de semillas es característico en soja, produciéndose vainas vanas o vacías (Kantolic & Slafer, 2007). De acuerdo con estos resultados, la tendencia encontrada fue que, bajo tratamiento con ozono crónico, aumentaba el aborto de semillas y el desarrollo de vainas vanas.

En resumen, los efectos del ozono se intensifican durante las fases críticas del cultivo de soja donde se definen los componentes del rendimiento. Esto se traduce en una reducción significativa del peso de las semillas por planta. Dichos resultados son relevantes, especialmente considerando la importancia tanto global como local del cultivo de la soja y el incremento de la contaminación troposférica por ozono, en Argentina y en el mundo. La soja desempeña un papel esencial en la producción agrícola y económica lo que requiere más investigaciones para estudiar la seguridad alimenticia de las poblaciones.

2.5 CONCLUSIÓN

Este trabajo muestra que el ozono ejerce un impacto sustancial tanto en el rendimiento de la soja como en la duración de las fases fenológicas. Estos hallazgos adquieren especial relevancia en contextos donde la fecundación de las flores está ligada a la polinización por insectos. Los resultados presentados en este capítulo no solo amplían nuestra comprensión del fenómeno, sino que también aportan información valiosa para la implementación de prácticas de manejo sostenible, por ejemplo, utilizar variedades con mayor producción de antioxidantes. Estas conclusiones se tornan particularmente útiles para los productores en un escenario de cambio global.

CAPITULO III

El ozono troposférico como modulador de los compuestos de defensas de la soja frente a la herbivoría.

3.1 INTRODUCCIÓN

La soja (*Glycine max [L.] Merrill*) es un cultivo importante tanto para la economía global como para la economía argentina. Se trata de una semilla oleaginosa con un valioso perfil nutricional, debido a su alto contenido en proteínas y ácidos grasos, vitaminas y minerales. Es esencial en la alimentación humana, pero también es una buena fuente de nutrientes para los insectos herbívoros que se alimentan de ella. Muchos insectos se nutren de sus hojas, sus brotes y sus frutos, disminuyendo así el rendimiento final del cultivo (Islam et al., 2022).

La planta de soja ha desarrollado respuestas defensivas para protegerse del daño causado por los insectos. Estas defensas pueden ser constitutivas, presentes en todo momento, o inducidas, es decir, activadas en respuesta al daño que le ocasionan los insectos. Por ejemplo, los tricomas, estructuras en la superficie de las hojas, constituyen una defensa física ya que impiden que los huevos de los insectos lleguen a la epidermis y en consecuencia las larvas mueren de hambre después de la eclosión (Freeman & Beattie, 2008). En el caso que esta barrera no resultara suficiente para disuadir a los insectos, la planta induce defensas del tipo químicas. como pueden ser la producción de proteínas con propiedades anti-nutricionales y tóxicas para los insectos.

Un grupo de proteínas defensivas en la soja son los IP, que se unen a las proteasas e inhiben su actividad enzimática, protegiéndolas de la degradación. Estos inhibidores afectan la disponibilidad de aminoácidos esenciales necesarios para el crecimiento y mantenimiento metabólico de los insectos, pudiendo sobrevivir en las condiciones alcalinas del intestino de los insectos. Están regulados por las hormonas JA y ET. (Zavala & Baldwin, 2004). Se encuentran principalmente en células parenquimáticas y su presencia aumenta en respuesta al ataque de insectos o patógenos (Ryan, 1990). La importancia de los IP se observó por primera vez en un estudio de 1947 realizado por Mickel y Standish, quienes notaron que las larvas de ciertos insectos no podían desarrollarse normalmente al consumir una dieta basada en soja. Además, estudios posteriores demostraron que los inhibidores de tripsina eran tóxicos para las larvas del coleóptero *Tribolium confusum* (Haq et al., 2005). Los dos tipos principales de inhibidores de proteasas en la soja son los inhibidores Kunitz y los inhibidores Bowman-Birk. Estos inhibidores afectan la actividad de las enzimas digestivas tripsina y quimiotripsina, y reducen la calidad de la dieta lo que en algunos casos pueden ocasionar la muerte del herbívoro (Ryan, 1990; Mithöfer & Boland, 2012). Un grupo de

investigadores observó una disminución del 50% en la fecundidad de los trips, cuando se alimentaron de una dieta artificial con IP, así como también una reducción en el tamaño poblacional de estos insectos que se alimentaron sobre cultivos de papa transgénica que sobre-expresaba IP (Outchkourov et al., 2004). En tabaco resultaron ser defensas eficientes contra larvas de lepidópteros (Zavala et al., 2004). Otro estudio muestra que tras el daño ocasionado por *Spodoptera frugiperda* en las hojas, la respuesta de la planta desencadenó un período de desarrollo larvario más extenso y un peso pupal menor (Peruca et al., 2018). La soja también produce compuestos fenólicos que pueden tener efectos tóxicos para los insectos y afectar su desarrollo y hasta comprometer su supervivencia. (Zavala & Baldwin, 2004). En un estudio de (Peruca et al., 2018), se resaltó la importancia de los compuestos fenólicos en la respuesta química de defensa. Está documentado que las hojas y semillas de soja tienen isoflavonas (genisteína y daidzeína) junto con glucósidos derivados de kaempferol y ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cinámico) que le aportan propiedades antioxidantes y que son muy importantes para la defensa ante diferentes factores de estrés. Los isoflavonoides tienen propiedades antiherbívoro ya que disminuyen el peso y la supervivencia de larvas. Los flavonoides fueron identificados en varios órganos de la planta de soja. Son sintetizados por la vía de los fenilpropanoides. La vía de los fenilpropanoides es sensible al daño de los insectos en soja. Algunos de estos compuestos de defensa de la soja producen efectos antialimentarios o antibióticos contra las plagas. Los isoflavonoides son los flavonoides que se identificaron en soja. Los más comunes de encontrar son las diadzininas y las genistinas. Se encontró que los isoflavonoides tienen un efecto negativo en la duración del ciclo de vida del insecto (Endo et al., 2007) y las defensas de la soja pueden afectar los parámetros del animal, tales como peso de larva, duración de las fases de desarrollo, peso de pupa (Garvey et al., 2022).

Se puede decir que las plantas de soja enfrentan un dilema entre invertir recursos en defensas para protegerse de los insectos herbívoros y asignar recursos para el crecimiento y la reproducción. Las defensas constitutivas tienen un costo metabólico constante, mientras que las defensas inducidas se activan cuando son necesarias, equilibrando la inversión de recursos (Agrawal et al., 2000; Mithöfer & Boland, 2012). En resumen, las defensas de la soja incluyen la producción de IP y compuestos fenólicos como las isoflavonas. Estos mecanismos son cruciales para reducir el impacto

de los insectos herbívoros y garantizar la sanidad vegetal y productividad de las plantas de soja.

3.1.1 La interacción de la soja con *Spodoptera frugiperda*

A pesar de los mecanismos defensivos implementados por la planta, algunos insectos logran adaptarse a la presencia de IP incrementando la producción de enzimas, lo que les permite sortear esta barrera y aprovechar el alimento (Chapman, 2013). Un ejemplo es la larva de lepidóptero *Spodoptera frugiperda* que, aunque tiene preferencia por plantas de la familia *Poaceae* como el maíz y el arroz, ha demostrado la capacidad de adaptarse a la soja como fuente de alimentación (Volp et al., 2022; Garvey et al., 2022). Esta adaptación de las larvas al consumo de plantas de soja ha llevado a la investigación sobre los mecanismos subyacentes que les permiten sobrellevar la presencia de IP en su dieta. Estudios previos han revelado que estas larvas tienen una habilidad notable para ajustarse a la presencia de IP en su alimento y, en consecuencia, alimentarse de la planta. Una familia de genes diversa de serin proteasas parece desempeñar un papel crucial en el desarrollo de las larvas. Los investigadores sugieren que la adaptación de *S. frugiperda* a los IP se basa en una estrategia que involucra la producción de una amplia variedad de enzimas digestivas. Esto garantiza que, entre estas enzimas, algunas sean insensibles a los inhibidores. Aunque esta estrategia puede ser costosa para el insecto, le brinda la oportunidad de ampliar significativamente sus posibilidades de adaptación (Brioschi et al., 2007).

La adaptación de *Spodoptera frugiperda* al consumo de la soja ilustra la capacidad de los insectos para desarrollar respuestas evolutivas a las defensas de las plantas. A pesar de los mecanismos de defensa implementados por la soja para evitar que la consuman, los insectos pueden encontrar formas de eludir estas barreras y aprovechar los recursos disponibles en su entorno. Estos hallazgos destacan la dinámica en constante evolución entre las plantas y los insectos herbívoros, donde cada especie desarrolla estrategias para sobrevivir y prosperar en su ambiente. Por otro lado, el estrés ambiental derivado de la contaminación del aire ha sido reconocido como un factor que potencialmente puede perturbar las complejas interacciones tróficas en los ecosistemas. El ozono troposférico tiene especial relevancia, ya que su concentración continúa en aumento con la capacidad de afectar a los organismos, tanto con efectos directos como

indirectos a través de sus interacciones (Booker & Fiscus, 2005; Booker & Miller, 1998 y Cotrozzi et al., 2021).

El ozono troposférico, al modificar la bioquímica y el valor nutricional de tejidos vegetales, y alterar la composición fenólica que regula las defensas de las plantas, se perfila como un agente que puede modular los procesos de respuesta de las plantas ante el daño y el estrés. Si bien se ha estudiado por separado la reacción de la soja ante la herbivoría y los cambios inducidos por la contaminación de ozono en las plantas (Biancari et al, 2021), la interacción de estos factores y su efecto combinado afectando los rendimientos de la soja han sido poco explorados. En este contexto, en el momento de plantear las hipótesis se plantearon dos posibles escenarios: uno en el cual las plantas se vuelvan más vulnerables ante la herbivoría como resultado de la interacción con la contaminación de ozono, y otro en el cual las plantas desarrollen una mayor resistencia como respuesta a esta combinación de factores. Para abordar esta cuestión y avanzar en el entendimiento de la interacción compleja entre la soja y *Spodoptera frugiperda* en presencia de ozono, en esta tesis se han llevado a cabo distintos bioensayos, con el objetivo de determinar la producción de defensas contra los herbívoros en hojas de soja cultivada con altos niveles de O₃ troposférico y evaluar el efecto del O₃ troposférico sobre el desempeño de los herbívoros.

Este capítulo se centra en estudiar la interacción soja-insecto-ozono, con el objetivo de avanzar en el conocimiento de cómo el ozono puede influir en la relación entre la soja y *Spodoptera frugiperda*. A través de este enfoque, se busca contribuir al conocimiento de los posibles efectos sinérgicos de la contaminación troposférica por ozono y la herbivoría en la agricultura, permitiendo un mayor entendimiento de los procesos que moldean los ecosistemas en un contexto de cambio ambiental.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron llevados a cabo durante las campañas 2019, 2021 y 2022 en el campo experimental de IFEVA, (Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires – Latitud: 34°35'28,5"S Longitud 58°28'48,4"O).

3.2.1 Material vegetal

Se sembraron semillas de soja [*Glycine max (L.) Merr*] cv Williams, en macetas de cinco litros con sustrato mezcla de tierra fértil, arena y turba (50:25:25) durante los tres años. Tras la siembra, trece plantas por cámara se colocaron en las cámaras con forma de hongo, de techo abierto (ver detalle en Capítulo II) donde estuvieron hasta el final del ciclo de la soja. Se utilizaron tres cámaras para el tratamiento control (Ambiental), y tres para el tratamiento con ozono (O₃). Durante todos los experimentos las plantas fueron regadas diariamente de forma tal que el sustrato de todas las macetas se mantuvo a capacidad de campo, y se aseguró que estén expuestas a las mismas condiciones ambientales de temperatura, cantidad y calidad de radiación. Las plantas espontáneas se controlaron manualmente. Los experimentos se llevaron a cabo usando plantas en la etapa de crecimiento V4 del cultivo (Fehr & Caviness, 1977).



Figura 3. 1. Distribución de las macetas dentro de las cámaras.

3.2.2 Insectos

Se utilizaron larvas de *S. frugiperda* provenientes de una colonia de lepidópteros criados en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Ecológicas y Fisiológicas vinculadas a la Agricultura (IFEVA) en la Facultad de Agronomía (UBA). En todos los experimentos se utilizaron larvas recién nacidas (neonatos) criadas en condiciones controladas de temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 1$), y fotoperíodo (L16: D8 h). En todos los experimentos se utilizaron larvas recién nacidas (neonatos). Una vez nacidas se las colocó inmediatamente sobre las hojas de la soja del ensayo. Sin embargo, para evitar que al nacer mueran de hambre se les proporcionó una dieta artificial hasta posicionarlas sobre las hojas. Esta dieta consiste en un gelificado básico enriquecido con cereales, levadura de cerveza, azúcares, y conservantes. La receta corresponde a 500mL de solución y los ingredientes que la componen son: harina de garbanzos, 48g, germen de trigo, 38g, harina de soja, 19g, levadura de cerveza, 24g, ácido ascórbico, 2.3g, metil parabeno, 1.9g, ácido sórbico, 1.15g, agar, 15g. (figura 3.2)

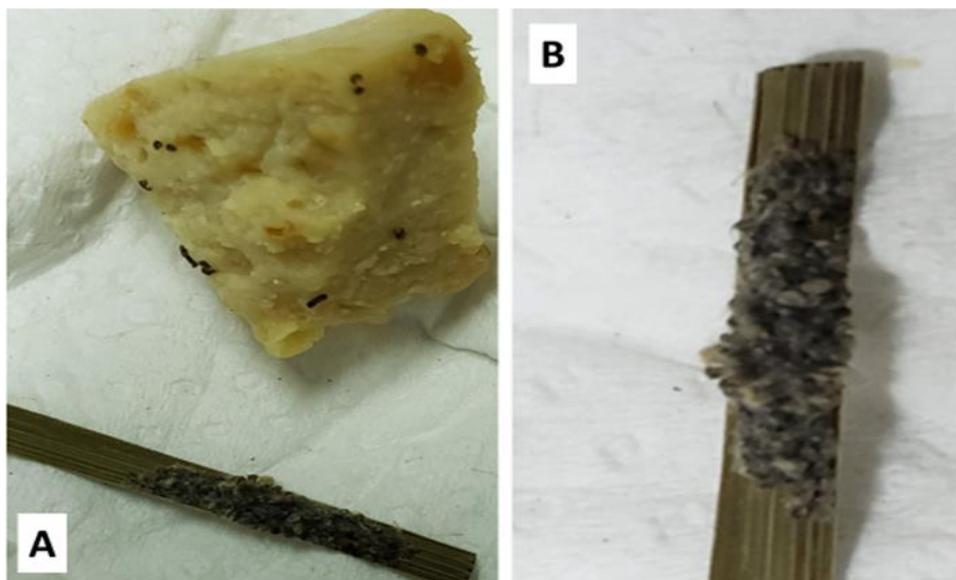


Figura 3.2 A: Dieta artificial de neonatos de *Spodoptera frugiperda* **B.** masa de huevos de *S. frugiperda*

3.2.3 Efecto de la exposición de ozono en la supervivencia, el peso y la longitud de larvas de *S. frugiperda*.

3.2.3.1 Supervivencia de neonatos de *S. frugiperda*

Con el objetivo de evaluar el efecto del ozono sobre el desempeño de los herbívoros, se colocaron 12 neonatos de *S. frugiperda* por planta (cuatro por folíolo) en

5 plantas por tratamiento (ozono) y control (Ambiental). Cada neonato fue colocado individualmente, utilizando un pincel, sobre la cara adaxial del folíolo y confinados en una bolsa de tul sellado con cinta de papel, para evitar que se escapen. Las bolsas de tul se utilizaron tanto en plantas control (Ambiental) como en plantas bajo tratamiento con ozono (O_3) (figura 3.3). En total se dispusieron 60 larvas por cada tratamiento ($n= 60$). Siendo la unidad experimental el insecto, cada larva. Cada día durante el periodo de siete días, se contabilizó el número de individuos vivos, para establecer la tasa de supervivencia en condiciones de fumigación con ozono (O_3) y en el control (Ambiental) según (Romero, et al., 2020). Este experimento se llevó a cabo en las campañas 2021 y 2022. Luego de monitorear diariamente la cantidad de larvas vivas durante siete días, se realizó el análisis de los datos de supervivencia.

3.2.3.2 Peso y longitud de las larvas

Las larvas provenientes del experimento de supervivencia fueron pesadas el mismo día en que concluyó dicho ensayo. Se pesaron en grupos de a 3 individuos y se registró la longitud (cm) de cada una (figura 3.4) Para la medición del peso de las orugas se utilizó una balanza digital de precisión Denver Instrument APX 200 y para la medición de su longitud se utilizó una regla milimétrica. Se registraron los pesos individuales y la longitud de al menos 19 individuos por tratamiento en los años 2021 y 2022.

3.2.4 Efecto de la exposición a ozono sobre compuestos de defensas de las plantas de soja frente a la herbivoría

Se seleccionaron 12 macetas con plantas de soja en cada cámara, con ozono (O_3) y control (Ambiental). Seis de ellas recibieron el tratamiento de herbivoría y las otras seis se utilizaron como plantas control. Para realizar el tratamiento de herbivoría se utilizaron 12 neonatos por hoja. Los neonatos fueron colocados con un pincel en la cara adaxial de cada trifolio (última hoja completamente expandida) contenidos en una bolsa de tul para evitar que se pasen de hoja o se escapen. A las plantas control se les colocaron bolsas de tul sin herbívoros. Para el tratamiento de herbivoría se mantuvieron las larvas alimentándose de los folíolos por 24 y 72 horas. Se tomaron muestras de hojas con y sin daño por herbívoros a las 24 h y 72 h de iniciado el tratamiento, al mediodía. Se cosecharon por un lado las hojas dañadas y por otro las hojas de las plantas control, se rotularon y fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras se

mantuvieron en un ultra freezer (-80 ° C) hasta el momento de realizar los análisis de determinación de la actividad de inhibidores de serin proteasas (tripsina) y de compuestos fenólicos (isoflavonoides). Para cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones, 3 cámaras con tratamiento con ozono y 3 para tratamiento ambiental o control (n= 3). La unidad experimental es la cámara.

3.2.5 Determinación de la actividad de inhibidores de tripsina y cuantificación de proteína soluble.

Para determinar los niveles constitutivos e inducibles por herbivoría de actividad de los inhibidores de tipo serín proteasas en hojas de plantas que crecieron en el tratamiento con ozono (O₃) y en el control (Ambiental), se molieron las muestras de hojas que estaban conservadas en el freezer y se procedió a realizar los análisis bioquímicos correspondientes. Se utilizaron 150 mg de muestras de hojas, que se molieron en un mortero con N₂ líquido, luego se pasaron a un tubo eppendorf de 2 ml y se homogeneizaron con un buffer de extracción (Tris-HCl 0,1M, 50g/L; Polyvinylpolypyrrolidona; 2g/L. phenylthiourea; 5g/L dietylditiocarbamato; 18,6g/L Na₂EDTA; pH 7.6) en una relación 1:3. Se vortexearon las muestras por 5 minutos y seguidamente se centrifugaron a 4°C y a 12000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue nuevamente recuperado y trasvasado a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL, obteniéndose de esta manera el extracto de inhibidores, el cual fue mantenido en hielo hasta que se realizaron las mediciones de actividad enzimática. Las mismas se llevaron a cabo utilizando lector de microplacas Biotek elx808 a DO₄₀₅. La mezcla de la reacción consistió en 10 µl de tripsina bovina (Sigma T1426) 0,008 mg/ml; 15 µl de una dilución de extracto y 115 µl de solución reguladora de pH (TRIS 0,1M, CaCl₂ 20mM pH 7.8). El producto se incubó 10 min en agitación y se inició la reacción agregando 50 µl del sustrato colorimétrico Bapna (Na-Benzoyl-DL-arginine-4-nitro-anilide hydrochloride, Sigma) en una concentración de 1mg/ml. La lectura de absorbancia a 405 nm fue realizada cada 16 segundos durante un tiempo de 20 minutos. Para cada medición se realizaron 3 réplicas técnicas. Con los datos obtenidos se determinó la diferencia de actividad de la tripsina bovina con y sin extracto de inhibidores, y la misma se relativizó a la concentración de proteínas presentes en mismo. La concentración de proteínas fue cuantificada por el método colorimétrico desarrollado por Bradford (1976) y se utilizó la albúmina bovina como proteína patrón. Todas las mediciones se realizaron a partir de hojas dañadas y no dañadas por las larvas.

3.2.6 Cuantificación de compuestos fenólicos

El procedimiento para determinar los compuestos fenólicos individuales consistió en moler un pool de hojas, de las muestras correspondientes al mismo tratamiento dentro de cada cámara, en un mortero al que se le fue agregando nitrógeno líquido para preservar las muestras (figura 3.6). Se pesaron 100 mg de muestras y se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL. Para la extracción de los compuestos fenólicos, en cada tubo se le adicionaron 900 μ L de una solución metanol: agua (metanol 80%). Durante un lapso de 2 min se pasaron las muestras por un agitador vortex, también se sonicaron por 1 min y quedaron en hielo durante 2 horas. Entonces, se centrifugaron a 11.000 rpm durante 10 min. Con la ayuda de una pipeta se tomó el sobrenadante, el cual se colocó en un nuevo tubo eppendorf de 2 mL, se le agregó 400 μ L de cloroformo y se procedió a sacudir a mano, agitando la mezcla para lograr homogeneizar. Posteriormente se agregaron 200 μ L de H₂O y se agitó manualmente hasta obtener una emulsión. Después, se centrifugaron los extractos durante 4 min a 11.000 g y el sobrenadante transparente (con el preciso cuidado que estuvieran libres de pigmentos) se trasvasó a un vial de vidrio de 2 mL para análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se realizó en una serie HPLC Agilent 1100 A equipada con un detector UV (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE, EE. UU.), utilizando una columna de HPLC de fase inversa Eclipse XDBC18 (5 μ m, 4,6 x 150 mm). La fase móvil consistió en ácido acético acuoso al 0,1 % que fue el solvente A y ácido acético al 0,1 % en acetonitrilo como solvente B. El solvente B se aumentó del 15 % (a los 0 min después de la inyección) al 36 % durante 30 min. El caudal de solvente fue de 1 mL min⁻¹. La longitud de onda del detector UV se fijó en λ 254, 270 y 360 nm. Para la cuantificación de flavonoides se realizó por comparación con una curva de calibración del estándar comercial de cada compuesto (genistina, genisteina, daidzina, daidzeina y rutina (Sigma-Aldrich) como se describe en (Dillon, 2017). Los solventes utilizados para la determinación de compuestos fenólicos foliares fueron adquiridos de Sintorgan (Argentina).

3.2.7 Determinación de la actividad de tripsina del extracto del intestino de *S. frugiperda*

Con el objeto de determinar si las larvas de *S. frugiperda* presentan una respuesta diferencial cuando se alimentan de soja creciendo en cámaras fumigadas con ozono (O_3), respecto de larvas que se alimentaron de plantas control (Ambiental), en el año 2022 se llevó a cabo un experimento que consistió en colocar 4 larvas por folíolo (12 neonatos de *S. frugiperda* por planta), confinados en una bolsa de tul sellado con cinta de papel, para evitar que se escapen. Cuando las larvas alcanzaron el 4° estadio larval fueron disectadas y se les extrajeron los intestinos, los cuales se pesaron, se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en un freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento en que se realizaron las mediciones de la actividad de la tripsina digestiva. Para la extracción de las enzimas de los intestinos, a cada tubo se adicionaron $3\text{ }\mu\text{L}$ de una solución reguladora de glicina ($0,2\text{ M}$; $\text{pH} = 9,5$) por cada miligramo de tejido según la metodología propuesta por Zavala et al. (2008). El tejido fue disgregado con ayuda de un mortero de polipropileno (Sigma-Aldrich) y centrifugado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a 11000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se levantó el sobrenadante, el cual corresponde al extracto de proteasas de tipo tripsina presentes en los intestinos, y se almacenó en tubos eppendorf de 1,5 mL hasta su análisis. Las mediciones enzimáticas se realizaron en un lector de microplacas BioTek ELx808 a DO_{405} . Se utilizaron placas de 96 pocillos de base plana (Cellstar), y en cada pocillo se colocaron $4\text{ }\mu\text{l}$ del extracto de intestino y $156\text{ }\mu\text{l}$ de la solución reguladora de pH de glicina ($0,2\text{ M}$; $\text{pH} = 9,5$). Esta mezcla se incubó por 10min en agitación media continua. Se inició la reacción con la adición de $20\text{ }\mu\text{l}$ de Bapna ($\text{N}\alpha$ -Benzoyl-L-arginine 4- nitroanilide hydrochloride; Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/ml en cada pocillo según el protocolo descrito por (Zavala et al., 2008). La medición de la absorbancia se realizó cada 30 segundos durante 15 minutos. Se relativizó la actividad enzimática a la concentración de proteínas del extracto medida por método colorimétrico Bradford (1976).



Figura 3.3 Plantas de soja con las bolsas de tul que se utilizaron en el tratamiento con herbivoría



Figura 3.4 Registro de longitud de las larvas provenientes de ambos tratamientos



Figura 3.5 Daño visible de herbivoría por las larvas de *S. frugiperda* en plantas de soja

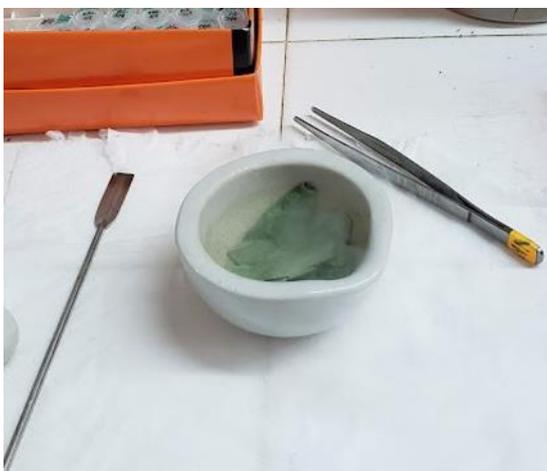


Figura 3.6 Material vegetal de soja siendo molido en mortero con nitrógeno líquido.

3.2.8 Análisis estadísticos:

Los resultados de cada experimento fueron sometidos a diferentes análisis estadísticos, utilizando el software R (versión 4.3.1)

Los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad fueron verificados por las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk respectivamente. Cuando estos supuestos no fueron satisfechos, los datos se transformaron según la función matemática más adecuada. Para el caso de los experimentos de supervivencia se realizó el test de supervivencia Log-rank test.

Para comparación de medias de dos grupos, se utilizó t-test o la prueba estadística ANOVA (para comparar medias de más de 2 muestras independientes) siempre que cumplieran con los tres supuestos (Normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia). También se usó la prueba t de Welch para comparar dos grupos de datos con la misma media. Si no cumplían con los supuestos de ANOVA en cambio se hizo una prueba no paramétrica, la suma de rangos de Wilcoxon. Para comparación múltiples de medias se usó el test de Duncan.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Supervivencia de las larvas de *S. frugiperda*

Se observó que la supervivencia de larvas de *S. frugiperda* que crecieron y se alimentaron, durante una semana, de folíolos de soja dentro de las cámaras con ozono (O_3), fue significativamente menor que la supervivencia de las larvas que se alimentaron de folíolos de soja dentro de las cámaras control o Ambiental (Figura 3.7), ($P= 0,004$, año 2021). En el año 2022 también se realizó el mismo ensayo y los resultados mantuvieron la misma tendencia encontrada en el ensayo realizado en el año 2022 (Figura 3.8).

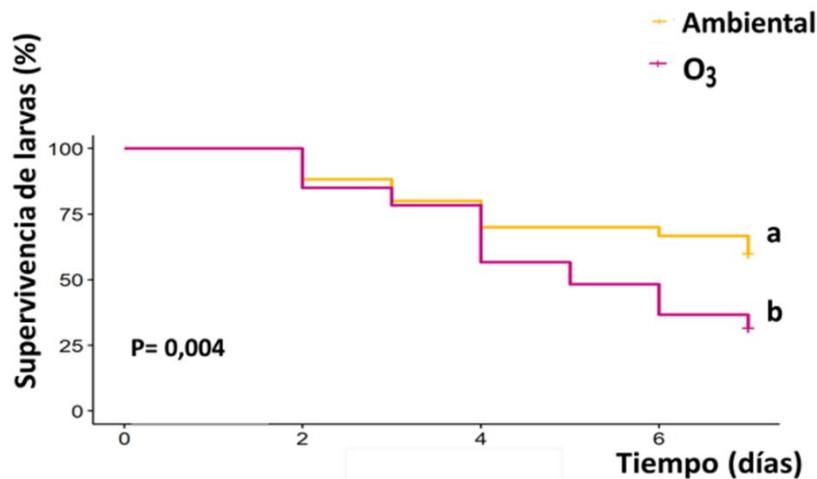


Figura 3.7 Supervivencia (%) de larvas de *S. frugiperda*, que se alimentaron de trifolios de soja durante una semana en cámaras con ambiente enriquecido con ozono (O_3) y en cámaras control (Ambiental). Año 2021. Log rank test (Chi cuadrado= 8,3; $P= 0,003$; $n= 60$). (Ambiental). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0.05$).

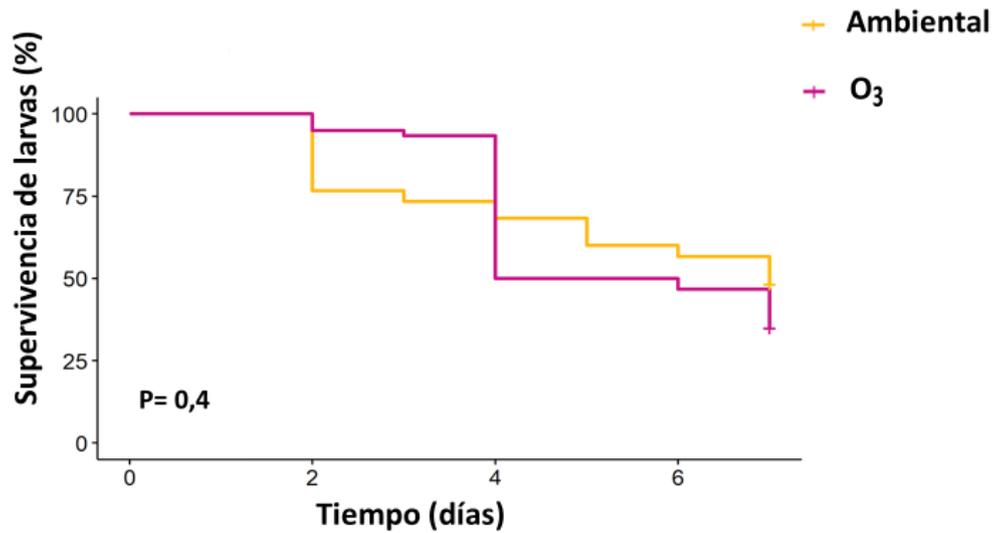


Figura 3.8 Supervivencia (%) de larvas de *S. frugiperda*, que se alimentaron de trifolios de soja durante una semana en cámaras con ambiente enriquecido con ozono (O₃) y en cámaras control (Ambiental). Año 2022. Log rank test (Chi cuadrado = 0,8; P= 0, 4; n= 60).

3.3.2 Crecimiento y desarrollo de larvas de *S. frugiperda*

Al final del experimento de supervivencia, se registró el peso de las larvas de *S. frugiperda*. Esta variable resultó significativamente mayor para el peso de las larvas (mg) que se alimentaron de folíolos de soja en cámaras con ambiente enriquecido en O₃. Además, estas larvas se notaban más corpulentas y robustas a simple vista. Estos resultados se repitieron en los dos años de experimentos (P=0,03 en 2021 y P=0,05 en 2022) (Figura 3.9 y 3.10).

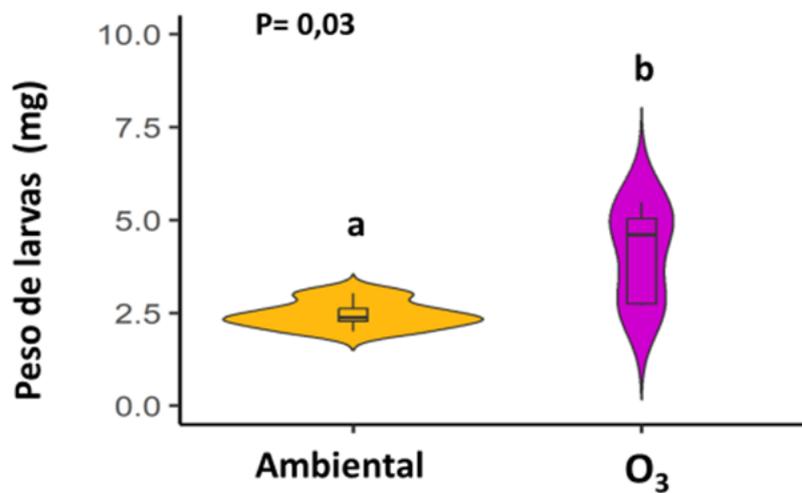


Figura 3.9: Peso promedio de larvas de *S. frugiperda* que se alimentaron de trifolios de soja durante una semana en cámaras con ambiente enriquecido con ozono (O₃) y en cámaras control o (Ambiental). Ensayo Año 2021. (test de wilcoxon, n= 53, W=23, P= 0,03). Las letras diferentes indican diferencias significativas (P< 0.05)

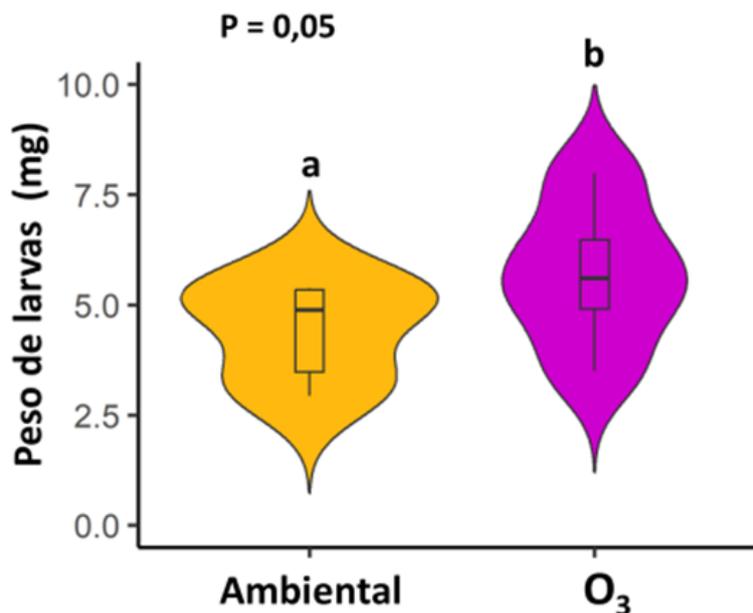


Figura 3.10 Peso promedio de larvas de *S. frugiperda* que se alimentaron de trifolios de soja durante una semana en cámaras con ambiente enriquecido con ozono (O₃) y en cámaras control (Ambiental). Ensayo Año 2022. (test de wilcoxon, n= 55, W=22, P= 0, 05). Letras distintas indican que las medias difieren significativamente entre sí (P<0.05)

Al final del experimento de supervivencia, se registró la longitud de las larvas (mm), sin evidenciar diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de

los dos años en que se realizó el experimento (año 2021 y 2022, $P=0,2$ y $P=0,6$ respectivamente). (Figura 3.11 y 3.12).

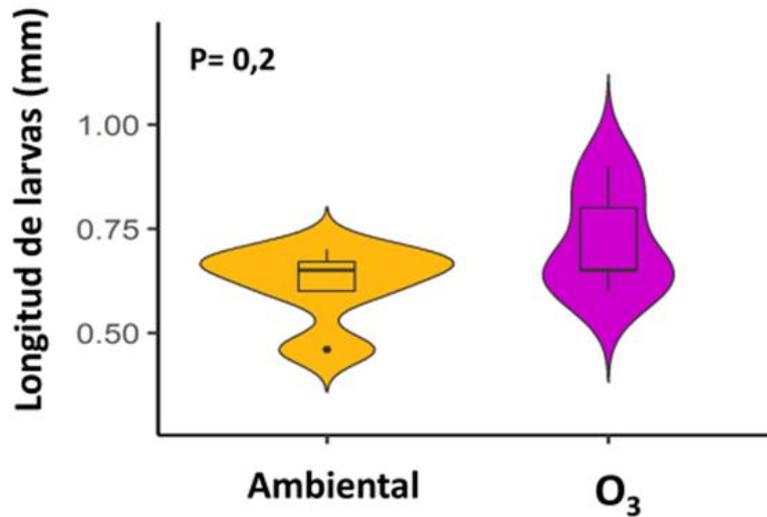


Figura 3.11 Longitud de larvas de neonatos de *S. frugiperda*, medida en milímetros, que se alimentaron de trifolios de soja durante una semana en cámaras bajo tratamiento con ozono (O₃) (color morado) y cámaras control (Ambiental) (color amarillo). Ensayo Año 2021. (Prueba t de welch, $t= 1,48$; $P= 0,17$; $n= 53$).

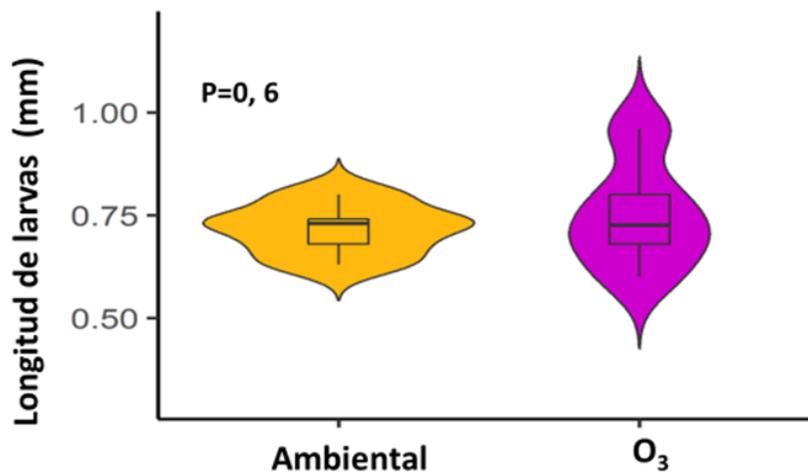


Figura 3.12 Longitud de larvas de neonatos de *S. frugiperda*, medida en milímetros, que se alimentaron de trifolios de soja durante una semana en cámaras bajo tratamiento con ozono (O₃) (color morado) y cámaras control (Ambiental) (color amarillo). Ensayo Año 2022. (Prueba t de welch, $t= 0,54$; $P= 0, 6$; $n= 55$).

3.3.3 Inhibidores de proteasas en hojas de soja

Se observó que la herbivoría por larvas de *S. frugiperda* durante 24h, (figura 3.5) provocó un aumento en la actividad de inhibidores de tripsina, en las plantas provenientes de las cámaras control (Ambiental). Sin embargo, el tratamiento de herbivoría en las cámaras con ozono crónico mostró una disminución de la actividad de los inhibidores de tripsina. Es decir, los niveles de tripsina, que son IP, fueron significativamente menores en las muestras de hojas de soja provenientes del tratamiento con herbivoría y ozono crónico (O_3), respecto del control (Ambiental) (interacción H x O_3 $P < 0.05$).

Por otro lado, el tratamiento de 72h de herbivoría con larvas de *S. frugiperda*, no mostró diferencias en la actividad de inhibidores de tripsina en las plantas ubicadas en las cámaras control (Ambiental) respecto del tratamiento de 24 y 72 h. Sin embargo, en el tratamiento con herbívoros y ozono crónico se incrementaron significativamente los valores de inhibidores de tripsina a las 72h respecto del tratamiento con herbívoros ambiental. Es decir, se observó una interacción de los dos factores (H x O_3 $P < 0.05$) a las 72h, provocando una alta inducción de la actividad de los inhibidores de tripsina. (Figura 3.13).

El contenido de proteínas (mg/g de peso fresco) no mostró diferencias entre los tratamientos ($P = 0.2$, Figura 3.14)

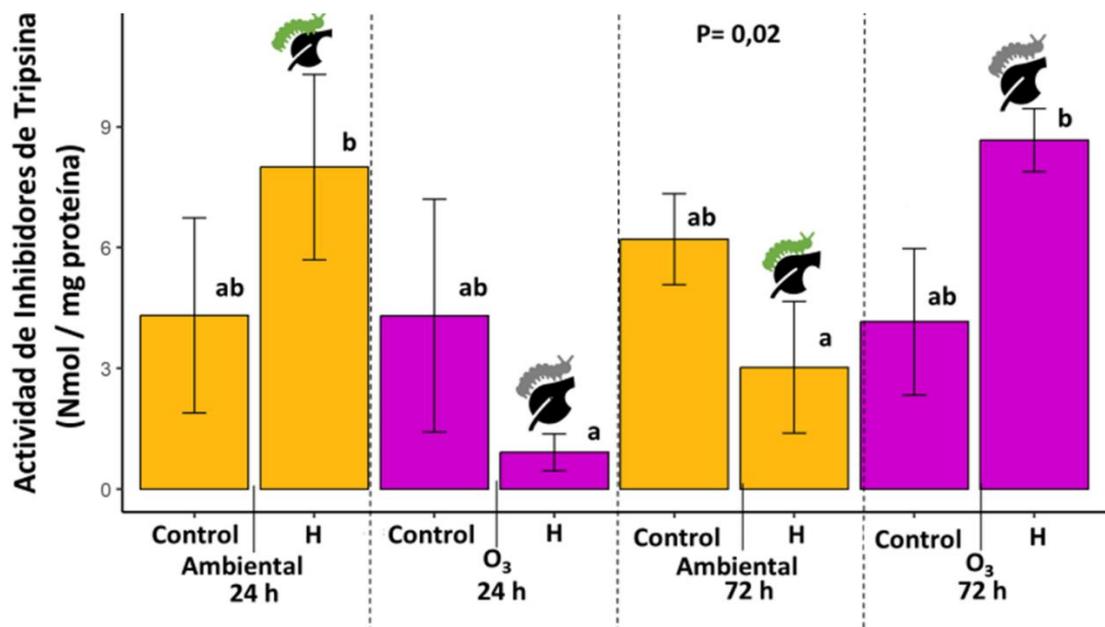


Figura 3.13 Actividad de inhibidores de tripsina en hojas de soja en tratamiento control (Ambiental) (barras color amarillo) y con ozono (O_3) (barras color morado), sometidas al daño causado por larvas de *S. frugiperda* H, durante 24 y 72 h. Ambiental 24h; Ambiental + H 24 h, O_3 24 h; O_3 + H 24 h (Ambiental 72 h; Ambiental + H 72 h; O_3 72 h; O_3 + H 72 h). Letras diferentes representan diferencias significativas. Comparando todos contra todos (ANOVA, $P=0,02$; $n=3$) $P<0,05$

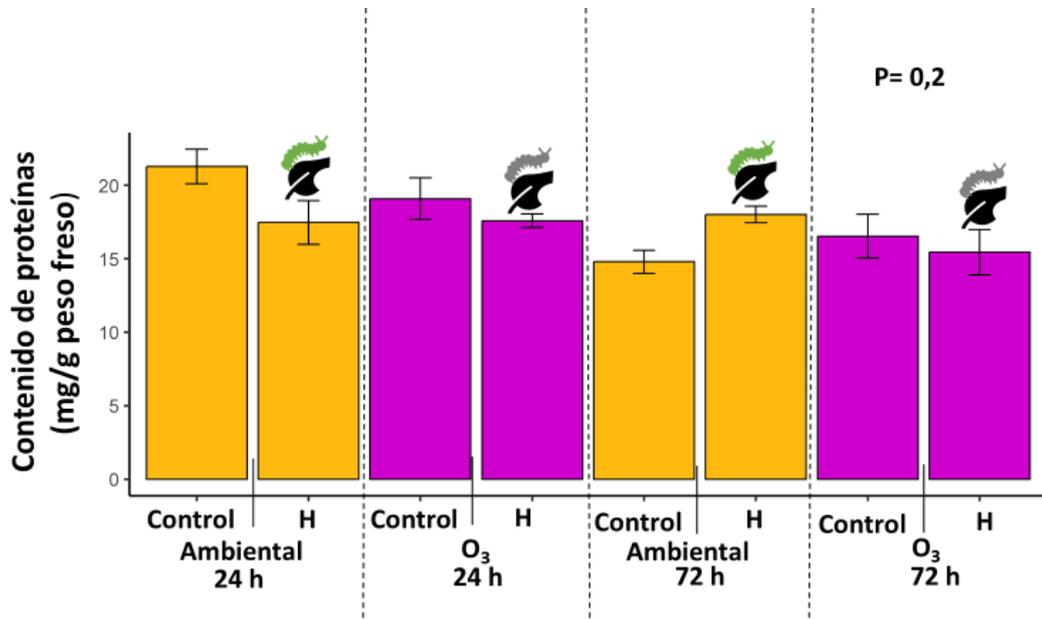


Figura 3.14 Contenido de proteínas Bradford (mg/g) en hojas de soja en tratamiento con ozono crónico (O_3) y Ambiental. Sometidas al daño causado por larvas de *S. frugiperda* H durante 24 y 72 h (Ambiental 24h; Ambiental + H 24 h, O_3 24 h; O_3 + H 24 h; Ambiental 72 h; Ambiental + H 72 h; O_3 72 h; O_3 + H 72 h). (ANOVA, $P=0,18$, $n=3$).

3.3.4 Actividad de tripsina

En el análisis de los extractos de intestinos de las larvas que consumieron folíolos de soja dentro de cámaras con ozono crónico, durante siete días, mostró una tendencia de menor actividad de las enzimas serin proteasas, pero sin diferencias significativas respecto de las larvas en cámaras control (Ambiental) (Figura 3.15, $P=0,3$).

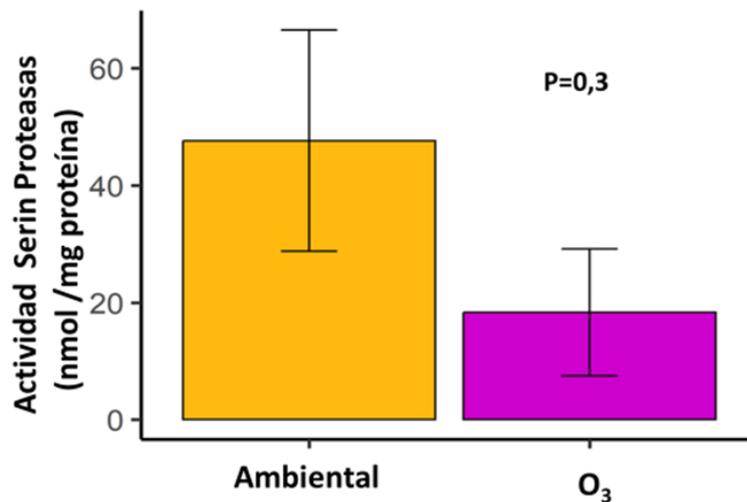


Figura 3.15 Actividad enzimática de serin proteasas (nmol/mg proteína) de extractos digestivos de intestinos de larvas de *S. frugiperda* que se alimentaron de plantas de soja con ozono (O₃) (barra color morado) y control (Ambiental) (barra color amarillo) desde neonatos hasta cuarto estadio. Año 2022. (ANOVA, $P=0,3$; $n=3$)

3.3.5 Cuantificación de los compuestos fenólicos en hojas

En las figuras 3.16 y 3.17, se observan los niveles de genistina y diadzina respectivamente, en las muestras de las hojas tanto para el tratamiento con herbivoría y ozono crónico como para el control a las 24 y 72h. En el tratamiento con herbívoros (ambiental) a las 24h, se observan los niveles más bajos de estos compuestos. En presencia de ozono aumenta la concentración tanto de isoflavonoide genistina como de diadzina, a las 24h. Sin embargo, los valores más altos se alcanzaron a las 24h en la interacción de ozono y herbivoría, mostrando diferencias significativas ($P<0.05$). La interacción tratamiento x tiempo fue significativa para ambos compuestos ($P=0.01$, Figura 3.16 y 17)

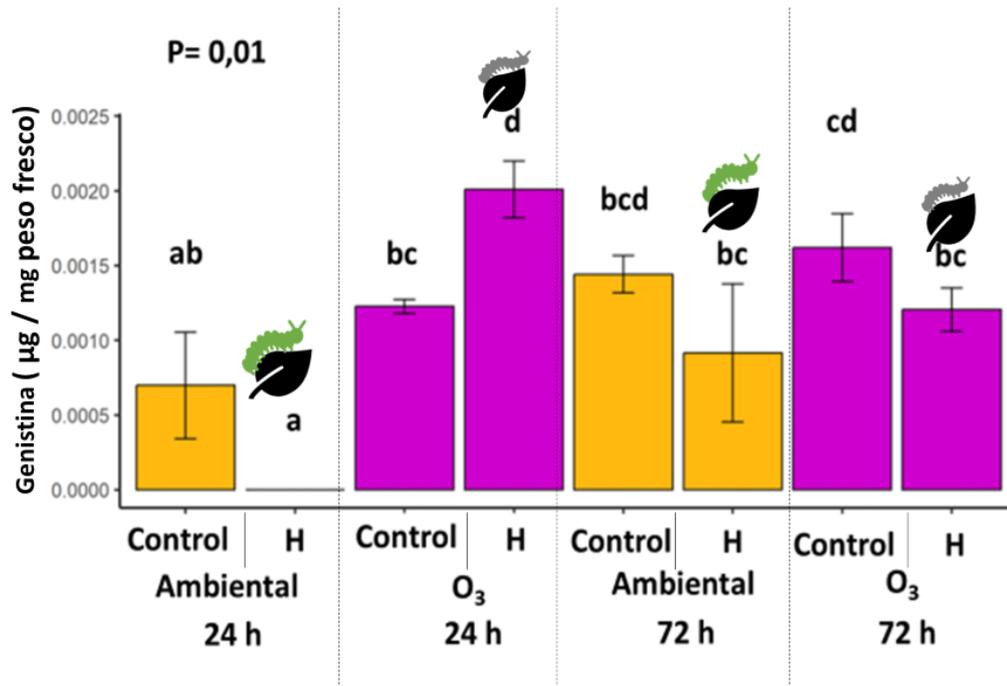


Figura 3.16. Isoflavonoide (Genistina) presente en las hojas de soja en tratamiento con ozono (O₃) (barras color morado) y control (Ambiental) (barras color amarillo), sometidas herbivoría de *S. frugiperda* (H) durante 24 y 72 horas. (Ambiental 24 h, Ambiental + (H) 24 h; O₃ 24 h, (control); O₃ 24 h + (H); Ambiental 72 h, Ambiental + (H) 72 h y O₃ 72 h, O₃ + (H) 72 h). Letras diferentes entre todos los tratamientos representa diferencias significativas (ANOVA, valor de P= 0, 01; n=3). P<0,05

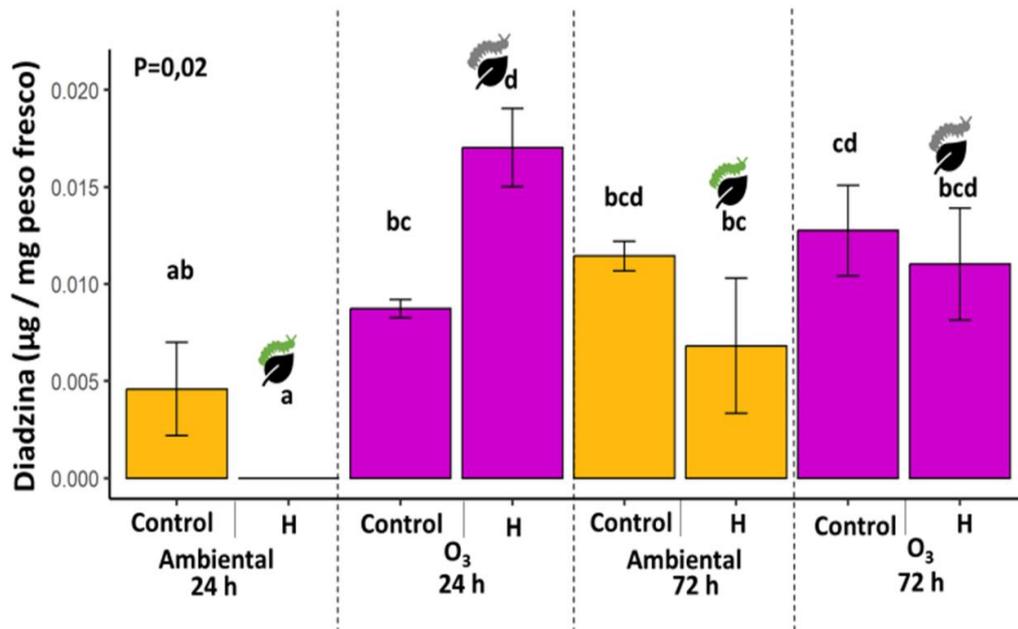


Figura 3.17. Isoflavonoide Diadizina (µg/mg peso fresco) presente en las hojas de soja provenientes del tratamiento con ozono (O₃) (barras color morado) y del control (Ambiental) (barras color amarillo), sometidas al daño causado por larvas neonatos de *Spodoptera frugiperda* (H) durante 24 y 72 horas. (Ambiental 24 h, Ambiental + (H.) 24 h; O₃ 24 h, (control); O₃ 24 h + (H); Ambiental 72 h, Ambiental + (H.) 72 h y O₃ 72 h, O₃ + (H.) 72 h). Letras diferentes representan diferencias significativas comparando todos contra todos los tratamientos (ANOVA, valor de P= 0, 02; n=3) (P<0,05).

3.4 DISCUSIÓN

Se ha explorado la interacción entre la soja, la contaminación con ozono crónico y uno de los insectos herbívoros que causan daños a la soja, *S. frugiperda* en estadio larval. Una de las expectativas era que las concentraciones altas de ozono crónico pudieran disminuir los niveles de IP presentes en las hojas. Sin embargo, los resultados obtenidos arrojan un panorama más complejo. La producción de flavonoides contra los herbívoros en soja aumentó significativamente a las 24h con tratamiento de herbivoría, en al ambiente con altos niveles de O₃ troposférico. Resultando diferente de la situación con herbivoría en un ambiente sin ozono o ambiental. Es decir, la herbivoría y el ozono tienen un efecto sinérgico en la inducción de estos compuestos de defensa a las 24h. Sin embargo, unas horas más tarde se observó que los compuestos vuelven a niveles basales iniciales, pero igualmente mayores que en el tratamiento con herbívoros respecto al ambiente control. El escenario ambiental condiciona la producción de defensas, modificando la interacción planta-herbívoro.

Las plantas de soja despliegan una resistencia natural frente a la herbivoría. Cuando las larvas de *S. frugiperda*, se alimentan de las hojas, pone en marcha sus defensas biológicas. Una de sus defensas es la producción de IP. La herbivoría indujo la producción de tripsina, que es un IP, luego de 24 horas de exposición al daño causado por *S. frugiperda*. El aumento de la producción de IP frente a la herbivoría es una respuesta inducida (Mithöfer & Boland, 2012). Sin embargo, un ambiente con ozono y herbívoros provocó que estos valores sean menores hasta que, a las 72 horas con herbivoría, los niveles de IP no solo volvieron a niveles basales, sino que sobrepasaron los niveles presentes en las plantas control. Esto indicaría que el ozono crónico tiene un efecto que aparentemente consiste en retrasar la inducción de la respuesta defensiva de la soja ante las larvas de *S. frugiperda*. En otras palabras, la presencia de ozono manifestó un cambio en la dinámica de respuesta ante el daño e interfirió en la interacción planta-herbívoro.

En la literatura se encontró que, en general las plantas aumentan su susceptibilidad a la herbivoría ante el estrés causado por ozono. Esto se debe a los cambios bioquímicos inducidos, que incluyen un incremento en la disponibilidad de nitrógeno y acumulación de carbohidratos (Jøndrup et al., 2002; Booker & Miller, 1998; Sugai et al., 2020; Islam et al., 2022). Sin embargo, en esta tesis se observó que el ozono crónico aumentó las defensas antiherbívoro. Además, los resultados sugieren que

la interacción entre el ozono y la soja afecta la respuesta a la herbivoría de manera diferenciada a lo largo del tiempo, abriendo nuevas perspectivas sobre cómo los factores ambientales pueden modular dichas interacciones.

3.4.1 El ozono crónico como modulador de los flavonoides presentes en soja.

Los flavonoides se producen como respuesta de la planta frente a daño oxidativo por ozono, o por el daño de algunos insectos (Papazian et al., 2016; Lee & Goto, 2022). La concentración de flavonoides varía en función del cultivar y de los factores de estrés al que se somete la soja. Tanto la diazina como la genistina son dos flavonoides que se mencionan como constitutivos. Se documentó que la genistina produce efectos adversos en lepidópteros como *Heliothis zea* (Piubelli et al., 2003). Los extractos de soja que contienen genistina, redujeron el peso de las larvas y pupas (Kikuta, 2020). En el estudio de (O'Neill et al., 2010) también se menciona que el daño de otro insecto, *P. japónica*, indujo la síntesis de flavonoides en hojas. La resistencia de la soja a algunos lepidópteros puede deberse a los flavonoides quercetina y genistina, responsables de la menor ganancia de peso y de una mayor mortalidad de larvas del lepidóptero, *A. gemmatilis*. Los flavonoides aumentan en respuesta a herbivoría (Wallis & Galarneau, 2020). Altas concentraciones de ozono intensificaron las respuestas al daño por coleópteros, produciendo una mayor abundancia de ARNm de defensas provocando un aumento de antioxidantes en respuesta al estrés vía de los fenilpropanoides (Casteel et al., 2008).

Según nuestros resultados, cuando la planta interacciona con dos factores de estrés (herbivoría + ozono) el efecto de los dos estresores parece tener un efecto sinérgico en la inducción de flavonoides. El efecto del ozono crónico y la acción de la herbivoría desencadena en las hojas la producción de compuestos fenólicos como la genistina y la diadina como respuesta de defensa.

3.4.2 Efecto del ozono crónico en la supervivencia, el peso y la longitud de las larvas de *S. frugiperda*.

Está documentado que, cuando se adiciona quercetina y rutina a una dieta de larvas, las orugas de Lepidoptera: Noctuidae disminuyen su peso, y además puede provocar mortalidad y aumento del período pupal (Da Silva et al., 2018). Aunque los IP de la soja pueden disminuir la digestión de las larvas, estas han desarrollado respuestas

adaptativas que les permiten persistir en su alimentación de la planta. *Spodoptera frugiperda*, como un insecto polígrafo, ha evolucionado para alimentarse de una variedad de especies, incluyendo la soja. Este lepidóptero tiene la capacidad de modular sus proteasas intestinales en respuesta a cambios en la calidad proteica de su dieta, adaptando su fisiología cuando las enzimas presentes en su tracto digestivo son ineficaces o ineficientes. Las isoformas intestinales, que son diferentes variantes de las enzimas, pueden tener implicancias en la capacidad de la larva para digerir y utilizar los nutrientes presentes en las distintas especies de plantas, entre ellos la soja (Srinivasan et al., 2006). Esta interacción dinámica entre la producción de IP por parte de la soja y las respuestas adaptativas de las larvas ejemplifica el proceso de coevolución entre las plantas y sus herbívoros.

Nos preguntamos cómo el aumento pronosticado en las concentraciones de ozono podría influir en esta adaptación alimentaria en larvas de *Spodoptera sp.* De acuerdo con los antecedentes, el ozono afecta la calidad de la dieta, al modificar el nivel nutricional de las hojas e indirectamente incide en el desempeño de los insectos (Ladányi et al., 2012). Altas concentraciones de ozono provocaron que las larvas de *E. autumnata* crecieran menos (Peltonen et al., 2010) y un peor desempeño, resultaron en pupas más livianas (Papazian et al., 2016). Entonces, formulamos la hipótesis de que los niveles elevados de ozono provenientes de la contaminación ambiental podrían disminuir tanto el peso como la longitud de las larvas, además de reducir su tasa de supervivencia. Los resultados confirmaron parte de nuestra predicción. El ozono crónico afectó la supervivencia final del insecto, pero contrariamente a otros resultados de la literatura, el efecto del ozono produjo un aumento en el peso de las larvas. Esto podría deberse a una disminución en la calidad de las hojas, que lleva a que las larvas consuman una mayor cantidad de área foliar para compensar la calidad nutricional. El ozono en las plantas provoca cambios bioquímicos, modificando la accesibilidad y alterando la calidad de sus hojas (Booker & Miller, 1998). Además, reduce los niveles de pigmentos como clorofila y carotenoides en la soja, lo que afecta negativamente la fotosíntesis y la disponibilidad de carbohidratos y aminoácidos utilizados por los insectos para su crecimiento (Sun et al., 2014). La acumulación de compuestos fenólicos y la inducción de inhibidores de plantas expuestas al ozono (O₃) parecen estimular el consumo por parte de la larva (Da Silva et al., 2018) y también en coleópteros (Zavala et al., 2008). Este comportamiento de compensación alimentaria es una estrategia adoptada por los insectos para diluir el efecto de las defensas presentes en

la planta (Zavala et al., 2004). Los resultados de este capítulo están en concordancia con el marco teórico ya que muestran un aumento significativo en el peso de las larvas que se alimentaron de folíolos de soja en cámaras con ozono, patrón que se repite en ambos años del experimento (Figura 3.9 y 3.10).

Si bien las larvas muestran una mayor ingesta de tejido foliar provocado por la disminución en la calidad nutricional causada por el ozono, esta adaptación resulta finalmente en una menor supervivencia. Dado que el ozono aumenta los antioxidantes en las plantas, también pudo haber afectado el desempeño y la supervivencia de las larvas de soja. Los antioxidantes adquiridos por los herbívoros a través del consumo de tejidos de las plantas son cruciales, pero no todos los antioxidantes vegetales son beneficiosos para los insectos (Ojalá et al., 2005). Estos hallazgos coinciden con investigaciones previas (Sugai et al., 2020), donde se observó una reducción en la población de un coleóptero bajo altas concentraciones de ozono a lo largo del tiempo. No obstante, la disminución de digestibilidad de los tejidos y la necesidad del insecto de consumir más cantidad de hoja, para compensar la baja calidad, como también la necesidad de detoxificar esos compuestos pudo haber resultado en una menor supervivencia final de larvas provenientes de las cámaras que fueron sometidas a tratamiento con ozono crónico. Vale mencionar que las hojas de las cámaras del tratamiento con ozono progresivamente se veían de aspecto coriáceo, con manchas resultantes de la oxidación por ozono.

3.4.3 El impacto de los inhibidores de tripsina sobre desempeño de las larvas de *S. frugiperda*.

La capacidad de *S. frugiperda* para alimentarse y desarrollarse en plantas de soja se basa en su habilidad para adaptar su fisiología digestiva a la nueva dieta. Un grupo de inhibidores bien estudiado son aquellos que afectan las serin proteasas, incluyendo la tripsina y quimotripsina, fundamentales en la digestión de proteínas. Sin embargo, aún no se ha comprendido completamente la interacción entre las enzimas digestivas y la adaptación de las larvas a estas defensas. Estudios previos han mostrado que cuando las larvas de *S. frugiperda* se exponen a dietas con IP, su crecimiento se ve afectado negativamente (Hafeez et al., 2021). La adaptación a una nueva dieta conlleva una disminución en sus parámetros individuales, ya que el insecto necesita ajustar su actividad digestiva al nuevo alimento.

Nuestra hipótesis se centró en cómo las altas concentraciones de ozono podrían reducir la calidad de las hojas de soja, lo que probablemente incrementaría la actividad de las tripsinas intestinales. Investigaciones previas sugieren que larvas de *S. frugiperda* alimentadas con dietas ricas en IP mantuvieron niveles de supervivencia, crecimiento y peso de pupa similares al grupo control con dieta sin inhibidores (Paulillo et al., 2000). Estudios in vitro también mostraron que la actividad enzimática en los extractos intestinales de larvas no se veía afectada por los inhibidores (Paulillo et al., 2000; Brioschi et al., 2007). Las larvas de *S. frugiperda* podrían superar los IP mediante un aumento en la actividad de la tripsina, permitiéndoles alimentarse de la soja. Sin embargo, no sabíamos cómo el ozono crónico impactaría en esta dinámica. Los resultados de este capítulo arrojaron luz sobre la relación entre las larvas de *S. frugiperda* y la soja, donde las larvas logran alimentarse a pesar de los inhibidores. Sin embargo, esta adaptación de las larvas se ve comprometida por el ozono crónico. Las altas concentraciones de ozono provocaron una reducción en la actividad enzimática de extractos digestivos de los intestinos. Esta reducción en la actividad enzimática podría influir en el crecimiento de las larvas, incluso llevándolas a la muerte.

En síntesis, este estudio destaca la importancia crucial de los IP y cómo esta relación se modifica debido al ozono crónico, contribuyendo así a una comprensión más profunda de las interacciones complejas entre las defensas de las plantas y las respuestas adaptativas de los herbívoros. Los resultados obtenidos en esta tesis, podría ser particularmente relevante, ya que es pionera en abordar el efecto del ozono crónico en la interacción entre la soja y el lepidóptero *S. frugiperda*, lo que añade un nuevo nivel de comprensión sobre cómo los factores ambientales pueden influir en las relaciones entre las plantas y los herbívoros que se alimentan de ellas.

3.5 CONCLUSIÓN

Las larvas de lepidópteros se alimentan de la soja a pesar de los IP. Sin embargo, esta adaptación se ve comprometida por el efecto del ozono. El ozono crónico interfiere en la accesibilidad de las larvas de *S. frugiperda* al alimento. Esta reducción en la actividad enzimática probablemente influye en el desempeño de las larvas, disminuyendo su supervivencia. En este capítulo se destaca la importancia crucial de los IP y de los flavonoides en esta triple interacción.

Es importante distinguir los efectos indirectos del ozono crónico, que se produjo cuando las larvas se alimentaron dentro de las cámaras con fumigación con ozono de la soja, de los efectos directos del ozono sobre el insecto. Este bioensayo permitió mostrar cómo esta relación entre la planta y el herbívoro se modifica debido al impacto del ozono crónico, contribuyendo así a la comprensión de las interacciones entre la soja y las respuestas adaptativas de las larvas de *Spodoptera frugiperda*.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN GENERAL

4.1 CONTEXTO GENERAL

El ozono troposférico (O₃) es un contaminante secundario del aire, el tercer gas de efecto invernadero más importante, en las últimas décadas. La contaminación superficial por ozono se ha convertido en un importante problema de calidad del aire para la salud humana, la biodiversidad y el clima en todo el mundo. Impactando también en la economía, provocando pérdidas millonarias por sus efectos en la productividad de los cultivos y poniendo en riesgo la seguridad alimentaria.

4.1.1 "Implicancias de la contaminación ambiental por ozono crónico en la productividad y fenología de la soja"

Los primeros estudios científicos sobre el efecto del ozono crónico en las plantas de soja se centraron en parámetros fisiológicos como la apertura estomática, la conductancia y su interacción con la edad de las hojas (Fiscus, 1995; Singh et al., 2009). Posteriormente, se amplió la investigación hacia otros procesos funcionales y se prestó atención a la parte subterránea de las plantas para relacionar los efectos del ozono en la dinámica "fuente-sumidero". En este contexto, se encontró que el estrés oxidativo causado por el ozono podría alterar la partición de fotoasimilados, llevando a una mayor asignación de nitrógeno hacia los brotes y destinos reproductivos en detrimento de la parte subterránea (Feng & Kobayashi, 2009; Avnery et al., 2011; Betzelberger et al., 2012; Zhang et al., 2014; Biancari et al., 2021). Otros autores observaron una modificación en la fisiología de las raíces por efecto de las altas concentraciones de ozono (Tisdale et al., 2021). Además, varios autores señalan que a medida que avanza el ciclo del cultivo, se desencadenan cambios en la parte aérea de la planta, resaltando la relación temporal de los efectos del ozono. Por ejemplo, los estudios de Morgan et al., (2003) y Tisdale et al., (2021), demostraron que las altas concentraciones de ozono durante la etapa vegetativa tuvieron un impacto limitado en el rendimiento, pero se volvieron determinantes hacia el final del ciclo, durante el llenado y la maduración de las semillas. Esto podría atribuirse al papel crucial desempeñado por la cubierta seminal en la provisión de nutrientes (carbono y nitrógeno) para el desarrollo de las semillas (Leisner et al., 2014). Los daños visibles causados por el ozono durante el período crítico del cultivo, las típicas manchas cloróticas o las lesiones en forma de puntuaciones promedio aumentaban a medida que avanzaba la etapa de crecimiento de la soja (Gosselin et al., 2020). También se identificó una relación directa negativa entre

estas lesiones cloróticas o necróticas y el desarrollo de vainas y otros componentes del rendimiento. En resumen, se puede afirmar que existen resultados consistentes que respaldan la conclusión previamente establecida por (Egli, 1993) resaltando que las etapas posteriores a la floración, en contraposición a las fases vegetativas, ejercen una influencia considerable en el rendimiento. Es en este período crítico las reducciones en el crecimiento tienen un impacto marcado en la productividad de la soja (Kantolic, 2008). Es importante destacar que solo se identificaron dos estudios que evaluaron el impacto del ozono en el desarrollo reproductivo de la soja y su influencia en su fenología. La fase reproductiva de la soja representa un período crítico, siendo altamente vulnerable a la influencia de factores abióticos. Investigaciones realizadas por Booker & Miller, (1998) y Reid et al., (1999) exponen evidencias que indican que altas concentraciones de ozono en el ambiente anticipan el inicio de la etapa reproductiva, provocando un adelanto en el período de floración. Estos autores no solo llevaron a cabo sus estudios hace varios años, sino que también consideraron múltiples factores en combinación con el ozono. Por lo tanto, esta tesis buscó ampliar este campo de estudio en una perspectiva más actual y evaluando específicamente el factor ozono crónico.

A pesar de ser esencial evaluar los efectos del ozono tanto en la parte aérea como en la subterránea de las plantas, la revisión bibliográfica muestra que la mayoría de los estudios se han centrado en la parte aérea. En este estudio, se continúa evaluando los efectos en la parte aérea debido a la fuerte correlación con el número de vainas y semillas, que son elementos esenciales para el rendimiento final en el cultivo de soja. Además, resulta crucial actualizar la evaluación del impacto del ozono como agente oxidante en el crecimiento, la fisiología, la fenología y en el rendimiento, tal como lo resalta (Li et al., 2021).

El proceso de búsqueda bibliográfica realizado arrojó que los estudios que abordan los efectos del ozono en las plantas alcanzan un consenso general con relación al efecto notable en el proceso de fotosíntesis (Morgan et al., 2004; Betzelberger et al., 2010; Betzelberger et al., 2012; Zhang et al., 2014). Esta influencia se traduce en una reducción en la longevidad de las hojas y, en última instancia, en un proceso de senescencia anticipada (Fuhrer, 2003). Además, varios estudios convergen en el impacto negativo del ozono en la productividad de la soja, resultando en una marcada disminución en los rendimientos. Ejemplos de esto pueden encontrarse en trabajos como los de (Morgan et al., 2006; Singh et al., 2009; Singh & Agrawal, 2011; Gillespie et al., 2011; Agathokleous, 2018; Tisdale et al., 2021; Chaudhary et al., 2022; Li et al., 2021).

Por otro lado, se identifica una falta de consenso en el papel desempeñado por los antioxidantes como respuesta al daño oxidativo ocasionado por el ozono. Varios autores, no coinciden en el papel que se les atribuyen a estos componentes en la defensa de la planta (Andersen, 2003; Booker & Fiscus, 2005; Singh et al., 2009 ; Betzelberger et al., 2010). No obstante, ciertos estudios argumentan que los niveles de ácido ascórbico y flavonoides en la planta pueden influenciar su capacidad de defensa. Algunos autores sostienen que los niveles de ácido ascórbico y flavonoides en la planta determinan su capacidad de defensa (Mao et al., 2017; Chaudhary et al., 2022). Permitiendo a la planta modular la disminución de los rendimientos debido a la exposición crónica al ozono. Sin embargo, este aspecto aún carece de exploración en profundidad.

Se estima que para el año 2050, la concentración global de ozono superará los 60 ppb, un nivel que ya ha demostrado causar daños a los cultivos, lo que plantea una amenaza creciente para los agricultores. La soja, en particular, es especialmente susceptible al ozono, lo que agrega preocupaciones adicionales (Li et al., 2021). En este contexto, la fase reproductiva de la soja, en especial la etapa de floración emerge como un período crítico en su ciclo de cultivo, altamente vulnerable a diversos factores abióticos. A pesar de su rol fundamental en la producción de granos y oleaginosas, no se han encontrado investigaciones específicas en Argentina que aborden esta problemática. No obstante, se identificó un único estudio realizado en 2008 que abarca las provincias de Córdoba y Salta. En el cual analizaron los valores de monitoreo de la concentración de ozono y la calidad del aire, y documentó niveles elevados de ozono en estas dos provincias productivas de Argentina. Los autores informaron daños visibles atribuibles al ozono en plantas espontáneas y agroecosistemas, y subrayaron la necesidad de realizar experimentos a campo para evaluar los daños en los cultivos (Bergweiler et al., 2008) En consecuencia, esta tesis representa el primer análisis experimental de los efectos del ozono crónico en el cultivo de soja en toda la región.

4.1.2 "Exposición crónica al ozono: Interacción entre la soja y la larva de *Spodoptera frugiperda* - Desafiando las defensas"

Con el aumento de la población mundial previsto para los próximos años, un objetivo primordial consiste en resguardar la seguridad alimentaria, incrementando la producción global de cultivos de interés agronómico. Asimismo, uno de los factores que

más afecta la productividad de los sistemas agrícolas son las adversidades fitosanitarias (insectos herbívoros, organismos patógenos, etc.), que pueden llegar a causar pérdidas significativas en los rendimientos. En un contexto de cambio climático es de sumo interés evaluar cómo impacta el efecto del ozono troposférico las interacciones entre los cultivos y los insectos.

Según la teoría de la coevolución, las plantas y los insectos generan fuerzas selectivas que llevan a la evolución de las defensas de las plantas (producción de metabolitos secundarios) y defensas del herbívoro (capacidad de desintoxicarse) en el proceso coevolutivo (Montesinos, 1996). Los cambios inducidos por la actividad humana pueden modular los factores abióticos como el CO₂ atmosférico, la luz ultravioleta (UV) y los niveles de ozono (O₃). Estos factores pueden influir, por ejemplo, en las tasas de herbivoría (Bidart-Bouzat & Kliebenstein, 2008). En este contexto, resulta de importancia comprender con mayor detalle los mecanismos de defensas que las plantas activan frente al ataque de insectos y como estos mecanismos son regulados por factores del ambiente. Uno de los primeros estudios que informó que la inducción de compuestos de defensa (glucosinatos) activada luego de los daños de los herbívoros podía verse afectada por variaciones en los factores climáticos fue en 2008 (Bidart-Bouzat & Kliebenstein, 2008). También las defensas físicas como, por ejemplo, los tricomas y diversos metabolitos secundarios como: fenólicos, terpenos, ceras, poliaminas, proteínas inhibidoras de proteasas, presentaron incrementos en experimentos con cambios en el ambiente (exposición a UVB) (Demkura, 2010).

Un grupo de investigadores analizaron los cambios en la química troposférica y como esto afectaba la relación entre plantas e insectos herbívoros al cambiar la calidad de las hojas. En sus análisis sugirieron que la contaminación ambiental por ozono podía exacerbar los problemas de plagas de insectos, por el impacto en la química foliar que afecta la alimentación por sus variaciones en la calidad de la dieta (Dermody et al., 2008).

Luego de analizar el marco teórico, surge el siguiente interrogante:

¿Las sojas expuestas a ozono crónico se volverán más vulnerables o resistentes frente a la herbivoría?

Bajo la pregunta de si las plantas de soja expuestas a ozono crónico se vuelven más vulnerables o resistentes frente a la herbivoría, se observan resultados variables en

función de diversos factores. Las investigaciones previas han demostrado que las altas concentraciones de ozono pueden tener efectos perjudiciales en las plantas de soja, reduciendo la asimilación de carbono, nitrógeno y metabolitos primarios en las hojas, afectando además la calidad de la dieta de los herbívoros (Betzlberger et al., 2012; Zhang et al., 2014).

El aumento del ozono puede modificar el comportamiento alimentario de las larvas cuando se alimentan de hojas expuestas a ozono (Booker et al., 2005; Peltonen et al., 2010; Abu ElEla et al., 2018; Feng et al., 2021; Masui et al., 2021). Un estudio realizado en 2016 muestra que, aunque el ozono promovió la alimentación, las larvas que se alimentaban de las hojas mostraron un menor rendimiento individual, con menor desarrollo (Papazian et al., 2016). Otros estudios han sugerido que el ozono no afecta el contenido de nitrógeno en hojas y, por lo tanto, no modifica el ataque de los herbívoros (Hamilton et al., 2005; Dermody et al., 2008). Los resultados son contradictorios y resalta la complejidad de los efectos del ozono en las interacciones planta-herbívoro.

Además, se ha observado que el ozono puede inducir cambios en el sistema de defensas de las plantas, aumentando enzimas antioxidantes y compuestos fenólicos, y reduciendo el contenido de ácido ascórbico. Estos cambios no solo afectan directamente a la planta, sino que también tienen impactos indirectos en los herbívoros (Singh et al., 2009; Betzelberger et al., 2010, 2012; Singh et al., 2022). Altas concentraciones de ozono pueden intensificar las respuestas de defensa ante el daño de insectos, lo que puede mejorar la calidad nutricional de las plantas para los insectos, por ejemplo, a través del contenido de ac. ascórbico, pero también puede provocar la necesidad de aumentar las defensas directas, posiblemente reduciendo la aptitud de los insectos (Casteel et al., 2008).

La variabilidad observada en los resultados se debe a factores como la concentración de ozono, la especie de insecto y el tipo de planta. Las investigaciones aún son escasas, y aunque se ha avanzado en comprender los mecanismos fisiológicos que las plantas utilizan para contrarrestar los efectos del ozono, aún falta mucho por conocer sobre las interacciones en comunidades y ecosistemas, especialmente en entornos agrícolas (Agathokleous et al., 2020). Por lo tanto, se realizó el diseño de éste trabajo que evalúa la respuesta de la soja al efecto de dos factores de estrés (ozono crónico y herbivoría), teniendo en cuenta las concentraciones futuras previstas de ozono a nivel mundial y una especie determinada de insecto.

4.2 CONTRASTE DE LAS HIPÓTESIS

Los resultados obtenidos en los experimentos permitieron poner a prueba las hipótesis planteadas en la introducción de la tesis.

Hipótesis 1) Las altas concentraciones de O₃ ambiental provocan un estrés oxidativo que resulta en una disminución del rendimiento del cultivo de soja. (Capítulo 2)

- * **Predicción 1A)** Las altas concentraciones de O₃ ambiental crónico disminuirán el peso de vainas por planta y también el peso de semillas.
- * **Predicción 1B)** Las altas concentraciones de O₃ ambiental crónico disminuirán el número de vainas por planta y también el número de semillas.

Se cumple la predicción 1A) La exposición a altas concentraciones de O₃ crónico disminuyó el peso de las semillas (Fig. 2.9 A) y el peso de las vainas (Fig 2.9 B). Los resultados obtenidos en esta tesis respaldan la predicción formulada. Los datos respaldan parcialmente la Predicción 1B) ya que el efecto del ozono crónico mostró una tendencia a la disminución del número de semillas (Fig 2.9 C).

Durante las observaciones realizadas a lo largo del periodo de crecimiento y desarrollo de la soja en las cámaras, pudimos relevar que las plantas bajo tratamiento conservaban sus hojas de color verde intenso similares a las de las cámaras control. Incluso las plantas de las cámaras bajo tratamiento con ozono crónico fueron más altas. Probablemente, como dice el marco teórico, esto se deba a que el estrés oxidativo por ozono provoca una redistribución de fotosintatos hacia destinos de la parte aérea (hojas superiores, brotes, semillas). Hasta que sus defensas se lo permiten, pareciera que la planta intenta llegar rápido a producir semillas, reproducirse y así perpetuarse. Pero a medida que alcanza la floración y fructificación, las defensas comprometen su crecimiento y desarrollo, observándose una senescencia anticipada. Por lo que podemos sospechar que no hubo efectos claros del ozono durante el periodo de crecimiento, en concordancia con la literatura.

En coincidencia con otros autores. observamos que el efecto del ozono se vislumbra con el tiempo. Empezamos a visualizar hojas con daño oxidativo a medida que alcanzaban el periodo reproductivo, no antes. Los resultados confirman que, durante la etapa vegetativa, la maquinaria de defensa de la planta resuelve eficazmente su función. Sin embargo, a medida que avanza el ciclo del cultivo, el compromiso entre

crecer o defenderse cobra relevancia, provocando una disminución en los parámetros de rendimiento (número de semillas, peso de semillas). En relación con la plasticidad característica de la soja que le permite tolerar la herbivoría en su fase vegetativa, pareciera que también puede tolerar el efecto del ozono en etapas tempranas. En cambio, La producción de defensas frente a ozono en la etapa reproductiva parece comprometer su desarrollo.

Hipótesis 2) Altas concentraciones de O₃ ambiental crónico provocan cambios en la fenología del cultivo de soja. (Capítulo 2)

- * Predicción 2A). Altas concentraciones de O₃ ambiental crónico acelerarán el comienzo de la floración en soja.

Se encontraron evidencias que respaldan la hipótesis 2. Ya que las concentraciones de ozono a las que fueron sometidas las plantas de soja provocaron la anticipación en el comienzo de la fase reproductiva, comenzando a florecer antes que el control. (Fig. 2.7). Probablemente el desvío de recursos carbonados o de metabolitos primarios hacia la producción de defensas, induce a la planta a florecer antes y acelerar su estado reproductivo para alcanzar el objetivo de toda planta, que es dejar descendencia a través de las semillas, también citado por otros estudios (Hayes et al., 2012)

Hipótesis 3) Las altas concentraciones de O₃ ambiental crónico tienen un efecto acumulativo en las plantas que provoca la disminución en los compuestos de defensa. Esto se evidencia en el estadio V4. (Capítulo 3)

- * Predicción 3A) las altas concentraciones de O₃ ambiental disminuirán los niveles de inhibidores de proteasas en las hojas.
- * Predicción 3B) las altas concentraciones de O₃ ambiental crónico aumentarán la concentración de compuestos fenólicos, como los flavonoides.
- * Predicción 3C) las altas concentraciones de O₃ ambiental en combinación con la herbivoría de larvas de *Spodoptera* por 72h inducen menos niveles de compuestos defensivos en las hojas respecto del control inducido por herbivoría y con niveles de O₃ ambiental.

Los resultados muestran evidencias parciales en referencia a que las altas concentraciones de ozono crónico provocan la disminución de los compuestos de

defensas. Ya que si contrastamos la predicción 3A) el efecto del ozono no provoca la disminución de los valores de los IP a las primeras 24 horas del tratamiento. Los valores del control y del tratamiento resultaron ser iguales. Sin embargo, tras las 72 horas de exposición a ozono el efecto muestra una disminución en los niveles de los IP (Fig. 3.13). El efecto del ozono retrasa la capacidad de los IP para desempeñar las defensas antiherbivoría. Nuestros resultados respaldan la predicción 3B) ya que el ozono crónico y el efecto de la herbivoría provocaron un contundente aumento de los flavonoides (gensitina y diadzina), (Fig. 3.16 y 3.17).

No hay evidencias en los resultados obtenidos que respalden la predicción 3C) ya que debido a la combinación de factores (herbivoría 72 horas y altas concentraciones de ozono crónico) la soja induce mayor cantidad de IP. El ozono y la herbivoría muestran un efecto de sinergismo de ambos factores, ya que se triplica (pasa de un valor 3 a 9) los valores de IP por la incidencia de ambos factores. (Fig. 3.13).

Hipótesis 4) Altos niveles de O₃ tienen un impacto negativo en el crecimiento y desarrollo de larvas de *S. frugiperda* porque disminuye la calidad nutricional de sus hojas (Capítulo 3)

- * Predicción 4A) las altas concentraciones de O₃ ambiental disminuirá la supervivencia, el peso y longitud de las larvas herbívoras.
- * Predicción 4B) la exposición a altas concentraciones de O₃ ambiental aumentará la actividad de tripsina en el intestino.

Hay evidencias parciales para la predicción 4A), ya que las altas concentraciones de ozono provocaron la menor supervivencia de las larvas de *Spodoptera frugiperda* de las cámaras bajo tratamiento (Fig. 3.7). Sin embargo, las larvas que se alimentaron de soja en cámaras con altas concentraciones de ozono registraron mayor peso (medido en mg) (Fig. 3.9 y 3.10) y longitud (medido en cm) de larvas. (Fig. 3.11 y 3.12).

Con respecto a la predicción 4B), los resultados sugieren una posible tendencia del efecto del ozono sobre la actividad de las tripsinas intestinales de la larva, pero se requiere un tamaño de muestra más grande para determinar su significación. El ozono crónico parece disminuir la actividad de las tripsinas medida en intestinos de larvas de *Spodoptera sp.* que alimentaron de soja dentro de las cámaras con ozono crónico. Debería repetirse el ensayo con un mayor número de larvas.

4.3 ANÁLISIS DE LAS APLICACIONES E IMPLICANCIAS DE LOS RESULTADOS

4.3.1 Rol de los compuestos de defensa

En el Capítulo 2 de esta tesis, fue evaluado el desempeño de la soja frente a daño oxidativo por ozono crónico. Se evaluó el crecimiento vegetativo y los diferentes componentes del rendimiento. En coincidencia con la tendencia general los rendimientos de los cultivos caen por efecto del ozono. En este caso el registro del peso de las semillas fue aproximadamente 33 % menor bajo tratamiento con ozono crónico. A través de estos resultados se puede resaltar el efecto del ozono que se pronuncia a medida que avanza el ciclo del cultivo. El rendimiento de la soja se obtiene de las semillas cosechadas por unidad de superficie. El cultivo atraviesa dos fases muy importantes, una fase de crecimiento vegetativo y una fase reproductiva. La fase reproductiva comprende un período de formación de semillas y un período de llenado de semillas. Cada fase juega un papel en la formación del rendimiento a través de varios procesos fisiológicos que determinan el rendimiento final. La definición del rendimiento comienza con una fase de crecimiento vegetativo, desde la emergencia (VE) hasta el inicio de la floración (R1). En esta fase se forman órganos que luego serán importantes para producir biomasa mediante la fotosíntesis y la captación y asimilación de nutrientes. El ozono parece no haber afectado el crecimiento vegetativo, incluso la tendencia muestra un mayor número de vainas. El número de semillas, el componente más importante del rendimiento de la soja se determina durante la fase reproductiva, que abarca desde el inicio de la floración (R1) hasta poco después del inicio del llenado de las semillas (entre R5 y R6). En esta fase comenzamos a vislumbrar que el ozono empezaba a modular el rendimiento del cultivo y también registramos un adelanto de la fase de floración. Posiblemente la planta comience a declinar en su crecimiento debido a la necesidad de defenderse del ozono, repercutiendo en el número de semillas alcanzado. El período de llenado de semillas, donde se define el peso de las semillas se determina en gran medida, comenzando desde el período inicial de llenado de semillas (R5-R6) hasta el período final de semillas (R6-R7) (Vogel et al., 2021). La implicancia de estos resultados advierte sobre los efectos del ozono en etapas tardías en la definición del rendimiento. Con una tendencia a reducir el número de semillas, componente determinante del rendimiento y un contundente efecto en el llenado (R5,6 A R 6,7). El rendimiento final de la soja se construye desde la etapa vegetativa, pero se define en la

etapa final. Será muy importante seleccionar variedades con mayor cantidad de antioxidantes que le permitan atenuar el efecto del estrés por ozono y logrando así que afecte en menor medida los componentes del rendimiento. Williams es una variedad semideterminada que se adapta mejor a los factores ambientales adversos, pero nos preguntamos cómo se hubiera comportado bajo las mismas condiciones una variedad de crecimiento determinado. Por otro lado, el marco teórico advierte sobre el comportamiento de las variedades más nuevas, influenciadas por el mejoramiento vegetal en su respuesta a adversidades climáticas. Williams es una variedad comercial más antigua, que responde probablemente mejor frente a distintos factores abióticos, debido a sus defensas. No sabemos cómo se comportaría cualquiera de las variedades más sembradas en la actualidad, las que han desarrollado los semilleros para que alcancen más rendimientos pero que han perdido características que las hacían más rústicas y plásticas frente a estrés abiótico. Para las próximas investigaciones proponemos medir contenido de metabolitos primarios en ambas etapas tanto en la vegetativa como en la reproductiva, para así poder cuantificar el compromiso entre crecer y defenderse. En esta tesis se midió IP e isoflavonoides que son compuestos de defensa, pero sería necesario también medir otros compuestos secundarios como las hormonas SA, JA, ET y antioxidantes como el ácido ascórbico.

Por medio de este bioensayo, se evaluaron los compuestos de defensas antiherbivoría de la soja IP e isoflavonoides bajo tratamiento con ozono crónico, en el Capítulo 3. Si bien los estudios anteriores mostraban resultados contradictorios y no había coincidencias en referencia a si las plantas se vuelven más vulnerables frente a herbivoría en presencia de ozono, sorprendió este resultado por su complejidad. El efecto del ozono produjo una disminución en las defensas de IP luego de 24 horas de herbivoría de larvas, sin embargo, tras 72 horas el panorama cambia y la planta puede responder induciendo defensas ante el daño por larvas de *S. frugiperda*. El hecho que la soja no haya mostrado una rápida reacción de defensa ante el daño de los neonatos de *Spodoptera* podría significar un riesgo para la planta, ya que las larvas produjeron defoliación en el estado V4 entrando en R1, fase reproductiva donde la soja es más vulnerable a daño por insectos. Una de las posibles causas podría ser que en el ensayo se colocaron neonatos, si bien la soja reconoce y distingue el daño por insectos de otro tipo de daño, si las larvas hubieran sido de otro estadio quizás hubieran reaccionado más rápido. La planta induce defensas de todos modos bajo efecto del ozono, defensas que se oponen a la continuidad alimentaria del insecto. Vale aclarar nuevamente que así se

comportó esta variedad de soja, de hábito semideterminado y que es una variedad que no es producto del mejoramiento genético contemporáneo. Por ende, con más capacidad de defensas frente a diferentes tipos de estrés. Sería importante conocer cómo responde la misma variedad sometida a distintos factores ambientales limitantes simultáneamente, por ejemplo, condiciones de sequía, déficit nutricional, efecto de temperaturas y de radiación. ¿Podría la coexistencia de factores de estrés abiótico provocar un efecto sinérgico del ozono?

En futuras investigaciones sería útil evaluar el rol de otros compuestos como (ácido ascórbico, tocoferol, otros compuestos fenólicos beneficiosos para larvas, como los carotenoides, la quercetina). Algunos de estos compuestos pueden cumplir un rol relevante en la dieta del animal, resultando beneficioso para su desempeño. Ciertos compuestos de defensas que se producen para mitigar el daño oxidativo por ozono pueden indirectamente beneficiar a los insectos.

En esta tesis también se evaluó el comportamiento animal de larvas de *Spodoptera frugiperda* que se alimentaron de folíolos de soja en cámaras con ozono crónico y las comparamos con el control (sin ozono y sin larvas). Esto permitió demostrar cual fue el efecto del ozono en la interacción animal planta. El marco teórico arrojaba información confusa sobre la supervivencia de larvas, entonces resultaba interesante ponerlo a prueba. En estos resultados se brinda información útil. Las larvas que se alimentaron de soja con ozono consiguieron mejores pesos que las del tratamiento ambiental. Sin embargo, al final del ensayo algunas larvas de todos modos morían, y su mortalidad fue mayor en las cámaras con tratamiento de ozono crónico. Entonces se generaron muchas otras preguntas, que se asocian a las observaciones durante el ensayo y hacia la etapa de floración, las plantas con ozono ya empezaban a mancharse, a oxidarse por efecto del ozono mostrando un aspecto coriáceo. En consecuencia, parecía estar relacionado con uno de los comportamientos de los insectos ante dietas pobres, que es la compensación. Seguramente comieron más para compensar la mala calidad de las hojas bajo efecto del ozono. Como respuesta al ozono muchas plantas, aumentan las ceras, los compuestos fenólicos, que las hace más difícil de digerir. Resalto lo útil que hubiera sido poder medir digestibilidad del tejido, contenido de nitrógeno y ciertos metabolitos primarios y así poder determinar la calidad nutritiva de la hoja que consumieron las larvas. La información bibliográfica hace suponer que las larvas intentaron consumir más tejido para compensar la mala calidad del alimento proporcionado por la planta bajo efecto del ozono. No fue posible medir porcentaje de

daño por problemas operativos, pero hubiera sido útil. Tampoco pude medir daños directos del ozono sobre las larvas por las condiciones ambientales que se dieron hacia el final del ensayo de ese año, un exceso de temperaturas altas provoco la mortalidad de las larvas de primer estadio (neonatos). Esto se propone para investigaciones futuras ya que la menor supervivencia final de las larvas bajo ozono se atribuye al efecto indirecto de la calidad de la hoja, pero es probable que el ozono directo sobre el animal también aporte significancia al resultado obtenido.

4.3.2 El rol del ozono en las defensas de las larvas

De acuerdo con la bibliografía se conoce que las larvas del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* son polífagas, lo que le permitió expandirse por todo el mundo y alimentarse de gran cantidad de plantas, incluidos varios cultivos de importancia, entre ellos, la soja. También se conoce que la adaptación de su sistema digestivo le confiere la capacidad de alimentarse de distintas dietas, incluso superar las defensas impuestas por la soja. Sin embargo, no estaba claro cómo resultaría esta interacción bajo el efecto del ozono crónico. Para establecerlo, medimos la actividad de la tripsina en los intestinos de los insectos que crecieron y se alimentaron de sojas en cámaras con ozono. Y la tendencia obtenida sugiere que el ozono interfiere en esa capacidad de la larva para superar el impedimento impuesto por la soja y así aprovechar los aminoácidos. Sería muy útil repetir el ensayo partiendo de un mayor número de larvas, para disectar mayor cantidad de intestinos y analizarlos. Más datos o un tamaño de muestra más grande ayudarían a determinarlo significativamente. De todos modos, este resultado es de gran importancia ya que nunca se había puesto a prueba el desempeño de esta larva alimentándose de soja en condiciones de ozono crónico. Sabemos lo importante que es anticiparse en la evaluación de los posibles cambios en los agroecosistemas para conocer como responderán las plantas y los insectos en su interacción en un marco de cambio climático imperante y que continuara afectando todas las interacciones vigentes.

Hubiera aportado información adicional haber medido la respiración de los insectos en condiciones de estrés por ozono para establecer de manera precisa su fisiología y ecología, así como para estudiar cómo responden a cambios ambientales y condiciones estresantes por ozono. Futuras investigaciones podrían caracterizar el efecto directo del ozono y completar los estudios con la medición de la respiración.

4.3.3 El rol del mejoramiento genético en el desarrollo de defensas en la soja:

Muy pocos estudios investigaron la vinculación entre el mejoramiento genético y la maquinaria de defensas (Osborne et al., 2016). Sin embargo, hay evidencias que señalan que el objetivo del mejoramiento genético en soja fue obtener materiales con plantas más altas, con mayor desarrollo foliar, y mayor rendimiento, lo que fue en desmedro de la producción de defensas, disminuyendo el contenido de compuestos secundarios que permiten mediar frente a herbivoría, ya que los recursos empleados en defensas son costosos para la planta (Zavala et al., 2004). Se conoce que los cultivares más antiguos sembrados en Japón respondían mejor ante los factores ambientales debido a su capacidad de defensa. En los bioensayos de esta tesis se evaluó el cultivar Williams, que no pertenece a las variedades comerciales más modernas por lo que podríamos asociar esta característica a los resultados obtenidos considerando su respuesta ante estrés por ozono.

4.3.4 El rol del ozono en las interacciones tritróficas:

Uno de los resultados obtenidos en esta tesis, es el anticipo en el tiempo de la floración de la soja que se observó en las cámaras con tratamiento con ozono crónico. Esto puede ser de gran relevancia ecológica ya que registramos un adelanto en la floración de la soja en las cámaras con ozono crónico y esto podría generar cambios cruciales en la interacción de la soja con sus polinizadores, predadores de sus plagas y otros insectos. Se podría investigar más a fondo cómo los cambios inducidos por el ozono en las plantas de soja pueden afectar a los herbívoros y, a su vez, cómo esos cambios en los herbívoros pueden influir en los depredadores naturales. Es decir, que los efectos del ozono se pueden estudiar a diferentes niveles de organización, ya que el impacto se expande en la trama trófica. Muchos ecólogos están investigando el impacto del ozono en la biodiversidad. Hay mucho interés por conocer el impacto que tendrá el ozono en el ambiente. Las predicciones a corto plazo son más factibles, sin embargo, es difícil establecer que ocurrirá en el planeta en los próximos cincuenta, cien años. Por eso investigaciones sobre estos aspectos cobran mucha importancia para poder avanzar en el conocimiento lo antes posible.

4.4 PERSPECTIVAS FUTURAS

La mayoría de las teorías de defensa de las plantas basadas en principios fisiológicos y los costos ecológicos de la asignación de defensa, predicen la ocurrencia del compromiso entre crecer y defenderse que se da en las plantas. Con el propósito de mitigar los efectos del ozono sobre el rendimiento del cultivo, está documentado en el capítulo 2 de esta tesis, que podrían evaluarse variedades comerciales de soja de las más productivas de Argentina y compararlas con la variedad Williams, una variedad poco mejorada genéticamente y que podría responder mejor con sus defensas. Es esencial comparar el rendimiento con variedades antiguas, ya que estas podrían mostrar una mayor capacidad de respuesta ante condiciones ambientales adversas, como es someterse a condiciones de alta concentración de ozono. Hay que tener en cuenta que la producción de antioxidantes en respuesta al ozono es energéticamente costosa produciendo altos costos fisiológicos (Menéndez et. al. 2009). Entonces, comparar la relación entre crecimiento y defensas, entre diferentes variedades es útil para elegir el cultivar más apropiado según el ambiente y así mantener los rendimientos productivos aún en situaciones de estrés ambiental. Además, sería importante identificar cuáles son las enzimas y compuestos que confieren mayor tolerancia a ozono, y así comprender los mecanismos de respuesta al estrés oxidativo, ya que, si bien la soja es un cultivo sensible al ozono, se encuentran variedades más tolerantes que otras.

En esta tesis se observó cómo la producción de defensas inducidas en las plantas, como por ejemplo los IP, pueden afectar la supervivencia de las larvas que se alimentan de la soja, pero aún desconocemos si las larvas sobrevivientes podían completar su ciclo de vida normalmente. Según la teoría de selección adaptativa se predice que los rasgos que confieren la tolerancia al ozono deben fijarse en la población si los beneficios superan los costos asociados a la misma. Considerando que el ozono podría actuar como un factor de selección adaptativa, es factible investigar el comportamiento de esos individuos expuestos al ozono. En este sentido, aunque se produce una caída en la supervivencia de las larvas, podría darse que a través de la selección persistan los individuos que mejor se adaptaron al ozono. Además, el ambiente enriquecido en ozono podría modificar la tasa reproductiva de los individuos o poblaciones que logren sobrevivir. Por otro lado, cabe preguntarse cómo será el

desempeño de las poblaciones descendientes de esos individuos que pudieron sobrevivir al daño por ozono y evaluar si su ciclo será más corto, si la pupa será más liviana Y si se les permite a estos individuos que ovipongan en esas mismas condiciones, evaluar si pondrán más huevos para compensar las condiciones de un cultivo bajo ozono. Se propone continuar con evaluaciones en el comportamiento y desempeño de los insectos en condiciones de ozono crónico. Esto podría responderse en futuros estudios.

Otro interrogante que surge de esta tesis es conocer el efecto directo del ozono sobre las larvas. Ya que en los ensayos que se realizaron, las larvas se expusieron a ozono dentro de las cámaras y también se alimentaron de las hojas de la soja y así percibieron los cambios de la química de las plantas indirectamente al alimentarse. Pero para evaluar el efecto directo del ozono sobre el animal, las larvas deben ser expuestas al medio con ozono y se les debe permitir alimentarse con dietas artificiales para poder aislar el efecto sobre el insecto. Para ensayos futuros sería necesario evaluar el efecto directo.

Se conoce que los isoflavonoides pueden beneficiar a los herbívoros proporcionándoles mayor protección antioxidante. Particularmente la quercetina puede beneficiar a los herbívoros favoreciendo el crecimiento de los insectos (Saleem et al. 2001). Sin embargo, los isoflavonoides pueden tener efectos negativos sobre los herbívoros. En nuestra tesis se pudo caracterizar el efecto de la daidzina y la genistina. En estudios futuros nos interesaría determinar todo el perfil de isoflavonoides tanto los constitutivos como los inducidos debido a la interacción ozono-insecto.

En esta tesis se evaluó la interacción de la soja con uno de los lepidópteros que se alimenta en general de sus hojas, pero en futuros estudios nos interesaría también evaluar la interacción de la soja con el complejo de chinches, insectos que afectan puntualmente el periodo de llenado de vainas y semillas, bajo condiciones de ozono crónico.

Un punto en consideración es que no solo las concentraciones de ozono están en aumento, sino que se están produciendo cada vez más frecuentemente la alternancia de sequías acompañadas de temperaturas muy altas, lo que haría exacerbar los resultados obtenidos en esta tesis. La coexistencia de más de un factor estresante como altas temperaturas, déficit nutricional, salinidad, deficiencia de agua, podría comprometer en mayor escala los rendimientos de la soja en un contexto de cambio climático y esto aumentaría el riesgo del abastecimiento de uno de los productos más importantes de la dieta de animales y humanos en el mundo entero.

BIBLIOGRAFÍA

- Austin, A. T., & Ballare, C. L. (2014). *Plant interactions with other organisms: molecules, ecology and evolution*. *New Phytologist*, 204(2), 257-260. <https://www.newphytologist.com>
- Abu ElEla, S. A., Agathokleous, E., Ghazawy, N. A., Amin, T. R., ElSayed, W. M., & Koike, T. (2018). *Enzyme activity modification in adult beetles (*Agelastica coerulea*) inhabiting birch trees in an ozone-enriched atmosphere*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(32), 32675–32683. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3243>
- Agathokleous, E. (2018). *Environmental hormesis, a fundamental non-monotonic biological phenomenon with implications in ecotoxicology and environmental safety*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 1042–1053. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.003>
- Agathokleous, E., Feng, Z., Oksanen, E., Sicard, P., Wang, Q., Saitanis, C. J., Araminiene, V., Blande, J. D., Hayes, F., Calatayud, V., Domingos, M., Veresoglou, S. D., Peñuelas, J., Wardle, D. A., de Marco, A., Li, Z., Harmens, H., Yuan, X., Vitale, M., & Paoletti, E. (2020). *Ozone affects plant, insect, and soil microbial communities: A threat to terrestrial ecosystems and biodiversity*. *Science Advances*, 6(33). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc1176>
- Agrawal, A. A. (2000). *Mechanisms, ecological consequences, and agricultural implications of tri-trophic interactions*. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 329-335. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00089-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00089-3)
- Agrawal, S.B., Agrawal, M., & Singh, A. (2021). *Tropospheric Ozone: A Hazard for Vegetation and Human Health* (pp. 277-306). Cambridge Scholars.
- Ainsworth, E. A., Yendrek, C. R., Sitch, S., Collins, W. J., & Emberson, L. D. (2012). *The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change*. *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 63, pp. 637–661). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103829>.

- Ainsworth, E. A. (2017). *Understanding and improving global crop response to ozone pollution*. *Plant Journal*, 90(5), 886–897. <https://doi.org/10.1111/tpj.13298>.
- Ainsworth, E. A., Lemonnier, P., & Wedow, J. M. (2020). *The influence of rising tropospheric carbon dioxide and ozone on plant productivity*. *Plant Biology (Stuttgart)*, 22(Suppl 1), 5-11. <https://doi.org/10.1111/plb.12973>.
- Andersen, C. P. (2003). *Tansley review Source-sink balance and carbon allocation below ground in plants exposed to ozone*. *New Phytologist*, 157(2). <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00674.x>
- Andriani, J., Andrade, F., Suero, E., Dardanelli, J., Andriani, J. M., Andrade, F. H., Suero, E. E., & Dardanelli, J. L. (1991). *Water deficits during reproductive growth of soybeans. I. Their effects on dry matter accumulation, seed yield, and its components*. *Agronomie*, 11(9), 747-756. <https://hal.science/hal-00885414>
- Archibald, A. T., Neu, J. L., Elshorbany, Y. F., Cooper, O. R., Young, P. J., Akiyoshi, H., Cox, R. A., Coyle, M., Derwent, R. G., Deushi, M., Finco, A., Frost, G. J., Galbally, I. E., Gerosa, G., Granier, C., Griffiths, P. T., Hossaini, R., Hu, L., Jöckel, P., & Zeng, G. (2020). *Tropospheric ozone assessment report: A critical review of changes in the tropospheric ozone burden and budget from 1850 to 2100*. *Elementa*, 8(1), 1–53. <https://doi.org/10.1525/elementa.2020.034>
- Ashmore, M. R. (2005). *Assessing the future global impacts of ozone on vegetation*. *Plant Cell and Environment*, 28(8), 949-964. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01341.x>
- Atkinson, R., Aschmann, S. M., & Arey, J. (1990). *Rate constants for the gas-phase reactions of OH and NO₃ radicals and O₃ with sabinene and camphene at 296±2 K*. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, 24(10), 2647–2654. [https://doi.org/10.1016/0960-1686\(90\)90144-C](https://doi.org/10.1016/0960-1686(90)90144-C)
- Avnery, S., Mauzerall, D. L., Liu, J., & Horowitz, L. W. (2011). *Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 2. Year 2030 potential crop production losses and economic damage under two scenarios of O₃ pollution*.

- Atmospheric Environment, 45(13), 2297–2309.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.01.002>.
- Bailey, A., Burkey, K., Taggart, M., & Rufty, T. (2019). *Leaf traits that contribute to differential ozone response in ozone-tolerant and sensitive soybean genotypes*. *Plants*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/plants8070235>
- Barbero, F., & Maffei, M. E. (2023). *Recent Advances in Plant–Insect Interactions*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11338.
<https://doi.org/10.3390/ijms241411338>
- Barros, E. M., Torres, J. B., Ruberson, J. R., & Oliveira, M. D. (2010). *Development of Spodoptera frugiperda on different hosts and damage to reproductive structures in cotton*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 137(3), 237–245.
<https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.01058.x>
- Bergweiler, C., Carreras, H., Wannaz, E., Rodriguez, J., Toselli, B., Olcese, L., & Betzelberger, A. M., Gillespie, K. M., Mcgrath, J. M., Koester, R. P., Nelson, R. L., & Ainsworth, E. A. (2010a). *Effects of chronic elevated ozone concentration on antioxidant capacity, photosynthesis and seed yield of 10 soybean cultivars*. *Plant, Cell and Environment*, 33(9), 1569–1581. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02165.x>
- Betzelberger, A. M., Yendrek, C. R., Sun, J., Leisner, C. P., Nelson, R. L., Ort, D. R., & Ainsworth, E. A. (2012). *Ozone exposure response for U.S. soybean cultivars: Linear reductions in photosynthetic potential, biomass, and yield*. *Plant Physiology*, 160(4), 1827–1839. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205591>
- Biancari, L., Cerrotta, C., Menéndez, A., Gundel, P. M., & Martínez-Ghersa, A. (2021). *Episodes of high tropospheric ozone reduce nodulation, seed production, and quality in soybean (Glycine max (L.) merr.) on low fertility soils*. *Environmental Pollution*, 269, 116–117. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116117>.
- Bidart-Bouzat, M. G., & Kliebenstein, D. J. (2008). *Differential levels of insect herbivory in the field associated with genotypic variation in glucosinolates in*

Arabidopsis thaliana. Journal of Chemical Ecology.

<https://doi.org/10.1007/s10886-008-9498-z>.

Bilgin, D. D., Aldea, M., O'Neill, B. F., Benitez, M., Li, M., Clough, S. J., & DeLucia, E. H. (2008). *Elevated ozone alters soybean-virus interaction*. Molecular Plant-Microbe Interactions. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-10-1297>

Bolsa de Comercio Rosario. (2021).

Booker, F. L., & Miller, J. E. (1998). *Phenylpropanoid metabolism and phenolic composition of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) leaves following exposure to ozone*. Journal of Experimental Botany, 49(324), 1191. <https://academic.oup.com/jxb/article/49/324/1191/481108>

Booker, F. L., & Fiscus, E. L. (2005). *The role of ozone flux and antioxidants in the suppression of ozone injury by elevated CO₂ in soybean*. Journal of Experimental Botany, 56(418), 2139–2151. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri214>

Brioschi, D., Nadalini, L. D., Bengtson, M. H., Sogayar, M. C., Moura, D. S., & Silva Filho, M. C. (2007). *General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsin and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor*. InsectBiochemistry and Molecular Biology, 37(12), 1283–1290. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.07.016>.

Burkey, K.O., Miller, J.E., & Fiscus, E.L. (2005). *Assessment of Ambient Ozone Effects on Vegetation Using Snap Bean as a Bioindicator Species*. Journal of Environmental Quality, 34(3), 1081-1086. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.0008>

Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., Willink, E., & Gastaminza, G. (2010). *Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)*. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 69(3-4), 209-231.

Casteel, C. L., O'Neill, B. F., Zavala, J. A., Bilgin, D. D., Berenbaum, M. R., & DeLucia, E. H. (2008). *Transcriptional profiling reveals elevated CO₂ and elevated O₃ alter resistance of soybean (*Glycine max*) to Japanese beetles*

(*Popillia japonica*). *Plant Cell and Environment*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01782.x>

- Chaudhary, I. J., Nigam, B., & Rathore, D. (2022). *Effect of elevated ozone on soybean (Glycine max L.) cultivar: Role of orange juice and synthetic ascorbic acid*. *Nature Environment and Pollution Technology* 22(3):1225-1238
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1475945/v1>.
- Chapman, R.F. (1998). *The Insects: Structure and Function* (4th ed.). Cambridge University Press.
- Chen, M.-S. (2008). *Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review*. *Insect Science*, 15, 101-114. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00190>
- Cionco, R. G., Orellana, P & Quaranta, N, E. (2017). *Tendencias a largo plazo de O3 troposférico en argentina*. PROIMCA – PRODECA
- Cotrozzi, L., Conti, B., Lorenzini, G., Pellegrini, E., & Nali, C. (2021). *In the tripartite combination ozone-poplar-Chrysomela populi, the pollutant alters the plant-insect interaction via primary metabolites of foliage*. *Environmental Research*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111581>
- Da Silva, P. L., Cordeiro, G., Da Silva, C. R., Barros, R. A., Da Silva, C. R., Zanuncio, J. C., Campos, W. G., & Oliveira, M. G. A. (2018). *Does mechanical damage on soybean induces the production of flavonoids*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 90(4), 3415–3422. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170850>
- De Araújo, W. A., Degrande, P. E., Malaquias, J. B., Silvie, P. J., Scoton, A. M. N., & da Silva Pachú, J. K. (2023). *Cut off Behavior of Spodoptera frugiperda (Smith, 1797). (Lepidoptera: Noctuidae) in Soybean (Glycine max (L.) Merrill) Seedlings*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 66.
<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2023220386>.
- De Sá, V. G., Fonseca, B. V., Boregas, K. G., & Waquil, J. M. (2009). *Sobrevivência e desenvolvimento larval de Spodoptera frugiperda (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos*. *Neotropical Entomology*, 38, 108

- Demkura, G., Abdala, G., Baldwin, I. T., & Ballaré, C. L. (2010). *Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet-B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense*. *Plant Physiology*, 152, 1084-1095.
- Dermody, O., O'Neill, B. F., Zangerl, A. R., Berenbaum, M. R., & DeLucia, E. H. (2008). *Effects of elevated CO₂ and O₃ on leaf damage and insect abundance in a soybean agroecosystem*. *Arthropod-Plant Interactions*, 2(3), 125–135. <https://doi.org/10.1007/s11829-008-9045-4>
- Dewan, S., & Lakhani, A. (2022). *Tropospheric ozone and its natural precursors impacted by climatic changes in emission and dynamics*. *Frontiers in Environmental Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.1007942>
- Di Mauro, G., Salvagiotti, F., Gambin, B. L., Condori, A., Gallo, S., Pozzi, R., Boxler, M., & Rotundo, J. L. (2022). *Assessing the impact of high-input management for reducing soybean yield gaps on high-productivity farms*. *Field Crops Research*, 278, 108434. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108434>
- Dicke, M. (1998). *Induced responses to herbivory by R. Karban and I.T. Baldwin*. *Trends Ecol. Evol.* 13:83. doi: 10.1016/S0169-5347(97)01267-6
- Dillon, F. (2017). *Efecto de la radiación solar UV-B y del daño de orugas (Anticarsia gemmatalis) trips (Caliothrips phaseoli) chinches (Nezara viridula y Piezodorus guildinii) sobre el perfil de compuestos fenólicos y la actividad de inhibidores de proteasas: rol del etileno, ácido jasmónico y salicílico. (Tesis de posgrado). Universidad de Buenos Aires.*
- Egli, D. B. (1993). *Cultivar maturity and potential yield of soybean*. *Field Crops Research*, 32(1–2), 147–158. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(93\)90027-K](https://doi.org/10.1016/0378-4290(93)90027-K).
- Ellis, C., Karafyllidis, I., & Turner, J. G. (2002). *Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to Erysiphe cichoracearum, Pseudomonas syringae, and Myzus persicae*.

Molecular Plant-Microbe Interactions.

<https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.10.1025>

Emberson, L. D., Pleijel, H., Ainsworth, E. A., van den Berg, M., Ren, W., Osborne, S., Mills, G., Pandey, D., Dentener, F., B ker, P., Ewert, F., Koeble, R., & Van Dingenen, R. (2018). *Ozone effects on crops and consideration in crop models*. *European Journal of Agronomy*, 100(June), 19–34.

<https://doi.org/10.1016/j.eja.2018.06.002>

Endo, N., Hirakawa, I., Wada, T., & Tojo, S. (2007). *Induced resistance to the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in three soybean cultivars*. *Applied Entomology and Zoology*, 42(2), 199–204.

<https://doi.org/10.1303/aez.2007.199>

Fehr, W. R., & Caviness, C. E. (1977). *Stages of Soybean Development. Special Report*, 80. Iowa Agric. Home Econ. Exp. Stn. Iowa State Univ., Ames.

Feng, Z., & Kobayashi, K. (2009). *Assessing the impacts of current and future concentrations of surface ozone on crop yield with meta-analysis*. *Atmospheric Environment*, 43(8), 1510–1519.

<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.11.033>

Feng, Z., Agathokleous, E., Yue, X., Oksanen, E., Paoletti, E., Sase, H., Gandin, A., Koike, T., Calatayud, V., Yuan, X., Liu, X., De Marco, A., Jolivet, Y., KontunenSoppela, S., Hoshika, Y., Saji, H., Li, P., Li, Z., Watanabe, M., & Kobayashi, K. (2021). *Emerging challenges of ozone impacts on Asian plants: Actions are needed to protect ecosystem health*. *Ecosystem Health and Sustainability*, 7(1). <https://doi.org/10.1080/20964129.2021.1911602>

Firake, D. M., & Behere, G. T. (2020). *Natural mortality of invasive fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in maize agroecosystems of northeast India*. *Biological*

Control. 148. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104303>.

- Fiscus, E. L., Booker, F. L., & Miller, E. L. (1996). *Response of soybean bulk leaf water relations to ultraviolet-B irradiation*. *Journal of Plant Physiology*, 148(1-2), 63-68.
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80295-1](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80295-1)
- Formentini, A. C., Sosa-Gómez, D. R., de Paula-Moraes, S. V., de Barros, N. M., & Specht, A. (2015). *Lepidoptera (Insecta) associated with soybean in Argentina, Brazil, Chile and Uruguay*. *Ciencia Rural*, 45(12), 2113–2120.
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141258>.
- Freeman, B. C., Chen, C., & Beattie, G. A. (2010). *Identification of the trehalosebiosynthetic loci of Pseudomonas syringae and their contribution to fitness in the phyllosphere*. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1486-1497.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02171.x>
- Fuhrer, J. (2002). *Ozone Impacts on Vegetation*. *Ozone: Science & Engineering*, 24(1), 69–74. <https://doi.org/10.1080/01919510208901597>
- Fuhrer, J. (2003). *Agroecosystem responses to combinations of elevated CO₂, ozone, and global climate change*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*.
[https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00125-7](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00125-7)
- Fuhrer, J., (2009). *Ozone risk for crops and pastures in present and future climates*. *Naturwissenschaften* 96, 173–194. <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0468-7>
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., & Bak, S. (2013). *Plant defense against insect herbivores*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 10242–10297.
<https://doi.org/10.3390/ijms140510242>.
- Garvey, M., Costanza, K., Grimmell, S., & Elderd, B. D. (2022). *Examining the Effects of Induced Plant Defenses on Spodoptera frugiperda Performance*. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/app12083907>.
- Giacometti, R., Barneto, J., Barriga, L. G., Sardoy, P. M., Balestrasse, K., Andrade, A. M., Pagano, E. A., Alemano, S. G., & Zavala, J. A. (2015). *Early perception of stink bug damage in developing seeds of field-grown soybean induces chemical*

defenses, and decreases bug attack. Pest Management Science.

<https://doi.org/10.1002/ps.4192>.

Gillespie, K. M., Rogers, A., & Ainsworth, E. A. (2011). *Growth at elevated ozone or elevated carbon dioxide concentration alters antioxidant capacity and response to acute oxidative stress in soybean (Glycine max).* Journal of Experimental Botany, 62(8), 2667-2678.

Gosselin, N., Sagan, V., Maimaitiyiming, M., Fishman, J., Belina, K., Podleski, A., Maimaitijiang, M., Bashir, A., Balakrishna, J., & Dixon, A. (2020). *Using visual ozone damage scores and spectroscopy to quantify soybean responses to background ozone.* Remote Sensing, 12(1).

<https://doi.org/10.3390/RS12010093>.

Grulke, N.E. & Heath, R.L. (2020). *Ozone effects on plants in natural ecosystems.* Plant Biol J, 22: 12-37. <https://doi.org/10.1111/plb.12971>

Hafeez, M., Li, X. W., Zhang, J. M., Zhang, Z. J., Huang, J., Wang, L. K., Khan, M. M., Shah, S., Fernández-Grandon, G. M., & Lu, Y. B. (2021). *Role of digestive protease enzymes and related genes in host plant adaptation of a polyphagous pest, Spodoptera frugiperda.* Insect Science, 28(3), 611-626.

<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12906>.

Hamilton, J. G., Dermody, O., Aldea, M., Zangerl, A. R., Rogers, A., Berenbaum, M.R., & Delucia, E. H. (2005). *Anthropogenic Changes in Tropospheric Composition Increase Susceptibility of Soybean to Insect Herbivory.* Environmental Entomology, 34(2), 479–485. <https://doi.org/10.1603/0046-225x-34.2.479>.

Hanley, M. E., Lamont, B. B., Fairbanks, M. M., & Rafferty, C. M. (2007). *Plant structural traits and their role in anti-herbivore defense.* Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 8(4), 157–178.

<https://doi.org/10.1016/j.ppees.2007.01.001>.

Haq, T., Usmani, N. F., & Abbas, T. (2005). *Screening of plant leaves as grain protectants against Tribolium castaneum during storage.* Pakistan Journal of Botany, 37(1).

- Hardacre, A. K., Yap, S. Y., Lentle, R. G., & Monro, J. A. (2015). *The effect of fibre and gelatinised starch type on amylolysis and apparent viscosity during in vitro digestion at a physiological shear rate*. *Carbohydrate Polymers*, 123, 80–88.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.01.013>.
- Harmens, H., Hayes, F., Sharps, K., Radbourne, A., & Mills, G. (2019). ¿Can reduced irrigation mitigate ozone impacts on an ozone-sensitive African wheat variety? *Plants*, 8(7), 220, 17. <https://doi.org/10.3390/plants8070220>.
- Hauglustaine, D. A., & Brasseur, G. P. (2001). *Evolution of tropospheric ozone under anthropogenic activities and associated radiative forcing of climate*. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 106(D23), 32,337-32,360.
<https://doi.org/10.1029/2001JD000508>
- Hayes, F., Williamson, J., & Mills, G. (2012). *Ozone pollution affects flower numbers and timing in a simulated BAP priority calcareous grassland community*. *Environmental Pollution*, 163, 40–47.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2011.12.032>.
- Heagle, A. S., Miller, J. E., & Booker, F. L. (1998). *Influence of ozone stress on soybean responses to carbon dioxide enrichment: I. Foliar properties*. *Crop Science*, 38, 113-121.
- Hogsett, W. E., Tingey, D. T., & Holman, S. R. (1985). *A programmable exposure control system for determination of the effects of pollutant exposure regimes on plant growth*. *Atmospheric Environment (1967)*, 19(7), 1135–1145.
[https://doi.org/10.1016/0004-6981\(85\)90198-2](https://doi.org/10.1016/0004-6981(85)90198-2).
- Hou, Y., & Shen, Z. (2022). *Research Trends, Hotspots, and Frontiers of Ozone Pollution from 1996 to 2021: A Review Based on a Bibliometric Visualization Analysis*. *Sustainability*, 14(17), 10898-10916
- Howe, G. A., & Jander, G. (2008). *Plant immunity to insect herbivores*. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 41–66.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>.

- Hruska, A. J. (2019). *Fall armyworm (Spodoptera frugiperda) management by smallholders*. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 14.
<https://doi.org/10.1079/PAVSNR201914043.Indec>.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos de Argentina. (2021). Complejos exportadores. www.indec.gob.ar
- Islam, T., Moore, B.D., & Johnson, S.N. (2022). *Silicon suppresses a ubiquitous mite herbivore and promotes natural enemy attraction by altering plant volatile blends*. *Journal of Pest Science*, 95(4), 423-434. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01384-1>
- Jøndrup, P. M., Barnes, J. D., & Port, G. R. (2002). *The effect of ozone fumigation and different Brassica rapa lines on the feeding behavior of Pieris brassicae larvae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 104, 143-151.
- Kahlon, C., Board, J., & Kang, M. (2011). *An Analysis of Yield Component Changes for New vs. Old Soybean Cultivars*. *Agronomy Journal*, 103, 13-22.
www.researchgate.net/publication/318755828
- Kantolic, A. G. (2008). Control ambiental y genético de la fenología del cultivo de soja: Impactos sobre el rendimiento y la adaptación de genotipos [Environmental and genetic control of soybean phenology: Its impacts on yield and genotypic adaptation]. *Revista de la Facultad de Agronomía UBA*, 28(1), 63-88
- Kantolic, A. G., & Slafer, G. A. (2007). *Development and seed number in indeterminate soybean as affected by timing and duration of exposure to long photoperiods after flowering*. *Annals of Botany*, 99(5), 925-933.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcm033>
- Kantolic, A. G., Giménez, E., de la Fuente, E. (2010). *Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en soja*. En E.H. Satorre, R.L. Benech, G.A. Slafer, E.B. de la Fuente, D.J. Miralles, M.E. Otegui, R. Savin (Eds.), *Producción de Cultivos de Granos: Bases Funcionales para su Manejo* (pp. 165-201). Editorial Facultad de Agronomía.

- Karban, R. (2015). *Plant Behavior and Communication. Plant Sensing and Communication* (ed.). Chicago Scholarship Online.
<https://doi.org/10.7208/chicago/9780226264844.003.0001>.
- Kikuta, S. (2020). *The cytotoxic effect of genistein, a soybean isoflavone, against cultured Tribolium cells*. *Insects*, 11(4), 241.
<https://doi.org/10.3390/insects11040241..>
- Kothari, K., Battisti, R., Boote, K. J., Archontoulis, S. V., Confalone, A., Constantin, J., Cuadra, S. V., Debaeke, P., Faye, B., Grant, B., Hoogenboom, G., Jing, Q., van der Laan, M., Macena da Silva, F. A., Marin, F. R., Nehbandani, A., Nendel, C., Purcell, L. C., Qian, B., Salmerón, M. (2022). *¿Are soybean models ready for climate change food impact assessments? European Journal of Agronomy*, 135.
<https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126482>.
- Król-Grzymała, A., & Amarowicz, R. (2020). *Phenolic compounds of soybean seeds from two European countries and their antioxidant properties*. *Molecules*, 25(9).
<https://doi.org/10.3390/molecules25092075>.
- Li, C., Gu, X., Wu, Z., Qin, T., Guo, L., Wang, T., Zhang, L., & Jiang, G. (2021). *Assessing the effects of elevated ozone on physiology, growth, yield and quality of soybean in the past 40 years: A meta-analysis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111644.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111644>.
- Long, S.P., & Naidu, S.L. (2002). *Effects of oxidants at the biochemical, cell, and physiological levels, with particular reference to ozone*. J.N.B. Bell & M. Treshow (Eds.), *Air Pollution and Plant Life* (pp. 69-88). John Wiley & Sons.
- Mao, B., Yin, H., Wang, Y., Zhao, T. H., Tian, R. R., Wang, W., & Ye, J. S. (2017). *Combined effects of O₃ and UV radiation on secondary metabolites and endogenous hormones of soybean leaves*. *PLoS ONE*, 12(8), 1–16.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183147>
- Masui, N., Agathokleous, E., Mochizuki, T., Tani, A., Matsuura, H., & Koike, T. (2021). *Ozone disrupts the communication between plants and insects in urban*

and suburban areas: An updated insight on plant volatiles. *Journal of Forestry Research*, 32(4), 1337-1349. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01287-4>.

McGrath, J. M., Betzelberger, A. M., Wang, S., Shook, E., Zhu, X. G., Long, S. P., & Ainsworth, E. A. (2015). *An analysis of ozone damage to historical maize and soybean yields in the United States*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(46), 14390–14395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509777112>.

Meleux, F., Solmon, F., & Giorgi, F. (2007). *Increase in summer European ozone amounts due to climate change*. *Atmospheric Environment*, 41(35), 7577–7587. <https://doi.org/10.1016/J.ATMOSENV.2007.05.048>.

Menéndez, A. I., Romero, A. M., Folcia, A. M., & Martinez-Ghersa, M. A. (2009). *Getting the interactions right: ¿does ozone interfere with antiherbivore defenses?* *Basic and Applied Ecology*, 10(3), 255-264. DOI:[10.1016/j.baae.2008.03.010](https://doi.org/10.1016/j.baae.2008.03.010)

Miller, J. E., Booker, F. L., Fiscus, E. L., Heagle, A. S., Pursley, W. A., Vozzo, S. F., & Heck, W. W. (1994). *Ultraviolet-B Radiation and Ozone Effects on Growth, Yield, and Photosynthesis of Soybean*. *Journal of Environmental Quality*, 23(1), 83–91. <https://doi.org/10.2134/jeq1994.00472425002300010012x>

Mills, G., Sharps, K., Simpson, D., Pleijel, H., Frei, M., Burkey, K., Emberson, L., Uddling, J., Broberg, M., Feng, Z., Kobayashi, K., & Agrawal, M. (2018). *Closing the global ozone yield gap: Quantification and cobenefits for multistress tolerance*. *Global Change Biology*, 24(10), 4869–4893. <https://doi.org/10.1111/gcb.14381>

Mishra, M., Lomate, P. R., Joshi, R. S., Punekar, S. A., Gupta, V. S., & Giri, A. P. (2015). *Ecological turmoil in evolutionary dynamics of plant–insect interactions: defense to offence*. *Planta*. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2364-7>.

- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). *Plant defense against herbivores: Chemical aspects*. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 431-450.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103854>.
- Mohamed, H.A., & Said, R.S. (2021). *Coenzyme Q10 attenuates inflammation and fibrosis implicated in radiation enteropathy through suppression of NF-kB/TGF- β /MMP-9 pathways*. *International Immunopharmacology*, 92, 107347.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.10734>
- Ladányi, M., Nowinszky, L., Kiss, O., Puskás, J., Szentkirályi, F., & Barczikay, G. (2012). *Modelling the impact of tropospheric ozone content on light-and pheromone-trapped insects*. *Applied Ecology and Environmental Research*, 10(4), 471–491. https://doi.org/10.15666/aeer/1004_471491
- Lawrence, S. D., & Novak, N. G. (2006). *Expression of poplar chitinase in tomato leads to inhibition of development in Colorado potato beetle*. *Biotechnology Letters*, 28(8), 593–599. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-0022-7>
- Lee, J. H., & Goto, E. (2022). *Ozone control as a novel method to improve health-promoting bioactive compounds in red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.)*. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1045239>.
- Leisner, C. P., Ming, R., & Ainsworth, E. A. (2014). *Distinct transcriptional profiles of ozone stress in soybean (*Glycine max*) flowers and pods*. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0335-y>
- Leung, F., Sitch, S., Tai, A. P. K., Wiltshire, A. J., Gornall, J. L., Folberth, G. A., & Unger, N. (2022). *CO2 fertilization of crops offsets yield losses due to future surface ozone damage and climate change*. *Environmental Research Letters*, 17(7). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac7246>
- Li, C., Gu, X., Wu, Z., Qin, T., Guo, L., Wang, T., Zhang, L., & Jiang, G. (2021). *Assessing the effects of elevated ozone on physiology, growth, yield, and quality of soybean in the past 40 years: A meta-analysis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111644.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111644>..

- Long, S. P., Naidu, S. L. (2002). *Effect of oxidants at the biochemical, cell, and physiological levels, with particular reference to ozone*. J.N.B. Bell y M. Treshow (Eds.), *Air Pollution and Plant Life* (69–88). John Wiley & Sons, Ltd.
- Mohamed, H. I., Mohammed, A. H. M. A., Mohamed, N. M., Ashry, N. A., Zaky, L. M., & Mogazy, A. M. (2021). *Comparative Effectiveness of Potential Elicitors of Soybean Plant Resistance Against Spodoptera Littoralis and Their Effects on Secondary Metabolites and Antioxidant Defense System*. *Gesunde Pflanzen*, 73(3), 273–285. <https://doi.org/10.1007/s10343-021-00546-6>
- Monks, P. S., Archibald, A. T., Colette, A., Cooper, O., Coyle, M., Derwent, R., Fowler, D., Granier, C., Law, K. S., Mills, G. E., Stevenson, D. S., Tarasova, O., Thouret, V., Von Schneidmesser, E., Sommariva, R., Wild, O., & Williams, M. L. (2015). *Tropospheric ozone and its precursors from the urban to the global scale from air quality to short-lived climate forcer*. *Atmospheric Chemistry and Physics*. <https://doi.org/10.5194/acp-15-8889-2015>
- Montes, C. M., Demler, H. J., Li, S., Martin, D. G., & Ainsworth, E. A. (2022). *Approaches to investigate crop responses to ozone pollution: from O3-FACE to satellite-enabled modeling*. *Plant Journal*, 109(2), 432-446. <https://doi.org/10.1111/tpj.15501>
- Montesinos, J. L. (1996). *Coevolución*. *SEA*, 13, 13–19.
- Morgan, P. B., Ainsworth, E. A., & Long, S. P. (2003). *How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield*. *Plant, Cell and Environment*, 26(8), 1317–1328. doi.org/10.1046/j.0016-8025.2003.01056.x
- Morgan, P. B., Bernacchi, C. J., Ort, D. R., & Long, S. P. (2004). *An in vivo analysis of the effect of season-long open-air elevation of ozone to anticipated 2050 levels on photosynthesis in soybean*. *Plant Physiology*, 135(4), 2348–2357. <https://doi.org/10.1104/pp.104.043968>
- Morgan, P. B., Mies, T. A., Bollero, G. A., Nelson, R. L., & Long, S. P. (2006). *Season-long elevation of ozone concentration to projected 2050 levels under fully open-*

air conditions substantially decreases the growth and production of soybean. New Phytologist, 170(2), 333–343. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01679.x>

Oikawa, S., & Ainsworth, E. A. (2016). *Changes in leaf area, nitrogen content and canopy photosynthesis in soybean exposed to an ozone concentration gradient.* Environmental Pollution, 215, 347–355.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.005>

Ojala, K., Lindström, L., & Mappes, J. (2007). *Life-history constraints and warning signal expression in an arctiid moth.* Functional Ecology, 21, 1162–1167.

DeLucia, E. H., Nabity, P. D., Zavala, J. A., & Berenbaum, M. R. (2012). *Climate Change: Resetting Plant-Insect Interactions.* Plant Physiology, 160(4), 1677–1685. <http://www.jstor.org/stable/41812016>. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9727-0>.

O'Neill, B. F., Zangerl, A. R., Dermody, O., Bilgin, D. D., Casteel, C. L., Zavala, J. A., & Berenbaum, M. R. (2010). *Impact of elevated levels of atmospheric CO₂ and herbivory on flavonoids of soybean (Glycine max Linnaeus).* Journal of Chemical Ecology, 36(1), 35–45.

Osborne, S. A., Mills, G., Hayes, F., Ainsworth, E. A., Büker, P., & Emberson, L. (2016). *¿Has the sensitivity of soybean cultivars to ozone pollution increased with time? An analysis of published dose-response data.* Global Change Biology, 22(9), 3097–3111. <https://doi.org/10.1111/gcb.13318>

Outchkourov, N. S., De Kogel, W. J., Schuurman-De Bruin, A., Abrahamson, M., & Jongsma, M. A. (2004). *Specific cysteine protease inhibitors act as deterrents of western flower thrips, Frankliniella occidentalis (Pergande), in transgenic potato.* Plant Biotechnology Journal, 2(5), 439–448.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00088.x>

Paolacci, A. R., D'Ovidio, R., Marabottini, R., Nali, C., Lorenzini, G., Abenavoli, M. R., & Badiani, M. (2001). *Ozone induces a differential accumulation of phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase and chalcone isomerase RNA*

transcripts in sensitive and resistant bean cultivars. Australian Journal of Plant Physiology. <https://doi.org/10.1071/pp00095>

- Papazian, S., Khaling, E., Bonnet, C., Lassueur, S., Reymond, P., Moritz, T., Blande, J. D., & Albrechtsen, B. R. (2016). *Central metabolic responses to ozone and herbivory affect photosynthesis and stomatal closure*. Plant Physiology, 172(3), 2057–2078. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01318>.
- Paulillo, L. C. M. S., Lopes, A. R., Cristofolletti, P. T., Parra, J. R. P., Terra, W. R., & Silva-Filho, M. C. (2000). *Changes in Midgut Endopeptidase Activity of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) are Responsible for Adaptation to Soybean Proteinase Inhibitors*. Journal of Economic Entomology, 93(3), 892–896. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.3.892>
- Peltonen, P. A., Vapaavuori, E., Heinonen, J., Julkunen-tiitto, R., & Holopainen, J. K. (2010). *¿Do elevated atmospheric CO₂ and O₃ affect food quality and performance of folivorous insects on silver birch?* Global Change Biology, 16(3), 918–935. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02073.x>
- Peruca, R. D., Coelho, R. G., da Silva, G. G., Pistori, H., Ravaglia, L. M., Roel, A. R., & Alcantara, G. B. (2018). *Impacts of soybean-induced defenses on Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) development*. Arthropod-Plant Interactions, 12(2), 257–266. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9565-x>.
- Piubelli, C., Beatriz G. Hoffmann-Campo, C. I. Arruda, D. E. Franchini, & F. Mesquita Lara. (2003). *Flavonoid increase in soybean as a response to Nezara viridula injury and its effect on insect-feeding preference*. Journal of Chemical Ecology, 29(5).
- Pierre, S. (2021). *Ground-level ozone over time: An observation-based global overview*. Current Opinion in Environmental Science & Health, 19, 100226.
doi.org/10.1016/J.COESH.2020.100226.
- Proietti, C., Fornasier, M. F., Sicard, P., Anav, A., Paoletti, E., & De Marco, A. (2021). *Trends in tropospheric ozone concentrations and forest impact metrics in*

- Europe over the time period. 2000–2014. Journal of Forestry Research*, 32(2), 543–551. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01226-3>.
- Reid, C. D., Fiscus, E. L., & Burkey, K. O. (1999). *Combined effects of chronic ozone and elevated CO₂ on Rubisco activity and leaf components in soybean (Glycine max)*. *Journal of Experimental Botany*, 49(329).
- Rizzo, H. F., & La Rossa, F. R. (1992). *Aspectos morfológicos y biológicos de la oruga militar tardía (Spodoptera frugiperda) (J. E. Smith)*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 13, 193-199.
- Romero, B., Dillon, F.M., & Zavala, J.A. (2020). *Different soybean cultivars respond differentially to damage in a herbivore-specific manner and decrease herbivore performance*. *Arthropod-Plant Interactions*, 14, 89–99. <https://doi.org/10.1007/s11829-019-09730->
- Ryan, R. O. (1990). *Dynamics of insect lipophorin metabolism*. *Journal of Lipid Research*, 31(10), 1725-1739. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)42317-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)42317-x).
- Sá, V. G. M. de., Fonseca, B. V. C., Boregas, K. G. B., & Waquil, J. M. (2009). *Sobrevivência e desenvolvimento larval de Spodoptera frugiperda (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos*. *Neotropical Entomology*, 38(1), 108–115. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2009000100012>.
- Saleem, A., Loponen, J., Pihlaja, K., & Oksanen, E. (2001). *Effects of long-term open-field ozone exposure on leaf phenolics of European silver birch (Betula pendula ROTH)*. *Journal of Chemical Ecology*, 27(5).
- 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*. *Field Crops Research*, 108(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2008.03.001>
- Sandermann Jr, H. (1996). *Ozone and plant health*. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1), 347–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.347>.

- Santachiara, G., Salvagiotti, F., Gerde, J. A., & Rotundo, J. L. (2018). *Does biological nitrogen fixation modify soybean nitrogen dilution curves?* *Field Crops Research*, 223, 171–178. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2018.04.001>
- Sataral, M., Amrulloh, R., Megasari, D., Khoiri, S., & Zulfajrin, M. (2023). *Leveraging environmental and landscape effects on the Spodoptera frugiperda abundance and attack rates' spatial distribution.* *Natural Science: Journal of Science and Technology*, 12(1), 17–28.
<https://doi.org/10.22487/25411969.2023.v12.i1.16182>.
- Satorre, E., & Andrade, F. (2021). *Cambios productivos y tecnológicos de la agricultura extensiva argentina en los últimos quince años.* *Ciencia Hoy*, 29(173), 19-27.
- Sattar, M. A., & Islam, M. T. (2007). *Assessment of tropospheric ozone (O₃) impacts on crops: A review.* *Bangladesh Journal of Environmental Science*, 13(2), 194-203
- Saxena, P., Srivastava, A., Tyagi, M., & Kaur, S. (2019). *Impacts of tropospheric ozone on plant metabolism-a review.* *Poll Res*, 38(1), 175–180.
- Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J., & Dicke, M. (2005). *Insect-plant biology.* Oxford University Press.
- Selig, P., Keough, S., Nalam, V. J., & Nachappa, P. (2016). *Jasmonate-dependent plant defenses mediate soybean thrips and soybean aphid performance on soybean.* *Arthropod-Plant Interactions*, 10(4), 273–282. <https://doi.org/10.1007/s11829-016-9437-9>.
- Singh, A. A., Eram, R., Agrawal, M., Agrawal, M., Agrawal, M., & Agrawal, S. B. (2022). *Air Pollution: Sources and its Effects on Humans and Plants.* *International journal of plant and environment*, 8(01), 10–24.
<https://doi.org/10.18811/ijpen.v8i01.02>.
- Singh, E., Tiwari, S., & Agrawal, M. (2009). *Effects of elevated ozone on photosynthesis and stomatal conductance of two soybean varieties: A case study*

to assess impacts of one component of predicted global climate change. *Plant Biology*, *11*, 101-108 <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00263.x>

- Singh, S., & Agrawal, S. B. (2011). Cultivar-specific response of soybean (*Glycine max* L.) to ambient and elevated concentrations of ozone under open top chambers. *Water, Air, and Soil Pollution*. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0586-7>
- Singh, E., Tiwari, S., & Agrawal, M. (2010). Variability in antioxidant and metabolite levels, growth and yield of two soybean varieties: An assessment of anticipated yield losses under projected elevation of ozone. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *135*(3), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.09.004>
- Sohidul Islam, M., Muhyidiyn, I., Rafiqul Islam, Md., Kamrul Hasan, Md., Golam Hafeez, A., Moaz Hosen, Md., Saneoka, H., Ueda, A., Liu, L., Naz, M., Barutçular, C., Lone, J., Ammar Raza, M., Kaium Chowdhury, M., El Sabagh, A., & Erman, M. (2022). Soybean and Sustainable Agriculture for Food Security. In *Soybean - Recent Advances in Research and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104129>.
- Srinivasan, A., Giri, A. P., & Gupta, V. S. (2006). *Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases*. *Cellular and Molecular Biology Letters*, *11*(1), 132–154. <https://doi.org/10.2478/s11658-006-0012-8>
- Sugai, T., Okamoto, S., Agathokleous, E., Masui, N., Satoh, F., & Koike, T. (2020). *Leaf defense capacity of Japanese elm (*Ulmus davidiana* var. *japonica*) seedlings subjected to a nitrogen loading and insect herbivore dynamics in a free air ozone-enriched environment*. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*(3), 3350–3360. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06918-w>
- Sun, J., Feng, Z., & Ort, D. R. (2014a). *Impacts of rising tropospheric ozone on photosynthesis and metabolite levels on field grown soybean*. *Plant Science*, *226*, 147–161. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.06.012>
- Supriya, K., Aggarwal, R. K., & Bhardwaj, S. K. (2018). *Impact of Land Uses on Air and Water Quality: A Review*. *Current World Environment*, *13*(Special issue 1), 11–21.

- Tamaoki, M., Matsuyama, T., Kanna, M., Nakajima, N., Kubo, A., Aono, M., & Saji, H. (2003). *Differential ozone sensitivity among Arabidopsis accessions and its relevance to ethylene synthesis*. *Planta*. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0894-2>.
- Thomasz, E. O., Corfield, K., Vilker, A. S., & Osman, M. (2023). *Forecasting soybean production to enhance climate services for Agriculture in Argentina*. *Climate Services*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.cliser.2023.100341>.
- Thompson, G. A., & Goggin, F. L. (2006). *Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects*. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj135>.
- Tisdale, R. H., Zentella, R., & Burkey, K. O. (2021). *Impact of elevated ozone on yield and carbon-nitrogen content in soybean cultivar 'Jake.'* *Plant Science*, 306. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110855>
- Van Wees, S. C. M., Chang, H. S., Zhu, T., & Glazebrook, J. (2003). Characterization of the early response of Arabidopsis to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022186>.
- Vitantonio-Mazzini, L. N., Gómez, D., Gambin, B. L., Di Mauro, G., Iglesias, R., Costanzi, J., Jobbágy, E. G., & Borrás, L. (2021). Sowing date, genotype choice, and water environment control soybean yields in central Argentina. *Crop Science*, 61(1), 715–728. <https://doi.org/10.1002/csc2.20315>
- Vogel, J. T., Liu, W., Olhoft, P., Crafts-Brandner, S. J., Pennycooke, J. C., & Christiansen, N. (2021). *Soybean Yield Formation Physiology – A Foundation for Precision Breeding-Based Improvement*. *Frontiers in Plant Science*, 12, Article 719706. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.719706>
- Volp, T. M., Zalucki, M. P., & Furlong, M. J. (2022). *What Defines a Host? Oviposition Behavior and Larval Performance of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) on Five Putative Host Plants*. *Journal of Economic Entomology*, 115(6), 1744–1751. <https://doi.org/10.1093/jee/toac056>

- Wallis, C. M., & Galarneau, E. R. A. (2020). Phenolic Compound Induction in Plant-Microbe and Plant-Insect Interactions: A Meta-Analysis. *Frontiers in Plant Science*, *11*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.580753>.
- Wu, S., Mickley, L. J., Jacob, D. J., Rind, D., & Streets, D. G. (2008). *Effects of 2000–2050 changes in climate and emissions on global tropospheric ozone and the policy-relevant background surface ozone in the United States*. *JGR: Atmospheres*, *113*(D18), <https://doi.org/10.1029/2007JD009639>
- Zhang, W., Wang, G., Liu, X., & Feng, Z. (2014). *Effects of elevated O₃ exposure on seed yield, N concentration and photosynthesis of nine soybean cultivars (Glycine max (L.) Merr.) in Northeast China*. *Plant Science*, *226*, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.020>
- Zhang, W.-W., Wang, M., Wang, A.-Y., Yin, X.-H., Feng, Z.-Z., & Hao, G.-Y. (2018). *Elevated ozone concentration decreases whole-plant hydraulic conductance and disturbs water use regulation in soybean plants*. *Physiologia Plantarum*, *163*(2), 183–195. <https://doi.org/10.1111/ppl.12673>.
- Zavala, J. A., Patankar, A. G., Gase, K., Hui, D., & Baldwin, I. T. (2004). *Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in Nicotiana attenuata demonstrates their function as antiherbivore defenses*. *Plant Physiology*, *134*(3), 1181-1190. <https://doi.org/10.1104/pp.103.035634>.<https://doi.org/10.1104/pp.103.035634>
- Zavala, J. A., Patankar, A. G., Gase, K., (2004). *Constitutive and inducible trypsin proteinase inhibitor production incurs large fitness costs in Nicotiana attenuata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101:1607-1612
- Zavala, J. A., Casteel, C. L., DeLucia, E. H., & Berenbaum, M. R. (2008). *Anthropogenic increase in carbon dioxide compromises plant defense against invasive insects*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(13), 5129-5133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800568105>
- Zavala, J.A., & Baldwin, I.T. (2006). *Jasmonic acid signaling and herbivore resistance traits constrain regrowth after herbivore attack in Nicotiana attenuata*. *Plant*,

Cell & Environment, 29(9), 1751-1760. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01551.x>

Zavala, J. A. (2010). *Respuestas inmunológicas de las plantas frente al ataque de los insectos*. Ciencia Hoy.

Zhu-Salzman, K., Salzman, R. A., Ahn, J. E., & Koiwa, H. (2004). *Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid*. *Plant Physiology*, 134(1), 420-431. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028324>.

Zhu-Salzman, K., & Zeng, R. (2015). *Insect response to plant defensive protease inhibitors*. *Annual Review of Entomology*, 60, 233-252. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020816>.