

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Fernanda dos Santos Kretzschmar

**INFLUÊNCIA DE ATMOSFERA ENRIQUECIDA EM
CO₂, DO RADICAL ÓXIDO NÍTRICO E DE
ELICIADORES FÚNGICOS NA PRODUÇÃO DE
FITOALEXINAS EM PLÂNTULAS DE SOJA**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Fernanda dos Santos Kretzschmar
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do
Título de Mestre em Biologia
Celular e Estrutural, na área de
Biologia Celular.

Orientadora: Dra. Márcia Regina Braga

Campinas, 2007.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

K886i

Kretzschmar, Fernanda dos Santos

Influência de atmosfera enriquecida em CO₂, do radical óxido nítrico e de eliciadores fúngicos na produção de fitoalexinas em plântulas de soja / Fernanda dos Santos Kretzschmar. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Márcia Regina Braga.

Co-orientadora: Ione Salgado.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fitoalexinas. 2. Óxido nítrico. 3. Dióxido de carbono. 4. Soja. 5. Isoflavonas. I. Braga, Márcia Regina. II. Salgado, Ione. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Influence of elevated CO₂ atmosphere, nitric oxide and fungal elicitors on production of phytoalexins in soybean seedlings.

Palavras-chave em inglês: Phytoalexins; Nitric oxide; Carbon dioxide; Soybean; Isoflavones.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Márcia Regina Braga, Raquel Ghini, Maria Claudia Marx Young.

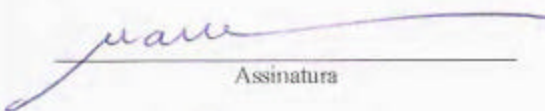
Data da defesa: 30/08/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 30 de Agosto de 2007.

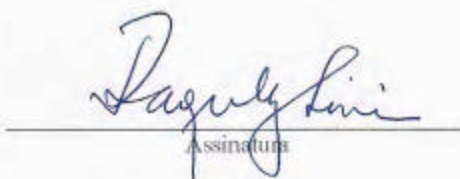
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Regina Braga (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Raquel Ghini



Assinatura

Profa. Dra. Maria Claudia Marx Young

Assinatura

Prof. Dr. Emerson Alves da Silva



Assinatura

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

Assinatura

Aos meus pais, Paulo e
Eliana, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

Ao CNPq pela bolsa concedida no início do trabalho.

À seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo pela utilização do laboratório.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) por fornecer as sementes de soja.

À Dra. Márcia Regina Braga pela dedicada orientação.

À Dra. Ione Salgado pela co-orientação e por sua importante contribuição com o projeto.

Ao Dr. Marcos Aidar pela colaboração na parte relacionada ao CO₂.

À Kelly Seligman pela amizade e disponibilidade em ajudar sempre.

Aos colegas de trabalho Maraba e Sabrina pela ajuda técnica em fotossíntese.

Ao pessoal de apoio da seção de Fisiologia: Ana Alice, Cida, Sirley, Mary, Helena e Rute.

Agradeço especialmente à minha amiga Kelly Simões (Kelita) por colaborar sempre com sua grande sabedoria e conhecimento científico e pelos momentos de descontração.

Aos amigos Aline Cavalari, Amanda Asega, Amanda de Souza, Amanda Souza (Top), Cláudia Alves, Denise Lopes, Fábio Dalle Molle, Fernanda Macedo, Grazielle Girardi, Juliana Iura, Ludmila Raggi, Marcelino Souza, Marina Martins, Marina Merlo, Michelle Cristina, Paola Mitie, Patrícia Pinho, Roberta Moretto, Rodrigo Cáccere, Simone Leduc, Tatiana Botelho, Vanessa Costa, Vanessa Oliveira, Vanessa Rebouças, e aos demais colegas de laboratório.

À todos os pesquisadores da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Aos amigos externos ao Instituto de Botânica.

À minha família.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
Aquecimento global: CO ₂	1
Efeito da atmosfera enriquecida em CO ₂ sobre as plantas	2
CO ₂ atmosférico e interação planta-patógeno	4
Produção de fitoalexinas em resposta ao ataque patogênico	7
Produção de fitoalexinas em soja	8
Óxido Nítrico	11
Elicidores derivados de óxido nítrico e de β-glucanos	14
Cancro da haste da soja.....	16
Importância farmacológica dos flavonóides	17
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Material vegetal	20
3.2.Tratamentos com CO ₂	20
3.3. Trocas gasosas	22
3.4. Fluorescência da clorofila a	22
3.5. Emergência e crescimento de plântulas	23
3.6. Atividade da nitrato redutase	23
3.7. Conteúdo total de carbono e nitrogênio	24
3.8. Carboidratos.....	24
3.9. Celulose de folhas e cotilédones	25
3.10. Açúcares solúveis	25
3.11. Compostos fenólicos.....	26
3.12. Obtenção dos eliciadores	26
3.13. Bioensaio com cotilédones de soja e análise da produção de fitoalexinas	27
3.14. Análise de flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	28

3.15. Atividade da fenilalanina-amônia-liase (PAL).....	29
3.16. Atividade da β -glucosidase (β -gluc).....	30
3.17. Atividade da flavanona-3-hidroxilase (F-3H)	30
3.18. Análise estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1. Crescimento das plântulas de soja em atmosfera ambiente e enriquecida em CO ₂	32
4.2. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja crescida em atmosfera ambiente e enriquecida em CO ₂	41
4.3. Atividade das enzimas PAL, β -gluc e F-3H nos cotilédones eliciados	47
5 DISCUSSÃO	52
5.1. CO ₂ e parâmetros fisiológicos	52
5.2. Efeito do CO ₂ e do óxido nítrico na ativação do metabolismo de defesa em soja	56
6 CONCLUSÕES	64
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO I	76

ABREVIATURAS

- 4CL- 4-coumarato: coenzima A ligase
A- fotossíntese
 β -GLU- β -glucano de *Phytophthora megasperma*
 β -gluc- β -glucosidase
CA4H- ácido cinâmico 4-hidroxilase
CHI-chalcona isomerase
CHR- chalcona redutase
CHS- chalcona sintase
CLAE- (=HPLC) cromatografia líquida de alta eficiência
CO₂- dióxido de carbono
Comp.- comprimento
CTA- câmara de topo aberto
CTN- carboidratos totais não-estruturais
DMSO- dimetilsulfóxido
Dpm- *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *Meridionalis*
EUA- eficiência do uso da água
F-3H- flavanona-3-hidroxilase
FACE- enriquecimento de CO₂ ao ar livre
Fru- frutose
g- condutância estomática
Glu- glucose
GSNO- S-nitrosoglutationa
HR- resposta hipersensitiva
IFS- isoflavona sintase
IRGA- analisador de gases por infra vermelho
kPa- quilo Pascal
LDL- lipoproteína de baixa densidade
MAPK- proteína quinase ativada por mitogênese

MF- matéria fresca
MS- matéria seca
n- número de repetições
NADH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO- óxido nítrico
NR- nitrato redutase
PAL- fenilalanina amônia liase
ppm- ($= \mu\text{mol mol}^{-1}$) partes por milhão
PR- proteína relacionada à patogênese
R- radical
Sac- sacarose
SNP- nitroprussiato de sódio
VC- estágio vegetativo de cotilédono
RNS- espécies reativas de nitrogênio
ROS- espécies reativas de oxigênio

RESUMO

Plântulas de soja (*Glycine max* L. Merr), crescidas sob alta concentração de CO₂ em sistema de câmaras de topo aberto apresentam incremento na fotossíntese e ganhos de produtividade, podendo alterar a produção de metabólitos secundários de importância farmacológica. Este trabalho teve como objetivo analisar a síntese de flavonas, isoflavonas e pterocarpanos em plântulas de soja (IAC-18, resistente ao fungo causador do cancro da haste *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*), cultivadas em atmosfera de 380 e 760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ e estimulada por diferentes eliciadores bióticos e abióticos. Fragmentos do β -glucano de *Phytophthora megasperma*, autoclavados de esporos de *D. phaseolorum* (Dpm) e moléculas doadoras de óxido nítrico (GSNO e SNP) foram utilizados como eliciadores. Os ensaios foram feitos aplicando-se os eliciadores sobre cotilédones destacados de plântulas de soja com 9 dias de idade (estádio VC). A exposição à 760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ estimulou a fotossíntese, aumentou a área e a massa fresca de cotilédones e folhas e resultou em incremento na produção de coumestrol, daidzeína, genisteína, luteolina e apigenina induzidas principalmente por SNP. Para gliceolinas e daidzina, o efeito estimulador do CO₂ foi observado por indução apenas com o β -glucano. Parâmetros bioquímicos relativos aos carboidratos solúveis e estruturais das plântulas de soja também mostraram diferenças significativas entre os dois tratamentos com CO₂. Os resultados obtidos reforçam a sugestão de que o incremento na disponibilidade de carbono pode modificar as defesas induzidas em soja contra patógenos, porém, essas alterações ocorrem em metabólitos específicos e dependem do eliciador utilizado.

ABSTRACT

Soybean seedlings (*Glycine max* L. Merr) grown in open top chambers under high CO₂ concentrations have shown photosynthetic increment and increase in productivity, which in turn may modify the production of secondary metabolites with pharmacological importance. The aim of this work was to analyze the synthesis of flavones, isoflavones and pterocarpan in soybean seedlings (IAC-18, a cultivar resistant to the causal agent of the stem canker disease *Diaphorthe phaseolorum* f. sp. *Meridionalis*), kept under 380 and 760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ atmospheres stimulated by biotic and abiotic elicitors. The β -glucan from mycelial walls of *Phytophthora megasperma*, autoclaved spores of *D. phaseolorum* (Dpm) and the NO donors, GSNO and SNP, were used as elicitors. The assays were performed by applying the elicitors on detached cotyledons from 9 days old soybean seedlings (VC stage). The exposition to 760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ of CO₂ stimulated photosynthesis, increased the area and fresh mass of leaves and cotyledons, and raised the production of coumestrol, daidzein, genistein, luteolin and apigenin, mainly induced by SNP. For glyceollins and daidzin the CO₂ stimulatory effect was observed only by the induction with the β -glucan. Biochemical parameters related to soluble and structural carbohydrates from soybean seedlings also showed significant differences between the two CO₂ treatments. These results strengthen the suggestion that the increment in the carbon availability may modify the inducible defenses in soybean against pathogens. However, these alterations occur in specific metabolites and depend on the elicitor.

1 INTRODUÇÃO

Aquecimento global: CO₂

O gás carbônico (CO₂) é produzido naturalmente pela biosfera terrestre e pelos oceanos, e na atmosfera, juntamente com outros gases como o metano (CH₄), monóxido de carbono (CO) e óxido nitroso (N₂O), participa do processo natural de manutenção do aquecimento do planeta, o efeito estufa (Ghini, 2005; NOAA, 2007a). Alterações no ciclo do carbono advindas das atividades antrópicas, como a queima de combustíveis fósseis, desmatamento e atividades industriais, vêm provocando incremento gradativo e considerável na concentração de CO₂ atmosférico contribuindo, conseqüentemente, para o aumento do aquecimento global (NOAA, 2007a).

A concentração atual de CO₂ atmosférico é de 381,7 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Figura 1) de acordo com os últimos dados disponibilizados em agosto de 2006 pelo observatório mundial de Mauna Loa, Havaí (NOAA, 2007b).

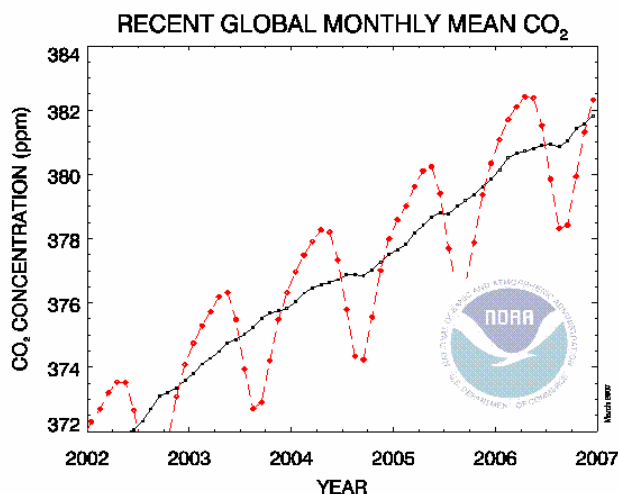


Figura 1. Concentração global de CO₂ atmosférico (ppm). (---●---) Valores mensais; (-.-) Médias dos valores mensais (NOAA, 2007c).

Os níveis deste gás vêm aumentando, a partir da Revolução Industrial, numa proporção de 0,48% ao ano e, se assim continuar, a previsão é de que para a metade deste século atinja o dobro de sua marca atual (IPCC, 2002).

Muitos trabalhos realizados com diferentes espécies vegetais indicam que podem haver profundas modificações na biodiversidade da Terra devido ao aumento na concentração de CO₂ atmosférico e do efeito estufa (Lindroth *et al.*, 1993; Aidar *et al.*, 2002; Chakraborty & Datta, 2003; Ghini, 2005). As mudanças climáticas, além de alterações na distribuição geográfica de espécies, podem afetar o metabolismo, o crescimento e outros processos fisiológicos das plantas, como suas respostas de defesa em decorrência do ataque de patógenos (Lindroth *et al.*, 1993; Chakraborty & Datta, 2003).

Efeito da atmosfera enriquecida em CO₂ sobre as plantas

Atmosferas enriquecidas em CO₂ geralmente aumentam a produtividade e o crescimento das espécies vegetais, incluindo a soja, principalmente através da elevação das taxas fotossintéticas e da redução da fotorrespiração, estabelecendo assim um saldo positivo de carbono, convertido em biomassa (Aidar *et al.*, 2002; Ainsworth *et al.*, 2002). Entretanto, as conseqüências que essas alterações podem causar direta ou indiretamente sobre as plantas são pouco conhecidas (Peñuelas & Estiarte, 1998; Deepak & Agrawal, 2001; Rogers *et al.*, 2004).

Na tentativa de compreender os efeitos do dióxido de carbono sobre as plantas, diversos trabalhos com diferentes enfoques têm sido realizados nos últimos anos. Esses experimentos geralmente são realizados em sistemas FACE “free-air CO₂ enrichment” ou em câmaras de topo aberto (CTA), nas quais o material vegetal é mantido em um ambiente enriquecido em CO₂,

através da injeção deste gás pela parte inferior da câmara (Aidar *et al.*, 2002; Nowak *et al.*, 2004).

Poorter *et al.* (1997) estudaram o aumento da concentração de CO₂ sobre a composição química de folhas de 27 espécies de plantas C₃ e constataram que as principais alterações nesses órgãos estavam relacionadas ao acúmulo de carboidratos totais não-estruturais e ao aumento da concentração de compostos fenólicos solúveis. Porém, a atmosfera enriquecida em CO₂ não influenciou as concentrações de carboidratos totais estruturais (celulose e hemiceluloses), ligninas e lipídeos, na maioria das espécies analisadas.

Estudo realizado por pesquisadores do Instituto de Botânica de São Paulo, com a espécie arbórea tropical de mata e cerrado, *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Heyne) Lee & Langenheim, revelou que o número de estômatos em folhas de jatobá crescido em altas concentrações de CO₂ (~720 µmol mol⁻¹) era cerca de 15% menor do que o medido nas mudas mantidas a 360 µmol mol⁻¹ (Costa, 2004). Entretanto, as plantas crescidas em 720 µmol mol⁻¹ mostraram um aumento de 50% no seu conteúdo de carboidratos e dobraram a absorção de gases do meio, sugerindo que, apesar de ter havido diminuição no número de estômatos, a eficiência destas estruturas celulares responsáveis por captar CO₂ foi aprimorada. Essas mudanças no índice estomático fazem parte do mecanismo de regulação do metabolismo da planta em elevadas atmosferas de CO₂, comparáveis supostamente àquelas a serem observadas no ambiente da Terra em 2075 (IPCC, 2002).

De forma semelhante, Deepak & Agrawal (2001), em estudo realizado com soja, relataram que houve diminuição da condutância estomática dessas plantas crescidas sob altas concentrações de CO₂, embora tenha havido estímulo da fotossíntese e maior disponibilidade de carboidratos.

Embora já exista uma quantidade relativamente grande de informações sobre o efeito

benéfico da elevada concentração de CO₂ no crescimento vegetal (Chakraborty, 2001; Brett, 2003; Ghini, 2005), há ainda poucos trabalhos publicados sobre os efeitos das mudanças climáticas sobre doenças de plantas.

Ainsworth *et al.* (2002), através de meta-análise, compararam os efeitos do incremento de CO₂ em 111 estudos realizados em soja, com 25 variáveis, e descreveram que o crescimento dessa espécie em alta [CO₂] é melhor, com aumento do peso da plântula e incremento na fotossíntese, que é cerca de 50% maior quando comparado ao de soja crescida em baixas concentrações de CO₂. O excesso de carbono, dependendo do estado nutricional da planta, pode levar a modificação na produção de metabólitos secundários de defesa (Veteli *et al.*, 2002; Braga *et al.*, 2006), os quais, por sua vez, alteram as respostas de plantas a herbívoros e a agentes patogênicos (Chakraborty & Datta, 2003).

CO₂ atmosférico e interação planta-patógeno

Alguns dos trabalhos que abordam os efeitos causados pela elevada concentração de CO₂ atmosférico em doenças de plantas sugerem que a resistência a patógenos pode aumentar nos tecidos vegetais devido ao incremento da taxa fotossintética (Hibberd *et al.*, 1996a), redução da densidade e condutância estomáticas (Hibberd *et al.*, 1996b), maior acúmulo de carboidratos nas folhas, maiores quantidades de ceras, camadas extras de células epidérmicas, aumento no teor de fibras (Owensby, 1994) e diferenças na síntese de compostos fenólicos (Hartley *et al.*, 2000; Castells *et al.*, 2002).

Hibberd *et al.* (1996a), estudando o efeito da atmosfera enriquecida em CO₂ na infecção por *Erysiphe graminis* em cevada, relacionaram as altas taxas fotossintéticas obtidas nas plantas

cultivadas sob 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 à redução nas taxas de penetração do patógeno, devido à maior mobilização de fontes de carbono para o incremento nos mecanismos de resistência, como a formação de papilas e deposição de ceras.

Diversas hipóteses fonte-dreno propostas nas últimas duas décadas, que relacionam a distribuição de compostos orgânicos para crescimento e/ou estocagem, sugerem grande acúmulo de metabólitos secundários nos tecidos vegetais, como compostos fenólicos e terpenóides, em resposta ao aumento da disponibilidade de CO_2 (Peñuelas *et al.*, 1997; Mattson *et al.*, 2005). Entretanto, os resultados experimentais obtidos com diferentes espécies vegetais são conflitantes, o que sugere que a alocação de carbono para a formação de metabólitos secundários pode não ser determinada unicamente por alterações na disponibilidade de esqueletos de carbono e de nutrientes (Koricheva *et al.*, 1998). Na verdade, modificações em resposta ao aumento de CO_2 apresentam grande variabilidade inter- e intraespecífica e dependência de outras variáveis ambientais (Peñuelas & Estiarte, 1998; Hartley *et al.*, 2000).

Fenilpropanóides, tais como flavonóides, parecem ser bastante sensíveis ao aumento de CO_2 . Concentrações elevadas de CO_2 causam, por exemplo, o incremento de 14% no conteúdo de flavonóides em folhas de trigo (Estiarte *et al.*, 1999). Incremento similar foi observado por Matros *et al.* (2006) em estudo com folhas de tabaco, o que desencadeou a resistência da planta e a redução da propagação do vírus PVY (vírus Y da batata) inoculado nestes tecidos, porém houve também um aumento na virulência dos organismos infectantes.

Em abacate, foi demonstrado que a manutenção de frutos e suspensões celulares em altas concentrações de CO_2 é suficiente para induzir a síntese de compostos antifúngicos derivados da via dos fenilpropanóides e reduzir o ataque pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Prusky *et al.*, 1996; Ardi *et al.*, 1998). O incremento na síntese de metabólitos de defesa nos frutos de

abacate levou à indução da transcrição de genes das enzimas fenilalanina-amônia-liase (PAL), chalcona-sintase (CHS) e flavanona-3-hidroxilase (F-3H) (Ardi *et al.*, 1998), enzimas-chave para a biossíntese de flavonóides nos vegetais (Yu & McGonigle, 2005).

Em sistemas agrícolas, nos quais a distribuição dos genes de resistência das plantas hospedeiras é amplamente determinada por seleção artificial, a aptidão dos patógenos em se reproduzir determina a rapidez com a qual estes irão se adaptar às mudanças genéticas das plantas. A virulência, definida como a habilidade genética de um patógeno específico em superar determinada resistência do hospedeiro, e a agressividade, que é a propriedade do patógeno em causar danos à planta hospedeira (Shaner *et al.*, 1992; Chakraborty & Datta, 2003), juntas, determinam a patogenicidade de uma população (Burdon, 1987). Chakraborty & Datta (2003) estudaram a agressividade do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (patógeno causador da antracnose) em atmosfera enriquecida em CO₂ em plantas de *Stylosanthes scabra* resistentes e suscetíveis a este organismo. Após 25 ciclos de infecção, os autores constataram que a agressividade do patógeno aumentou em ambas as cultivares, porém, com efeito pronunciado na cultivar resistente, e concluíram que a resistência destas plantas cultivadas sob elevada [CO₂] atmosférica, a longo prazo, não deve resultar em redução nos danos causados pelo patógeno.

Em contra partida, McElrone *et al.* (2005), estudando a espécie *Acer rubrum* cultivada em sistema FACE na Carolina do Norte (EUA), constataram que a longo prazo, a maior disponibilidade de CO₂ diminuiu a incidência e a severidade da doença causada pelo fungo *Phyllosticta minima* nas folhas, e inferiram que esta redução está relacionada ao aumento da produção de compostos fenólicos e à diminuição da qualidade nutricional da espécie.

Embora alguns trabalhos relatem aumento da suscetibilidade das plantas hospedeiras aos patógenos em atmosfera enriquecida de CO₂ (Chakraborty & Datta, 2003), as respostas

fisiológicas positivas ou negativas irão depender da espécie, dos compostos produzidos pelas plantas e das condições experimentais utilizadas nos ensaios (Mcelrone *et al.*, 2005)

Produção de fitoalexinas em resposta ao ataque patogênico

As plantas desenvolveram ao longo da evolução diversos mecanismos de defesa contra patógenos. As respostas de defesa mais comuns, provenientes da interação incompatível de uma planta resistente e um fitopatógeno avirulento, estão sob controle genético, que desencadeia uma cascata bioquímica de reações que resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), na resposta de hipersensibilidade (HR), no acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e na produção de fitoalexinas (Koch *et al.*, 1998; Lozovaya *et al.*, 2004; Salgado *et al.*, 2004).

Várias evidências sugerem que a produção de metabólitos antimicrobianos de baixo peso molecular, conhecidos como fitoalexinas, tem importante papel de resistência nas interações planta-patógeno. Os níveis desses compostos aumentam significativamente nas proximidades do sítio de infecção, em concentrações que podem ser tóxicas aos organismos infectantes (Paxton, 1995; Harborne, 1999).

A produção de fitoalexinas pode ser induzida por diferentes moléculas derivadas de microorganismos ou ainda por ação de agentes químicos e físicos (Stoëssl, 1986; Matros *et al.*, 2006). Substâncias como H_2O_2 , ácido salicílico, oligogalacturonídeos (Knorzer *et al.*, 1999) e ainda, respostas da planta a estresses abióticos como injúria mecânica, baixas temperaturas e deficiência hídrica (Smith, 1996) levam à síntese de fitoalexinas. Assim, estes metabólitos de defesa podem ser produzidos pela planta por ação de moléculas de origem biótica ou abiótica,

denominadas genericamente de eliciadores.

Estudos com soja têm trazido fortes evidências de que fitoalexinas possuem um papel importante na resistência desta espécie ao ataque de patógenos, podendo sua remoção genética transformar uma planta resistente em suscetível (Smith, 1996; Hammerschmidt, 1999; Harborne, 1999). Além disso, acredita-se que a rapidez na produção de fitoalexinas seja um fator importante na determinação da resistência, uma vez que a síntese destas moléculas de defesa ocorre também em muitas interações compatíveis, ou seja, quando o patógeno consegue se estabelecer na planta (Paxton, 1991; Modolo *et al.*, 2002).

Muitas fitoalexinas, particularmente aquelas produzidas pelas leguminosas, são flavonóides derivados da via dos fenilpropanóides. Os isoflavonóides, uma ampla subclasse dos flavonóides, estão associados aos efeitos benéficos à saúde humana através do consumo alimentar de leguminosas, principalmente da soja. Estes compostos são derivados do esqueleto básico do 3-fenilcromano de isoflavonas, que sofrem diversas modificações tais como metilação, hidroxilação ou polimerização. Estas modificações levam à formação de isoflavonóides simples como isoflavanonas, isoflavonas e isoflavonóis, bem como à síntese de estruturas mais complexas como os rotenóides, pterocarpanos e coumestanos (Dewick, 1993; Yu & Mcgonigle, 2005).

Produção de fitoalexinas em soja

As gliceolinas constituem o maior grupo de fitoalexinas produzido por plantas de soja. Esses compostos são rapidamente sintetizados *de novo*, após o contato do patógeno com a planta, como resultado da ativação do metabolismo secundário. São pterocarpanos derivados em parte da via dos fenilpropanóides, ocorrendo em uma série de isômeros (I-IV) (Paxton, 1995) (Figura 2),

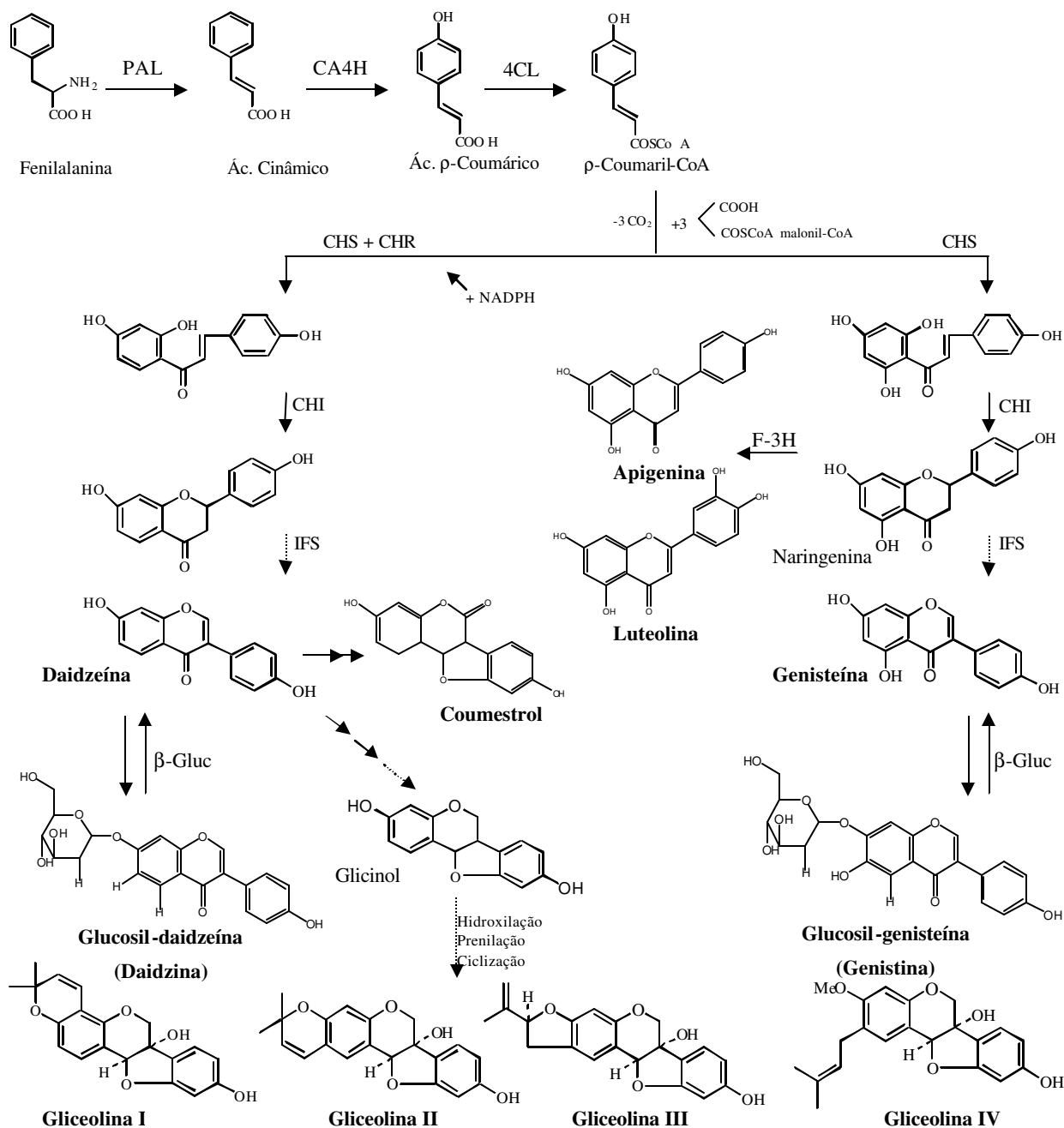


Figura 2. Biossíntese de isoflavonas (daidzeína e genisteína), isoflavonas glicosiladas (daidzina e genistina), pterocarpanos (gliceolinas), coumestano (coumestrol) e flavonas (apigenina e luteolina) em soja (Dixon & Paiva, 1995). PAL, fenilalanina amônia liase; CA4H, ácido cinâmico 4-hidroxilase; 4CL, 4-coumarato: coenzima A ligase; CHS, CHR, CHI, chakona sintase, redutase e isomerase, respectivamente; IFS, isoflavona sintase; β-Gluc: β-glucosidase e F-3H, flavanona-3-hidroxilase.

tendo como precursor a daidzeína, uma isoflavona di-hidroxilada (Cornille *et al.*, 1998; Harborne, 1999). O trabalho desenvolvido por Modolo *et al.* (2002), em cotilédones de soja, mostra o incremento na produção desses dois metabólitos quando induzidos pelo eliciador derivado do fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Dpm) ou por nitroprussiato de sódio (SNP), molécula doadora de óxido nítrico (NO).

O coumestrol, assim como as gliceolinas, tem a daidzeína como molécula precursora (Figura 2). Essa substância pertence à classe dos coumestanos, que são pterocarpanos muito oxidados (Dewick, 1993), e parece não alterar suas concentrações em cotilédones de soja quando induzidos por eliciadores derivados de glucanos, como constatado por Abbasi *et al.* (2001).

A fenilalanina amônia-liase (PAL) é a primeira enzima desta via, catalisando a desaminação de fenilalanina para formação do ácido cinâmico, que hidroxilado origina ácido p-coumárico. Este último pode sofrer reações sequenciais de condensação com malonil-CoA, cujo produto sob ação conjunta das enzimas chalcona sintase (CHS) e chalcona redutase (CHR) gera a daidzeína. Contudo, se o produto de condensação sofrer apenas a ação da chalcona sintase, forma-se uma flavona correspondente, intermediária-chave tanto para a biossíntese de genisteína (isoflavona trihidroxilada) quanto de apigenina e luteolina (flavonas).

A ativação da via dos fenilpropanóides pode levar a uma produção excessiva de pterocarpanos, que em pH fisiológico podem ser oxidados (Ingham *et al.*, 1981), apresentando coloração avermelhada (Zahringer *et al.*, 1981). Durante a infecção, além da ativação da síntese *de novo* de gliceolinas, conjugados de isoflavonas pré-formados, glucosil-daidzeína (daidzina) e glucosil-genisteína (genistina), comumente encontrados nos tecidos de soja, são hidrolisados por ação de β -glucosidases liberando daidzeína (o primeiro precursor das gliceolinas) e genisteína (Figura 2), que possuem atividade inibidora sobre o crescimento de fungos (Park *et al.*, 2001).

Óxido Nítrico

O óxido nítrico tem atraído grande interesse dos fitopatologistas, uma vez que esta molécula, por possuir a capacidade de se movimentar livremente através das membranas plasmáticas, mostrou-se importante na regulação das respostas de defesa em mamíferos, principalmente através da morte celular programada. Durante os últimos anos, um número crescente de evidências vem sugerindo que o radical óxido nítrico (NO) é capaz de agir também como um sinalizador para os vegetais, não só na morte celular programada em respostas de hipersensibilidade, como também em repostas sistêmicas adquiridas (Bethke *et al.*, 2004; Mur *et al.*, 2006), porém pode ser tóxico dependendo da sua taxa de produção e difusão e do estado de redução da célula (Delledonne, 2005).

O óxido nítrico está envolvido na resistência de plantas a doenças (Delledone *et al.*, 1998; Clarke *et al.*, 2000; Modolo *et al.*, 2006), participa da via de sinalização de morte celular hipersensitiva, ativa a expressão de genes de defesa (Romero-Puertas *et al.*, 2004), participa na sinalização do fechamento estomático (Neill *et al.*, 2002), do estresse oxidativo, da germinação, do crescimento e desenvolvimento da planta e das atividades mitocondriais (Yamasaki *et al.*, 2001; Beligni *et al.*, 2002; Neill *et al.*, 2003; Bethke *et al.*, 2004).

Os vegetais obtêm óxido nítrico a partir da atmosfera e do solo (através de processos de nitrificação e desnitrificação dependente de microrganismos) (Beligni & Lamattina, 2001) e também podem produzir esta molécula endogenamente a partir da L-arginina ou do nitrito (Modolo *et al.*, 2006).

A emissão de óxido nítrico para a atmosfera, o qual participa da oxidação química de hidrocarbonetos e da formação de ozônio na troposfera, vem aumentando nos últimos anos.

Diversos estudos apontam que a queima de combustíveis fósseis e de biomassa e alterações no uso do solo, como mudanças na estrutura da vegetação e o uso de fertilizantes nitrogenados, contribuem grandemente para a emissão de NO para o ambiente. Os solos são considerados fontes importantes deste gás, liberando globalmente 20 toneladas de nitrogênio ao ano na forma de NO para a atmosfera (Davidson & Kinglerlee, 1997; Beligni & Lamattina, 2001; Feig & Meixner, 2007; Pérez & Romero, 2007).

O óxido nítrico também é emitido por plantas em situações de estresse, como por exemplo, quando tratadas com herbicidas ou quando atacadas por patógenos. Esta molécula está disponível para os vegetais na atmosfera podendo interferir em seu metabolismo basal e acarretar efeitos extremos em sua fisiologia (Beligni & Lamattina, 2001). Esse efeito “colateral” começou a ser esclarecido quando Friebe *et al.* (1996) constataram que havia correlação positiva entre a concentração de NO atmosférico e a atividade de guanilil ciclase, enzima ativada por óxido nítrico, levando a considerar uma possível fonte exógena deste radical.

Para que as plantas estejam em equilíbrio com o NO interno e o NO atmosférico, elas devem ativar mecanismos de destoxificação para bloquear a interferência deste radical oriundo do ambiente (Delledonne, 2005).

Embora a capacidade de síntese de NO a partir da oxidação da L-arginina tenha sido observada em diversos tecidos vegetais, a enzima responsável por esta atividade ainda não foi isolada ou seu gene seqüenciado. A síntese de NO em plantas também tem sido atribuída à redução do nitrito pela enzima nitrato redutase (NR) (Rockel *et al.*, 2002; Mur *et al.*, 2006). Bethke *et al.* (2004) estudaram a síntese apoplástica de óxido nítrico em aleurona de *Hordeum vulgare* (cevada) e constataram que a formação desta molécula é favorecida em meios ácidos e pela presença da enzima nitrato redutase. Entretanto, Modolo *et al.* (2005) mostraram que

mutantes de *Arabidopsis thaliana* duplo-deficientes na NR apresentam a mesma capacidade de sintetizar NO que o tipo selvagem, quando nitrito é fornecido exogenamente. Desta forma, a enzima NR é importante neste processo apenas para fornecer o substrato para a síntese de NO. Estudos posteriores mostraram ainda que os mutantes NR-deficientes apresentam o conteúdo de aminoácidos, principalmente a L-arginina, reduzidos, mostrando que a deficiência na NR afeta a produção de dois substratos importantes para a síntese de NO, o que poderia explicar o aumento de suscetibilidade destes mutantes à bactéria *Pseudomonas syringae*, já que o NO é um importante sinalizador nas respostas de defesa (Modolo *et al.*, 2006).

Muitas respostas de defesa são estimuladas pelo NO e os níveis desse radical livre aumentam na planta após o ataque por patógenos (Modolo *et al.*, 2006). Modolo *et al.* (2002) estudaram o efeito do nitroprussiato de sódio (SNP), molécula doadora de óxido nítrico, em cotilédones de soja e detectaram maiores quantidades de daidzeína e genisteína quando induzidas por este eliciador após 12 horas de incubação em comparação à indução com eliciador derivado de Dpm. Os autores sugeriram que a produção de fitoalexinas em cotilédones de soja induzida por NO é mediada pela enzima óxido nítrico sintase e que a eliciação com Dpm deve envolver essa mesma via de sinalização.

A eficiência dos doadores de NO na indução de fitoalexinas variou em função da meia vida do composto e do estado de oxidação do radical liberado. Embora o SNP tenha sido bastante eficiente em promover o acúmulo de daidzeína, não foi capaz de estimular a produção de alguns produtos finais, como as gliceolinas (Modolo *et al.*, 2002). Estes resultados sugerem que a produção de intermediários da via dos fenilpropanóides pode ser controlada em função da natureza do eliciador, o que pode ser de interesse uma vez que estes compostos, além de apresentarem atividade antimicrobiana possuem várias propriedades terapêuticas.

Elicidores derivados de óxido nítrico e de β -glucanos

O termo eliciador, originalmente utilizado para se referir a moléculas e outros estímulos que induziam a síntese de fitoalexinas em células vegetais (Keen, 1975), hoje é comumente utilizado para moléculas que estimulam qualquer mecanismo de defesa em plantas, podendo ser de origem biótica ou abiótica. Metabólitos secretados por fungos e outras moléculas estruturais destes organismos têm sido isoladas e identificadas como potentes eliciadores, tais como oligossacarídeos, proteínas, glicoproteínas, lipídeos e enzimas cuja atividade hidrolítica sobre a parede celular do hospedeiro leva à liberação de eliciadores endógenos (Shibuya & Minami, 2001). Muitos trabalhos exploram a atuação de moléculas doadoras de óxido nítrico e beta-glucanos de fungos como potentes eliciadores (Cheong *et al.*, 1991; Modolo *et al.*, 2002; Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2006).

Os doadores de NO são compostos que liberam este radical quando aplicados em sistemas biológicos e são capazes de imitar a resposta relacionada ao óxido nítrico ou substituir a deficiência endógena deste radical (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2006). O NO pode existir em três estados de redução: NO^- , NO e NO^+ , nos quais cada molécula possui capacidade de interações específicas. Uma das ações do NO é o ataque eletrofílico aos grupos tiol, particularmente nos resíduos de cisteína, resultando na S-nitrosilação de moléculas como as glutatonas (antioxidantes) ou proteínas. O óxido nítrico também possui afinidade por metais de transição, como o $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ para formar complexos ferro-nitrosil, ligação que também parece atuar na regulação de atividades biológicas (Mur *et al.*, 2006).

O SNP (nitroprussiato de sódio), molécula doadora de NO^+ , tem sido extensivamente utilizada na terapia clínica (em animais) há mais de 70 anos, embora o mecanismo pelo qual o

NO é liberado ainda não tenha sido completamente elucidado. O que se sabe até o momento é que o SNP é uma molécula relativamente estável e não libera NO espontaneamente. A liberação deste radical requer redução elétrica única, a qual, sob condições fisiológicas, dependerá de agentes redutores, como por exemplo, ascorbatos, tióis, hemoproteínas, bem como NADH e NADPH (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2006; Miller & Megson, 2007).

A GSNO (*S*-nitrosoglutationa), outra molécula doadora de NO (eletricamente estável), é estruturalmente diferente do SNP. Esta molécula pertence à classe dos *s*-nitrosotióis e é caracterizada por apresentar o NO preso em sua estrutura por ligação única a um radical sulfidrílico, enquanto que o nitroprussiato de sódio tem este radical ligado ao Fe, o qual está envolvido por 5 cianetos (Figura 3), indicando que seus potenciais de indução em sistemas biológicos são distintos (Miller & Megson, 2007).

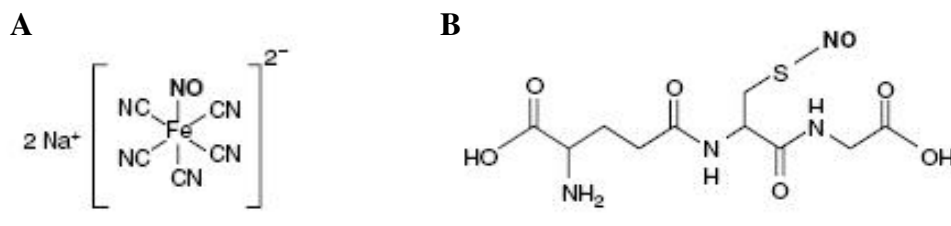
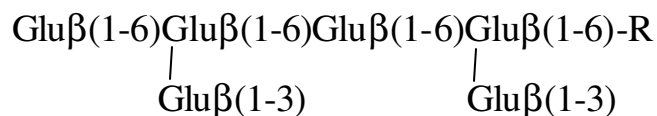


Figura 3. Estrutura molecular do nitroprussiato de sódio (SNP) (A) e *S*-nitrosoglutationa (GSNO) (B) (Miller & Megson, 2007).

O eliciador mais ativo já descrito é o hepta- β -glucosídeo, isolado de polissacarídeos da parede celular de *Phytophthora megasperma* (= *P. sojae*), por apresentar atividade eliciadora em concentrações muito baixas, da ordem de nM . A ramificação trissacarídica na porção terminal não-redutora da molécula dos oligo- β -glucosídeos é de extrema importância para a sua máxima

atividade eliciadora (Cheong *et al.*, 1991):



A soja tem o potencial de reconhecer um padrão molecular específico contido nas ramificações dos hepta- β -glucosídeos presentes nas paredes celulares dos fungos Oomicetos, como é o caso de *P. megasperma*. Esse reconhecimento deve-se a proteínas ligantes de β -glucanos presentes na superfície celular do vegetal, que desencadeiam uma série de reações específicas, incluindo a ativação de uma cascata de proteínas-quinase ativadas por mitogênese (MAPKs), até a transdução dos sinais para a síntese das fitoalexinas (Daxberger *et al.*, 2006).

Cancro da haste da soja

O Brasil tem selecionado diversas variedades de soja altamente produtivas e com diferentes graus de resistência a diferentes patógenos. Várias doenças afetam as plantações, dentre as quais se destaca o cancro da haste de soja, causado pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Dpm), doença que causou e ainda causa grandes perdas nas safras desta leguminosa no Brasil (Priolli *et al.*, 2004; Embrapa, 2007).

O cancro da haste da soja foi identificado no Brasil pela primeira vez na safra de 1988/89, introduzido na lavoura através de sementes e resíduos contaminados em máquinas e implementos agrícolas. Essa doença é caracterizada pela presença de lesões escuras na haste, principalmente próximas às inserções dos ramos laterais, e de clorose e necrose nas folhas. Os danos causados à soja dependem das condições climáticas, do estágio do ciclo de desenvolvimento da planta e da

suscetibilidade da cultivar (Tyler, 1996; Kimati, 1997; Vechiato *et al.*, 2006).

No sentido de tornar a soja mais produtiva e resistente a doenças e pragas, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) vem selecionando e melhorando geneticamente esta espécie, o que resultou na produção de variedades como a IAC-18, resistente ao cancro da haste e a IAC-14, resistente à doenças como pústula bacteriana, fogo selvagem e mosaico comum da soja, porém suscetível ao cancro da haste, dentre outras (IAC, 2000).

Braga *et al.* (2006) estudaram o efeito da alta disponibilidade de CO₂ atmosférico na produção de fitoalexinas, pela indução com β -glucano, em plântulas de duas cultivares de soja, IAC-14 e IAC-18, suscetível e resistente, respectivamente, ao cancro da haste, e constataram que somente a variedade resistente teve sua produção de gliceolinas intensificada. Os autores concluíram que o CO₂ atmosférico não afeta todos os metabólitos secundários analisados e que a resposta na produção de cada flavonóide é variável e depende da resistência da cultivar.

Importância farmacológica dos flavonóides

Muitos flavonóides têm sido estudados com perspectivas de utilidade farmacológica e de proteção à saúde, uma vez que atuam como moduladores de respostas imune e inflamatória, influenciam a atividade da musculatura lisa e ainda são agentes anticancerígenos, antivirais, antitóxicos e hepatoprotetores (Croteau *et al.*, 2000).

A soja é a fonte natural mais relevante de isoflavonas (Messina, 2003). O isoflavonóide de soja genisteína possui diversas atividades biológicas. É um potente antioxidante, atua como inibidor específico da enzima tirosina quinase e é considerado um fitoestrógeno (Wei *et al.*, 2003), uma vez que apresenta semelhanças estruturais com o potente estrógeno estradiol-17 α

(Dixon & Ferreira, 2002) e isto lhe confere a capacidade de se ligar aos receptores estrogênicos e proteínas ligadas a hormônios sexuais. Tem sido demonstrado que problemas causados pela deficiência de estrógeno em mulheres na pós-menopausa podem ser tratados com o uso da genisteína (Dixon & Ferreira, 2002), que parece também estar envolvida na redução do colesterol LDL em mulheres na pré-menopausa (MerzDemlow *et al.*, 2000).

A daidzeína é outro dos principais isoflavonóides da soja (Coward *et al.*, 1993; Adlercreutz, 1995). Esta isoflavona também é capaz de se ligar a receptores de estrógeno, induzir transcrição celular e eliciar atividades biológicas semelhantes às daquelas de outros estrógenos naturais (Setchell *et al.*, 2002).

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos avaliar os parâmetros de crescimento e de eficiência fotossintética e analisar a produção de fitoalexinas induzida por eliciadores fúngicos e de moléculas liberadoras de óxido nítrico em plântulas de soja crescidas em duas concentrações de dióxido de carbono ($380 \mu\text{mol mol}^{-1}$ e $760 \mu\text{mol mol}^{-1}$).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Sementes de soja (*Glycine max* L. Merr) da cultivar IAC-18 (resistente ao fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, agente causador do cancro da haste), fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas - SP, foram semeadas em vasos de 6 L. Para tanto, os vasos receberam uma camada de vermiculita (~3/5 do vaso) e uma de terra vegetal (~1/5 do vaso), sobre a qual 50 sementes foram dispostas e cobertas por outra camada de vermiculita. Os vasos foram mantidos por 9 dias em câmaras de topo aberto (conforme descrito no item 3.2) sob duas diferentes concentrações de CO₂ atmosférico (380 e 760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Foram utilizados sete vasos por tratamento, sendo as regas efetuadas sempre que o tensiômetro acoplado ao vaso atingia um valor de pressão de -20 Kpa. O sistema de rotação de vasos foi adotado para garantir a homogeneidade do experimento. Três experimentos foram realizados nos meses de janeiro/fevereiro de 2006 e outros três no mesmo período de 2007.

3.2. Tratamentos com CO₂

As câmaras de topo aberto (CTA), estruturas de alumínio envoltas em plástico transparente (diâmetro e altura = 2 m), acopladas a um sistema de ventilação (Figura 4), foram mantidas dentro da casa de vegetação da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, SP. A primeira CTA recebeu injeção de ar atmosférico e foi mantida à 380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ (ambiente); a segunda recebeu uma mistura de ar atmosférico e injeção de dióxido de carbono industrial (99,9%), resultando em uma atmosfera de

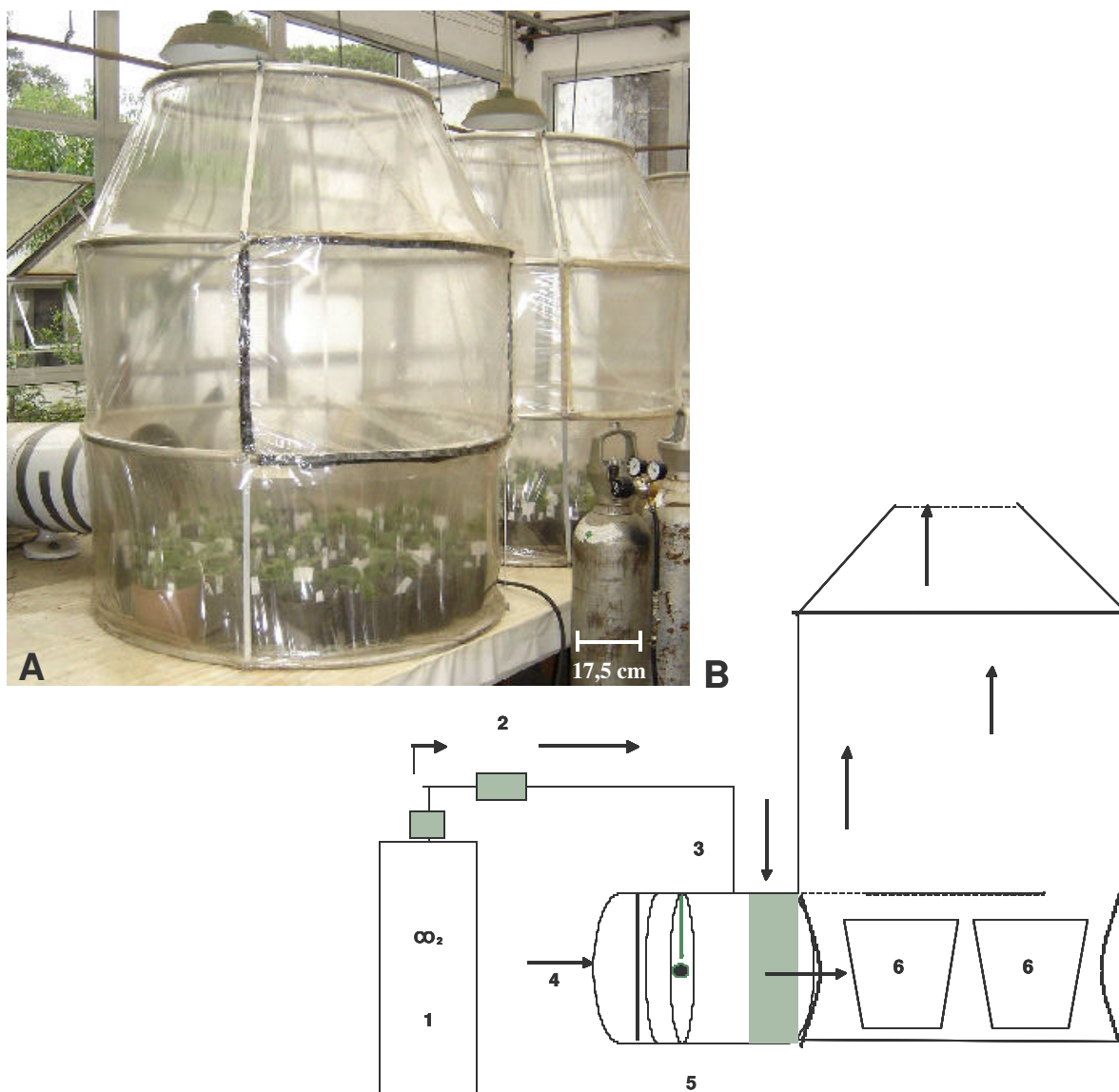


Figura 4. Câmara de topo aberto (A); Esquema do sistema de enriquecimento de CO₂ (B): 1- Cilindro de CO₂, 2- Válvula de regulagem, 3- Mangueira de gás, 4- Entrada para ar atmosférico, 5- Ventilador, 6- Vasos. A câmara ambiente ($380 \mu\text{mol l}^{-1}$) não possui os itens 1, 2 e 3. As setas indicam a direção do fluxo de gás ou de ar atmosférico.

760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (alta $[\text{CO}_2]$). Os gases foram injetados através de ventilação forçada na parte inferior das câmaras.

As concentrações de CO_2 e a temperatura dentro das câmaras foram monitoradas ao longo de todo o experimento através de um medidor de concentração atmosférica de CO_2 (TESTO 535, Germany) e de termômetros de máxima e mínima.

3.3. Trocas gasosas

A fotossíntese (A), transpiração, condutância estomática (g) e eficiência do uso da água (EUA) foram avaliadas através de medidas de trocas gasosas efetuadas nas folhas ($n = 10$) das plântulas de soja com 9 dias de idade, através de um analisador de gases infravermelho (IRGA, Li-Cor 6400), conforme descrito por Aidar *et al.* (2002). Foram realizadas 5 medidas em cada folha no período da manhã.

3.4. Fluorescência da clorofila “a”

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada nas folhas ($n = 10$) de soja com 9 dias de idade no período da manhã, através de um fluorômetro Opti-Sciences OS5-FL.

3.5. Emergência e crescimento de plântulas

A porcentagem de emergência das plântulas de soja foi avaliada em ambos os tratamentos, atmosfera ambiente e enriquecida em CO₂, no 9º dia de cultivo em todos os vasos mantidos nas CTAs, cada vaso foi considerado como uma replicata.

Após 9 dias de crescimento, as plantas de cada tratamento foram avaliadas quanto aos seguintes parâmetros: área cotiledonar e foliar (n = 20), comprimento do epicótilo, hipocótilo e raiz, altura das plantas (n = 16) e massas frescas (n = 15) e secas (n = 20) da parte aérea e raiz. Amostras das plantas também foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido para as análises bioquímicas (itens 3.7, 3.8, 3.9 e 3.11).

3.6. Atividade da nitrato redutase

A atividade da nitrato redutase, enzima envolvida no metabolismo do N, foi quantificada a partir de 100 mg de tecido fresco de folhas e cotilédones de soja com 9 dias de idade. Aos tecidos foram adicionados 2,5 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM pH = 7,5, contendo 100 mM de KNO₃ e 1,5% de propan-1-ol. As amostras foram mantidas em dessecador a vácuo, por 30 minutos, e em seguida incubadas à 25°C por 1 hora no escuro. A uma alíquota de 1 ml desta amostra foi adicionado 1 ml de ácido sulfanílico 1% e 1 ml de NED (α -naphtyl ethylenediamine dihydrochloric) 0,05%. A solução foi mantida por 30 minutos em temperatura ambiente e a absorbância medida a 540 nm em espectrofotômetro. A atividade enzimática foi expressa em pMol.NO₂.s⁻¹.g⁻¹ de massa fresca de tecido (Stewart *et al.*, 1986).

3.7. Conteúdo total de carbono e nitrogênio

Cem mg de folhas e cotilédones (item 3.5) de 25 plantas dos dois tratamentos (~380 e ~760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2) foram secas, pulverizadas e submetidas à espectrometria de massas segundo o método de Stewart *et al.* (1995) no Laboratório de Ecologia Isotópica CENA/USP – Piracicaba – SP, para determinação do conteúdo total de carbono e nitrogênio.

3.8. Carboidratos

Amostras de folhas e cotilédones congeladas (item 3.5) foram maceradas em nitrogênio líquido, liofilizadas e os materiais resultantes extraídos 5 vezes com etanol 80% a 85°C por 15 minutos. Após centrifugação a 8000 g por 10 minutos, os sobrenadantes foram reunidos para a obtenção dos açúcares solúveis e para análise dos teores de açúcares totais e redutores pelos métodos de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) e Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945), respectivamente, tendo glucose como padrão, os resultados foram expressos em mg glucose por g de matéria seca. O resíduo da extração etanólica foi submetido à extração de amido com KOH 0,2 M, incubado em banho-maria a 100 °C por 30 min. Após resfriamento, foi acrescentada à solução 0,2 ml de ácido acético 1 M e a solução foi novamente incubada com 2 ml de acetato de sódio 100 mM pH = 4,6 contendo 6 unidades de amiloglucosidase à 55 °C por 1h. A reação foi interrompida por 5 min a 100 °C e a quantidade de glucose produzida avaliada por GOD-POD (Glicose PAP Liquiform 1) (Vu *et al.*, 2001). O conteúdo de carboidratos totais não estruturais (CTN) foi calculado pela somatória dos teores de açúcares solúveis e amido, conforme descrito por Rogers *et al.* (2004). Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.9. Celulose de folhas e cotilédones

Amostras congeladas de folhas e cotilédones (item 3.5) foram maceradas em nitrogênio líquido, liofilizadas e pulverizadas. Trezentos mg deste material foram lavados com 6 ml de água destilada fria (2x), de clorofórmio:metanol (v/v) por duas vezes, de acetona (2x), de éter etílico (3x) e novamente com água destilada. A cada lavagem o material foi centrifugado a 10000 g (Braga *et al.*, 1998). Após a última lavagem com água destilada, foi realizada uma extração com DMSO 90% (v/v) durante 24 horas, sob agitação constante. Após remoção do DMSO, o resíduo foi submetido a três lavagens com água destilada. O resíduo foi congelado e seco em liofilizador. O material seco foi extraído com NaOH 4M (12 horas) para a retirada das pectinas metilesterificadas e das hemiceluloses, lavado por 3 vezes com água destilada, congelado e seco em liofilizador. Para a digestão dos resíduos de polissacarídeos não celulósicos foram adicionados 5 ml de solução Updegraff (5% de ácido nítrico e 15% de ácido acético em água); os tubos foram levados à banho-maria por 90 minutos a 100° C e em seguida centrifugados a 10000 g. O precipitado foi lavado com água destilada por três vezes, congelado e seco em liofilizador. O peso seco final foi considerado como a quantidade de celulose presente no material.

3.10. Açúcares solúveis

Os sobrenadantes obtidos pela extração etanólica (item 3.8) foram analisados quanto à presença de glucose, frutose e sacarose por cromatografia aniônica de alto desempenho com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dx-300, utilizando uma coluna Carbo-Pac PA1 eluída com 0,9 ml/min de NaOH 16 mM isocrático. A identificação dos açúcares foi feita por comparação com os tempos de retenção obtidos para padrões comerciais disponíveis

de glucose, frutose e sacarose.

3.11. Compostos fenólicos

Dez ml de metanol e água (1:1) foram adicionados a 50 mg de macerado de folhas e cotilédones (item 3.5) de soja, removidos das plantas crescidas em atmosfera ambiente ou enriquecida em CO₂. A suspensão obtida foi mantida em refluxo por 1 min, filtrada e o sobrenadante submetido à quantificação de fenóis totais utilizando-se o método analítico de Folin-Dennis (Swain & Hillis, 1959), tendo ácido tânico como padrão.

3.12. Obtenção dos eliciadores

Para a indução da síntese de fitoalexinas foram utilizados dois eliciadores bióticos, dois abióticos e água deionizada como controle. Cepas de fungo *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dpm), o agente etiológico do cancro da haste de soja, foram obtidas no Centro de Fitossanidade do Instituto Agronômico de Campinas-SP. Extratos derivados de esporos do fungo (Dpm) foram obtidos segundo procedimento descrito por Modolo *et al.* (2002) e quantificados em equivalentes de glucose por volume de solução, pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). A concentração foi ajustada para 13 mg em equivalentes de açúcar por cotilédone (Modolo *et al.*, 2002). O eliciador derivado do β -glucano de *Phytophthora megasperma* (β -GLU) foi fornecido pelo Dr. Michael G. Hahn (University of Georgia-USA) e utilizado na concentração de 0,1 μ g/ml.

Nitroprussiato de sódio (SNP) foi fornecido aos cotilédones na forma de solução aquosa a 10 mM. A solução de GSNO (S-nitrosoglutathione) foi preparada poucos minutos antes do

bioensaio utilizando-se glutathione reduzida e NaNO_2 em quantidades equimolares. A solução foi ajustada para pH 2 e após 15 minutos em temperatura ambiente, foi neutralizada (pH = 7,0) e mantida em banho de gelo. O GSNO foi aplicado nos cotilédones na concentração de 10 mM, condição estabelecida em ensaios preliminares (Mathews & Kerr, 1993; Modolo *et al.*, 2002 e Dra. Ione Salgado, comunicação pessoal).

3.13. Bioensaio com cotilédones de soja e análise da produção de fitoalexinas

Os cotilédones destacados de plântulas de soja com 9 dias de idade foram lavados e desinfestados com hipoclorito de sódio comercial a 10%. Um ferimento de 50,24 mm² foi aberto na face adaxial dos cotilédones com o auxílio de um furador de rolhas e um bisturi e nele aplicados 50 µl de água deionizada ou dos eliciadores a serem testados. Em placa de Petri, sobre papel de filtro umedecido com água destilada foram colocados 8 cotilédones (Figura 5); todos os tratamentos foram realizados em triplicata. As placas de Petri foram mantidas em estufa a 28 °C, no escuro, por um período de 12 e 20 horas e então os cotilédones foram lavados com água destilada (1 ml/cotilédone).

Porções de tecido dos cotilédones junto ao sítio de inoculação foram removidas com o auxílio de um bisturi e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análise da atividade das enzimas fenilalanina amônia- liase (PAL) (item 3.15), β - glucosidase (item 3.16) e flavanona-3-hidroxilase (F3H) (item 3.17), da via dos fenilpropanóides, e envolvidas na hidrólise de conjugados glicosilados dos precursores de fitoalexinas, e na conversão de naringenina em flavonas, respectivamente, como mostra a Figura 2.



Figura 5. Aspecto dos cotilédones de soja dispostos em placa de Petri após injúria e aplicação dos eliciadores.

3.14. Análise de flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os exudatos oriundos dos tratamentos com os eliciadores ou com água (item 3.13.) foram preparados para serem cromatografados em CLAE. As amostras foram extraídas três vezes com acetato de etila bi-destilado (Keen, 1978). As frações orgânicas foram recolhidas, desidratadas por filtração em sulfato de sódio anidro, secas, ressuspensas em metanol grau HPLC (50 μ l/cotilédone) e cromatografadas para identificação de daidzina (glucosil-daidzeína), daidzeína, genistina (glucosil-genisteína), genisteína, coumestrol, gliceolinas, apigenina e luteolina. Padrões comerciais autênticos (Sigma) de daidzeína, genisteína, daidzina, genistina, coumestrol, apigenina e luteolina foram utilizados para identificar e quantificar os metabólitos presentes nas amostras.

As flavonas foram analisadas em cromatógrafo Varian Pro-Star, coluna C-18 de 0,46 x 15,00 cm em gradiente linear de metanol (50 a 100%) e água contendo 1% de ácido fórmico (20 a 50%) a 1,2 ml/min, por 20 min, a 350 nm (Modolo *et al.*, 2002); os demais metabólitos foram

analisados no mesmo cromatógrafo, segundo metodologia descrita por Pelicice *et al.* (2000) em gradiente linear de 20 a 100% de acetonitrila contendo 0,1% TFA (ácido trifluoracético) e água contendo 0,1% de TFA em gradiente linear de 40 a 80%, por 65 min, a 0,8 ml/min a de 286 nm. Para quantificação dos metabólitos foi efetuada uma curva padrão variando-se a concentração de cada composto comercial puro e analisando-se a área do pico correspondente a cada substância. Para quantificar gliceolinas foi utilizada a curva padrão da daidzeína, sua molécula precursora, por não haver padrão comercial disponível.

3.15. Atividade da fenilalanina-amônia-liase (PAL)

A atividade da PAL foi realizada de acordo com o método descrito por Prusky *et al.* (1996), com modificações. Dois ml de tampão tris-HCl 10 mM pH 7,0 foram adicionados à 0,4 g de matéria fresca de cotilédones (previamente maceradas com nitrogênio líquido) dos ensaios de 12 e 20 horas, conforme descrito no item 3.13. O homogenato foi centrifugado à 10000 g por 10 minutos à 4°C e considerado como extrato enzimático contendo a PAL. O sobrenadante foi reservado em banho de gelo para o ensaio enzimático e para a dosagem de proteínas totais efetuada pelo método de Bradford (1976), tendo albumina de soro bovino como padrão. A 200 µl do extrato enzimático (sobrenadante) foram adicionados 1,2 ml de tampão tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo 6,0 mM de L-fenilalanina. O extrato foi incubado à 37°C por 60 min. A reação foi interrompida pela adição de 100 µl de HCl 0,5 M. O mesmo procedimento foi feito para as amostras controle (branco), porém os sobrenadantes de cada amostra foram fervidos por 10 min. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro à 290 nm e a atividade enzimática específica expressa em µmoles ácido cinâmico mg proteína⁻¹ min.⁻¹. Para maior facilidade de interpretação,

os valores obtidos nas amostras controle foram descontados.

3.16. Atividade da β -glucosidase (β -gluc)

A medida da atividade das β -glucosidases foi realizada de acordo com o método descrito por Hsieh & Graham (2001), com modificações. À 0,4 g de matéria fresca de cotilédones (previamente maceradas com nitrogênio líquido), obtida conforme item 3.13, foram adicionados 0,5 ml de tampão fosfato de sódio 200 mM, pH = 6,0 e após homogeneização manual utilizando gral e pistilo, os extratos foram centrifugados à 10000 g à 4 °C por 10 min e o procedimento repetido por 3 vezes. Os sobrenadantes foram combinados e reservados. O precipitado foi extraído novamente com 0,5 ml de tampão fosfato de sódio pH 6,0 contendo 0,5 M de NaCl por 1 hora à 4°C. Os sobrenadantes foram combinados com os demais e considerados como extrato enzimático. Cem μ l do extrato enzimático foram incubados com 500 μ l de p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo (PNP) 50 mM em tampão citrato-fosfato pH 6,0 por 15 min à 40 °C. A reação foi interrompida pela adição de 1 ml de carbonato de sódio 0,1 N. O mesmo procedimento foi feito para as amostras controle (branco), porém os sobrenadantes de cada amostra foram fervidos por 10 min. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro à 495 nm e a atividade enzimática específica expressa em μ moles de p-nitrofenol liberado por mg de proteína. min.⁻¹. As medidas foram efetuadas em triplicatas.

3.17. Atividade da flavanona-3-hidroxilase (F-3H)

A atividade da F-3H foi realizada de acordo com o método descrito por Beno-Moualem *et al.* (2001), com modificações. Um ml de tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,3, contendo 0,2 g de PVP

(poli vinil polipirrolidona) foi adicionado à 0,3 g de matéria fresca de cotilédones (previamente maceradas com nitrogênio líquido) dos ensaios de 12 e 20 horas, obtidos conforme descrito no item 3.13. O homogenato foi centrifugado à 10000 g por 20 minutos à 4°C e considerado como extrato enzimático contendo a F-3H. O sobrenadante foi reservado em banho de gelo para o ensaio enzimático e para a dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). À 100 µl do extrato enzimático (sobrenadante) foram adicionados 0,5 ml de tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,3 contendo 0,03 mM de naringenina e 0,03 mM de NADPH. O extrato foi incubado à 37°C por 90 min. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de HCl 2 M. O mesmo procedimento foi feito para as amostras controle (branco), porém os sobrenadantes de cada amostra foram fervidos por 10 min. As amostras foram extraídas três vezes com acetato de etila bi-destilado (Keen, 1978). As frações orgânicas foram recolhidas, secas, ressuspensas com 200 µl de metanol grau HPLC e cromatografadas (pelo método das flavonas, descrito no item 3.14) para identificação de naringenina, apigenina e luteolina. Padrões comerciais autênticos (Sigma) foram utilizados para identificar e quantificar estes metabólitos presentes nas amostras. A atividade enzimática específica foi expressa pelo desaparecimento de naringenina ($\mu\text{moles por mg de proteína. min.}^{-1}$).

3.18. Análise estatística

Todos os parâmetros bioquímicos, de crescimento e de fotossíntese foram conduzidos pelo menos em triplicatas e os dados obtidos submetidos à análise de variância ANOVA por Tukey ($p < 0,05$) utilizando-se o Winstat como software.

4 RESULTADOS

4.1. Crescimento das plântulas de soja em atmosfera ambiente e enriquecida em CO₂

Os resultados de crescimento aqui apresentados referem-se a um dos 3 experimentos realizados nos períodos de Jan/Fev de 2006, os quais subsidiaram os experimentos de indução realizados nos mesmos meses do ano de 2007 com plântulas de 9 dias de idade. Apenas um experimento de indução é apresentado neste trabalho, quando menor variação amostral foi observada.

A temperatura máxima e mínima e os valores de concentração de CO₂ dentro das câmaras foram acompanhados durante todo o período, às 13:00 h (Tabela 1). A média da concentração de dióxido de carbono obtida na câmara ambiente foi de $379 \pm 9 \mu\text{mol mol}^{-1}$ e para a câmara contendo alta [CO₂] o valor médio foi de $760 \pm 11 \mu\text{mol mol}^{-1}$. Dados de temperatura dos 9 dias de experimento do ano de 2006 foram gentilmente fornecidos pelo Instituto de Astronomia Geofísica e Ciências Atmosféricas da USP, localizado próximo ao Instituto de Botânica (Figura 6).

Tabela 1. Valores (média dos 9 dias do experimento) de concentração de CO₂ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura (°C) dentro das câmaras de topo aberto (CTAs).

Ano		380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$			760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$		
		Mín.	Max.	Média	Mín.	Max.	Média
2006	CO ₂	370	388	379	749	771	760
	($\mu\text{mol mol}^{-1}$)						
	Temp. °C	33	45	39	33	45	39
2007	CO ₂	375	385	380	751	769	760
	($\mu\text{mol mol}^{-1}$)						
	Temp. °C	27	42	34,5	27	42	34,5

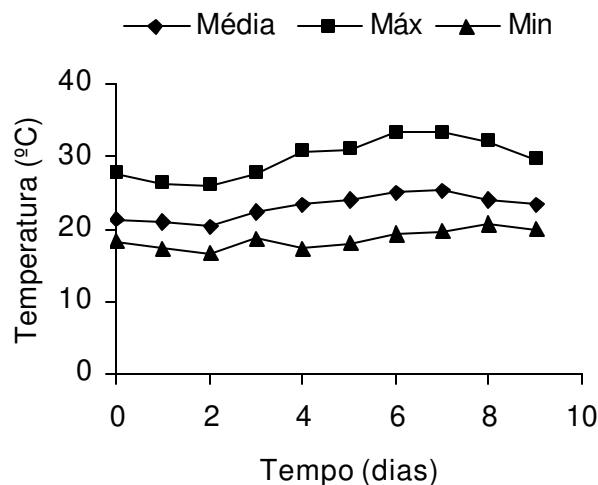


Figura 6. Temperaturas (°C) referentes aos dias 30 de janeiro a 8 de fevereiro de 2006, período do experimento.

Os dados de crescimento das plântulas de soja com 9 dias de idade estão apresentados na Tabela 2. Os valores de raízes foram desconsiderados por haver muita perda de material no processo de separação do substrato (vermiculita), devido a grande fragilidade e facilidade de rompimento destes tecidos.

As plântulas de soja apresentaram taxas de emergência significativamente maiores na câmara com elevada concentração de CO₂ (97%) quando comparadas com aquelas mantidas em atmosfera ambiente, com 89% de plântulas emergidas (Tabela 2).

Em atmosfera enriquecida em CO₂ houve incremento significativo nas áreas foliares (28%) (Figura 7 A) e cotilédones (28,5%) das plântulas em comparação com aquelas crescidas em atmosfera ambiente. Também foi observado aumento nos valores de matéria fresca de folhas e cotilédones (Tabela 2).

As plantas cultivadas em atmosfera contendo elevada $[\text{CO}_2]$ apresentaram-se mais altas do que as plantas controle, diferença estabelecida pelo comprimento dos epicótilos (Figura 7 B), os quais também apresentaram pequeno aumento de massa fresca (Tabela 2).

Tabela 2. Emergência e parâmetros de crescimento de plântulas de soja cultivadas em atmosfera ambiente ($\sim 80 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e no dobro da concentração ($760 \mu\text{mol mol}^{-1}$). As letras comparam as médias entre os dois tratamentos com CO_2 por Tukey ($p < 0,05$).

	Matéria fresca (g) (n = 15)		Matéria seca (g) (n = 20)		Área (mm^2) (n = 20)		Comprimento (cm) (n = 16)		Emergência (%) (n = 200)	
	380	760	380	760	380	760	380	760	380	760
Hipocótilo	0,40 ^A	0,41 ^A	0,03 ^A	0,03 ^A	-	-	9,9 ^A	9,59 ^A	-	-
Epicótilo	0,14 ^A	0,18 ^B	0,01 ^A	0,01 ^A	-	-	5,94 ^A	6,67 ^B	-	-
Cotilédone	0,33 ^A	0,37 ^B	0,03 ^A	0,03 ^A	219,5 ^A	282,0 ^B	-	-	-	-
Folha	0,21 ^A	0,25 ^B	0,03 ^A	0,03 ^A	716,4 ^A	917,4 ^B	-	-	-	-
Sementes	-	-	-	-	-	-	-	-	89 ^A	97 ^B

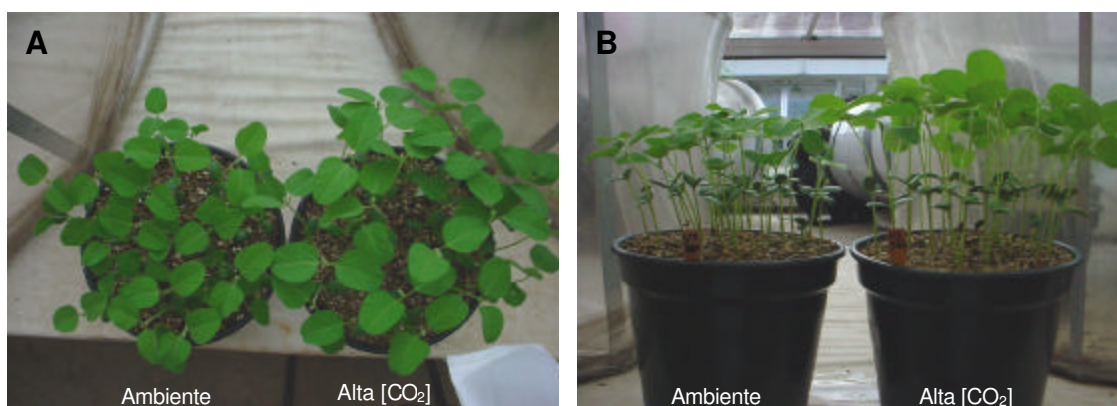


Figura 7. Plântulas de soja (*Glycine max* L. Merr) com 9 dias de idade mantidas em atmosfera contendo $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (ambiente) e $760 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (alta $[\text{CO}_2]$). Aspecto da área foliar (A); Aspecto da altura das plântulas (B).

No 9º dia de desenvolvimento da plântula, os parâmetros fotossintéticos (Figura 8) e a eficiência do fotossistema II das folhas de soja foram avaliados. Apesar do pequeno incremento em carboidratos (Figura 9), a fotossíntese apresentou um aumento de 97,7% em resposta ao aumento do CO₂ atmosférico (Figura 8 A), embora não tenha havido diferenças entre os tratamentos quanto à eficiência do fotossistema II (dados não mostrados).

As plântulas de soja crescidas em atmosfera ambiente apresentaram maior perda de água por transpiração (Figura 8 B) e maior condutância estomática (Figura 8 C) do que as plântulas crescidas em atmosfera enriquecida em CO₂, que como consequência apresentaram incremento de 61,1% na eficiência no uso da água (Figura 8 D).

Os valores de amido, carboidratos totais não-estruturais (CTN), celulose e açúcares totais e redutores encontram-se na Figura 9. As folhas apresentaram maiores quantidades de amido (Figura 9 A) e celulose (Figura 9 B) quando comparadas aos cotilédones em ambas as atmosferas. Foi observado incremento de amido nos cotilédones (30,7%) e de celulose (22,5%) nas folhas de plântulas crescidas sob alta [CO₂] (Figura 9 A e B).

Os açúcares totais (Figura 9 C) e os CTNs, representados pela soma dos açúcares solúveis e do amido (Figura 9 D), apresentaram pequeno aumento nos cotilédones das plântulas de soja com 9 dias de idade cultivadas sob atmosfera enriquecida em CO₂. Os valores de açúcares redutores foram semelhantes entre as atmosferas, enriquecida em CO₂ e ambiente, porém com valores muito mais altos nos cotilédones (Figura 9 E).

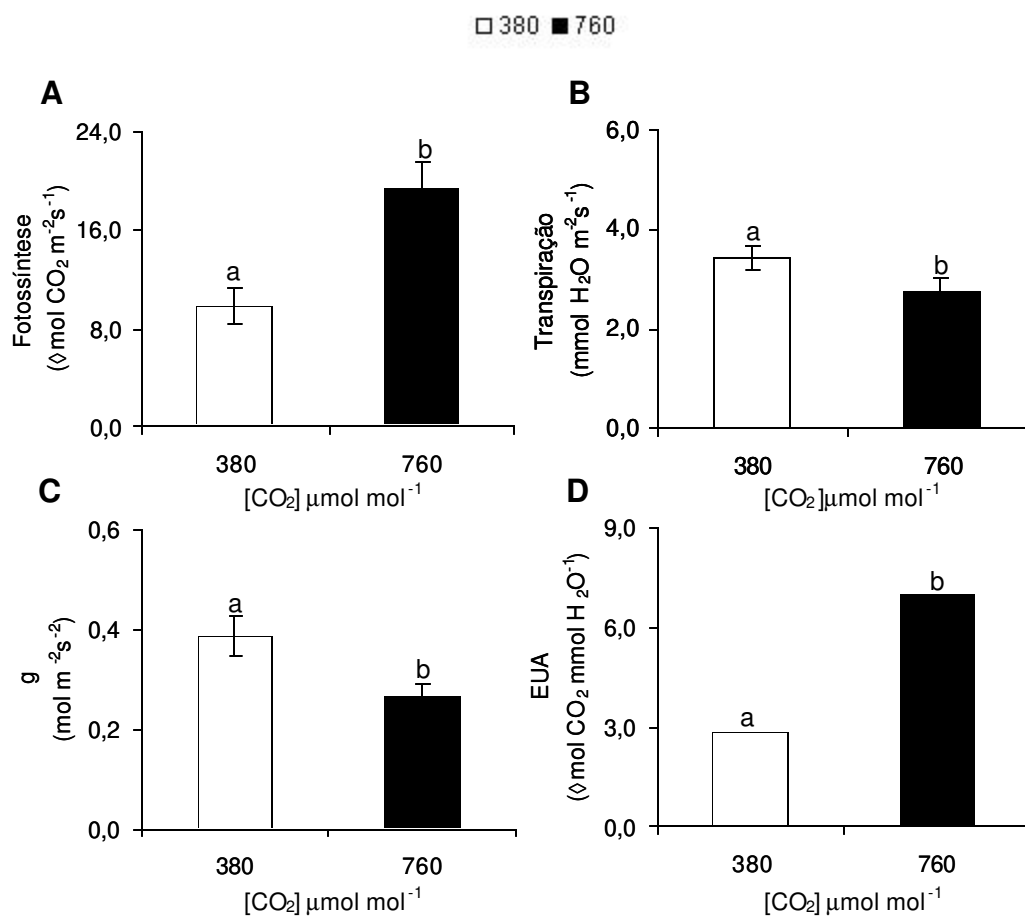


Figura 8. Fotossíntese (A), transpiração (B), condutância estomática (g) (C) e eficiência do uso da água (EUA) (D) em folhas (n = 10) de plântulas de soja com 9 dias de idade crescidas em atmosfera ambiente (380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) ou enriquecida em CO₂ (760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) por 9 dias. As letras indicam o grau de significância entre os tratamentos por Tukey (p < 0,05).

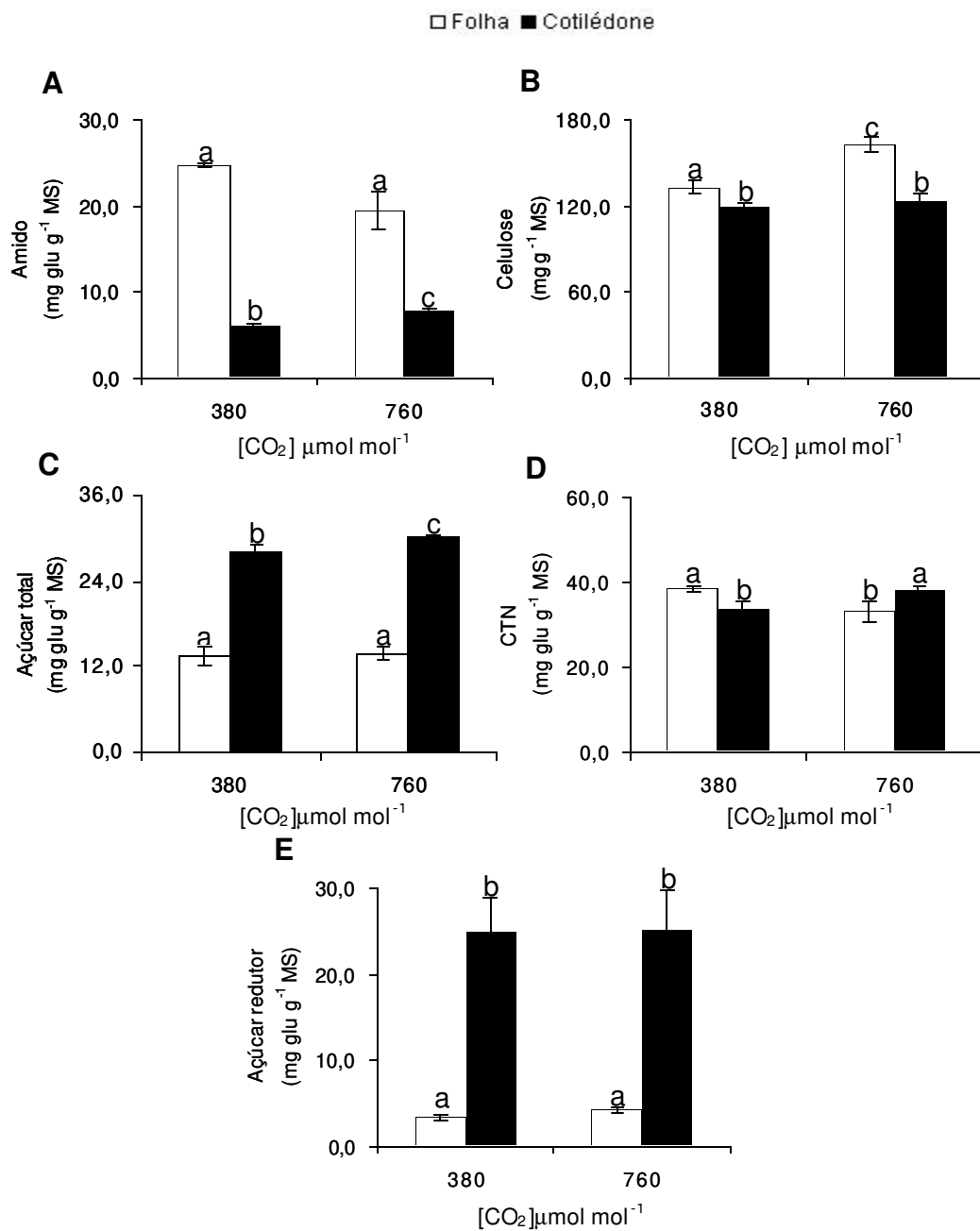


Figura 9. Teor de amido (A), celulose (B), açúcares totais (C), carboidratos totais não estruturais (CTN) (D) e açúcares redutores (E) de folhas e cotilédones (n = 25) de plântulas crescidas em atmosfera ambiente (380 µmol mol⁻¹) ou enriquecida em CO₂ (760 µmol mol⁻¹) por 9 dias. Valores expressos em µg glu g⁻¹ por massa seca (MS), exceto para a celulose (mg g⁻¹ MS). As letras indicam o grau de significância entre os tratamentos por Tukey (p < 0,05).

Os dados de HPLC (Figura 10) indicam que a proporção e a qualidade dos açúcares de folhas e cotilédones são semelhantes entre os tratamentos. Nas folhas, a sacarose é encontrada em maior quantidade e os açúcares redutores, glucose e frutose, em menor proporção, ambos por volta de 4 mg g⁻¹ de matéria seca (Figura 10 A). Os cotilédones, por possuírem a função de órgão de reserva, apresentaram valores muito mais altos de açúcares quando comparados às folhas (Figura 10 B), e a quantidade de sacarose aumentou em relação aos cotilédones das plântulas crescidas em atmosfera ambiente, dado que está de acordo com o incremento de açúcares totais observado para estes órgãos (Figura 9 D).

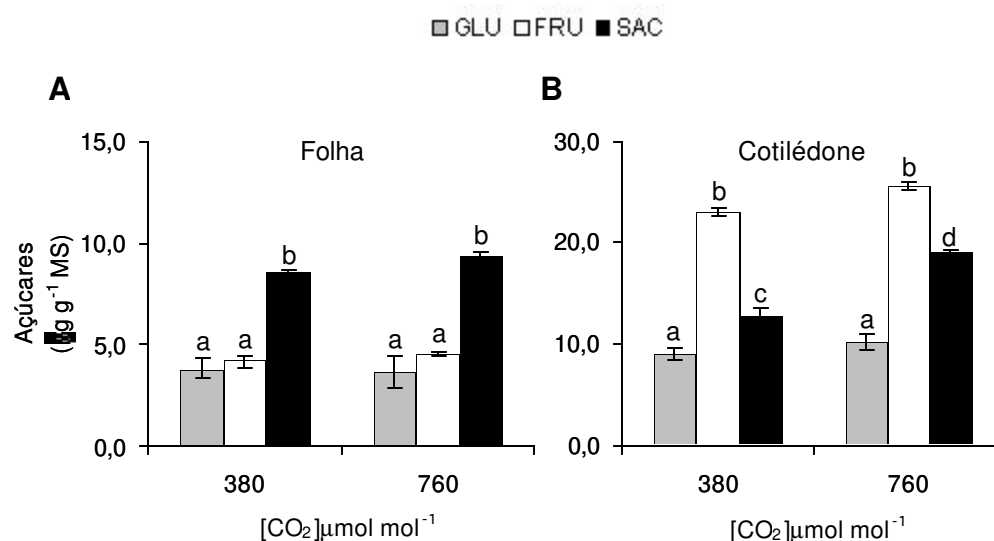


Figura 10. Glucose, frutose e sacarose de folhas (A) e cotilédones (B) (n = 25) de plântulas de soja crescidas em atmosfera ambiente (380 μmol mol⁻¹) e enriquecida em CO₂ (760 μmol mol⁻¹) por 9 dias. Valores expressos em μg g⁻¹ por massa seca (MS). As letras indicam o grau de significância entre os tratamentos por Tukey (p < 0,05).

A relação e a porcentagem de carbono e nitrogênio em folhas e cotilédones das plântulas de soja foram avaliadas por espectrometria de massa e são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Relação de carbono e nitrogênio e porcentagem destes compostos em folhas e cotilédones de plântulas de soja com 9 dias de idade crescidas em duas concentrações de CO₂ (μmol mol⁻¹).

	380 μmol mol ⁻¹		760 μmol mol ⁻¹	
	Folha	Cotilédone	Folha	Cotilédone
C (%)	40,09	39,59	40,60	41,02
N (%)	6,74	6,50	6,83	6,22
C/N (%)	5,95	6,09	5,95	6,59

A porcentagem de nitrogênio total nas plântulas em estágio de cotilédone (VC) é bem alta, típica de leguminosas. O nitrogênio e o carbono são compostos que parecem estar bem distribuídos pela planta, pois houve pouca diferença entre os tecidos analisados, porém essa pequena diferença resultou em um aumento de 0,5 na relação carbono/nitrogênio dos cotilédones das plantas cultivadas em elevado CO₂, enquanto as folhas de ambos os tratamentos apresentaram valores semelhantes entre si (Tabela 3).

A enzima nitrato redutase, que reduz o nitrato, forma pela qual o N é transportado pelas plantas, em nitrito, apresentou valores muito mais altos nas folhas do que nos cotilédones (Figura 11) e não foi influenciada pela atmosfera enriquecida em gás carbônico.

Sabendo-se que o aumento do gás carbônico atmosférico pode causar mudanças na composição química das plantas, como por exemplo, aumentar a concentração de fenóis, metabólitos secundários de defesa (Peñuelas & Estiarte, 1998; Hunter, 2001), foram feitas análises de compostos fenólicos totais em folhas e cotilédones de soja. Nas folhas de plântulas crescidas em atmosfera enriquecida em CO₂ houve redução no conteúdo de fenóis, perfil inverso ao obtido para os cotilédones (Figura 12).

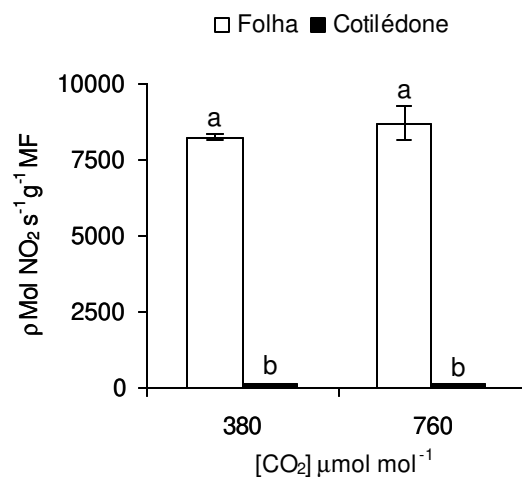


Figura 11. Atividade de nitrato redutase em folhas e cotilédones (n = 25) de plântulas de soja crescidas em atmosfera ambiente (380 μmol mol⁻¹) e enriquecida em CO₂ (760 μmol mol⁻¹) por 9 dias. As letras indicam o grau de significância entre os tratamentos por Tukey (p < 0,05).

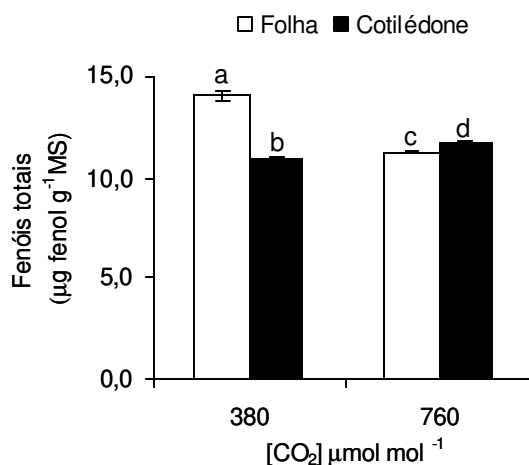


Figura 12. Compostos fenólicos totais em folhas e cotilédones (n = 25) de plântulas de soja crescidas em atmosfera ambiente (380 μmol mol⁻¹) ou enriquecida em CO₂ (760 μmol mol⁻¹) por 9 dias. Valores expressos em μg fenol g⁻¹ massa seca (MS). As letras indicam o grau de significância entre os tratamentos por Tukey (p < 0,05).

4.2. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja crescida em atmosfera ambiente e enriquecida em CO₂

As análises por HPLC dos metabólitos produzidos na eliciação dos cotilédones de soja por 12 e 20 horas indicam que a proporção e a qualidade dos mesmos diferiram entre os tratamentos, os períodos de indução e entre os tipos de eliciadores utilizados (Figuras 13 a 16).

A daidzina (daidzeína glicosilada) (Figura 2) foi produzida apenas pela eliciação por SNP e pelo β -glucano de *Phytophthora megasperma* (β -GLU) no período de 12 horas de incubação (Figura 13 A), sendo o CO₂ um fator estimulante de sua produção quando eliciada pelo β -GLU. No período de 20 horas de incubação, não foi observada sua produção por nenhum dos eliciadores em ambas as atmosferas de CO₂ utilizadas (Figura 13 B).

A daidzeína (Figura 2 e Figura 13 C e D), molécula precursora das gliceolinas, parece ter o seu pico de produção após 20 horas de eliciação, principalmente por indução dos eliciadores que possuem NO em sua constituição, o SNP e GSNO (Figura 13 D). Essa produção foi incrementada pelo dióxido de carbono quando o SNP foi utilizado como eliciador.

O β -GLU apresentou-se como o melhor indutor de gliceolinas em atmosfera enriquecida em CO₂ em ambos os períodos de incubação (Figura 13 E e F), embora seu maior efeito tenha sido observado com 12 horas de indução (Figura 13 E). Nesse período, não foi possível perceber incremento na produção de gliceolinas induzidas por SNP, indicando que o β -GLU induz o acúmulo desses metabólitos mais rapidamente do que o SNP, considerando-se que a maior indução pelo SNP ocorre após 20 horas de incubação (Figura 13 F). A produção de gliceolinas induzida por SNP, em ambos os períodos de incubação, não sofreu interferência da disponibilidade maior de carbono promovida pela alta concentração de CO₂ (Figura 13 E e F).

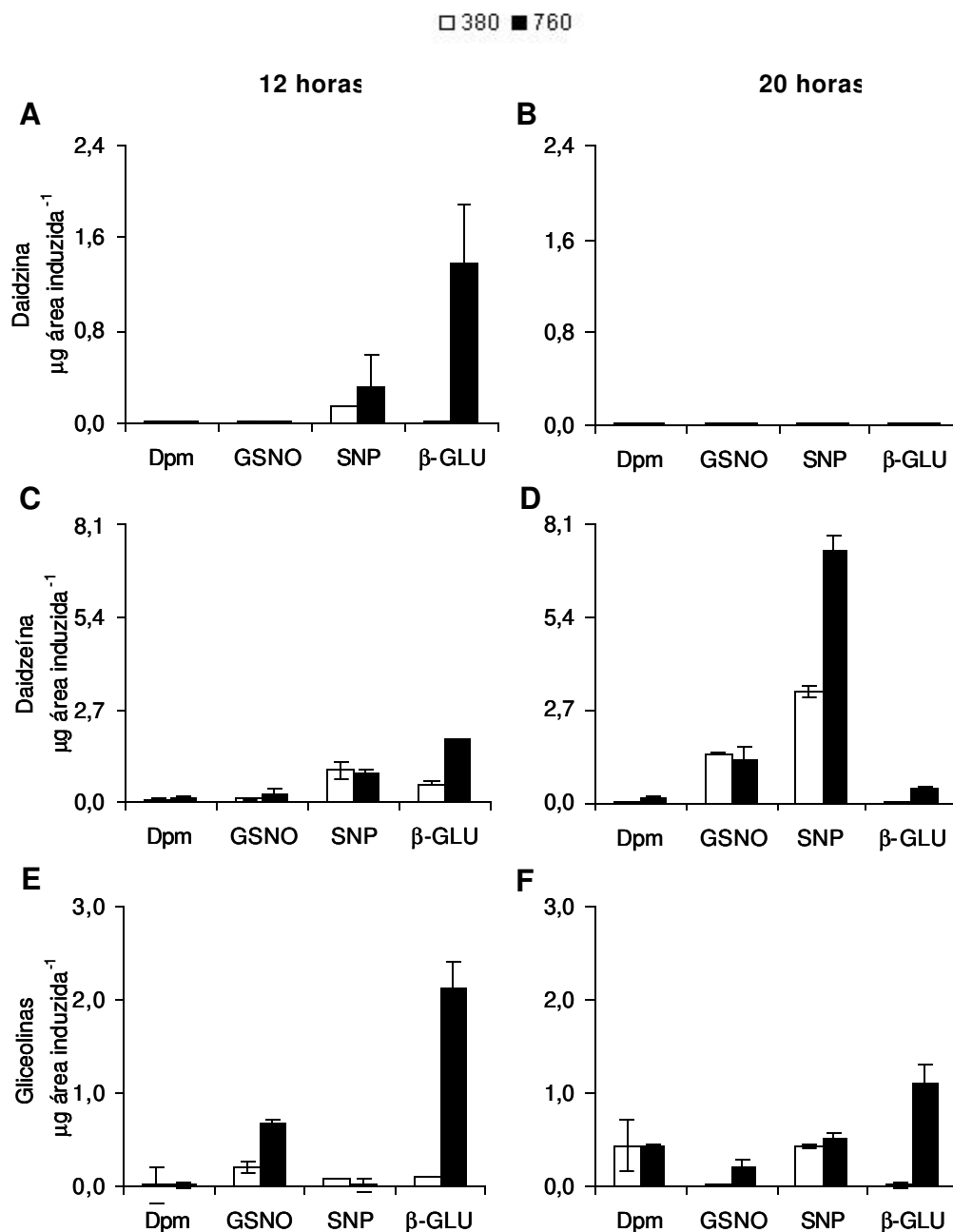


Figura 13. Produção de daidzina (A), daidzeína (B) e gliceolinas (C) em cotilédones (n = 21) de plântulas de soja crescidas em atmosfera ambiente ($\sim 380 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e enriquecida em CO_2 ($\sim 760 \mu\text{mol mol}^{-1}$) por 9 dias em resposta aos eliciadores DPM (*Diaporthe phaseolorum*), GSNO (*S*-nitrosoglutationa), SNP (nitroprussiato de sódio) e β -GLU (β -glucano de *P. megasperma*), após 12 e 20 horas de incubação. Os valores do controle (água) foram descontados. Área cotiledonar induzida = $50,24 \text{ mm}^2$. As barras representam o desvio padrão da média.

O GSNO não induziu a produção de daidzina, apenas de daidzeína, principalmente na incubação de 20 horas (Figura 13 D), porém em menor concentração quando comparado à indução por SNP. A alta $[\text{CO}_2]$ parece não influenciar produção de daidzeína induzida por GSNO, ao contrário do observado para o SNP (Figura 13 D). A produção de gliceolinas é estimulada por GSNO, principalmente em 12 horas de incubação, sendo essa produção influenciada pela atmosfera enriquecida em CO_2 , porém em menor escala quando comparada com a indução pelo β -GLU (Figura 13 E). Com 20 horas de incubação, a indução de gliceolinas pelo GSNO resultou em valores inferiores aos de 12 horas, porém, em ambos os períodos de incubação, quando se tem a atmosfera enriquecida em CO_2 , estes valores foram superiores quando comparados à atmosfera ambiente (Figura 13 E e F).

Conforme mostrado na Figura 14, o SNP foi o eliciador mais eficaz na indução da produção de coumestrol (Figura 2) com 20 horas de incubação, seguido pelo GSNO, sendo ambos influenciados pela alta concentração de CO_2 atmosférico (Figura 14 B). Os eliciadores fúngicos, Dpm e β -GLU, foram menos eficazes em induzir a produção de coumestrol nos períodos de incubação analisados.

A produção de genistina (genisteína glicosilada) (Figura 2), semelhantemente à daidzina (Figura 13 A e B), é melhor induzida pelo β -GLU e sofre influência do dióxido de carbono no período de incubação de 12 horas (Figura 15 A). Com 20 horas de incubação, o melhor indutor parece ser o GSNO em condições de CO_2 ambiente (Figura 15 B).

Doze horas de incubação parecem não ser suficientes para a produção de genisteína e genistina nos cotilédones eliciados com doadores de NO (Figura 15). As maiores respostas são encontradas com 20 horas de incubação, principalmente na indução por SNP, seguida do GSNO

na produção de genisteína (Figura 15 D).

Foi observado maior acúmulo de daidzina quando comparada à genistina no período de 12 horas de incubação por eliciação com o β -GLU (Figuras 13 A e 15 A). Houve também acúmulo preferencial de daidzeína em relação à genisteína com 20 horas de incubação, quando a eliciação foi feita por SNP (Figuras 13 D e 15 D), sendo o CO_2 estimulante dessa produção em ambos os casos.

O acúmulo de apigenina e luteolina (Figura 16) foi favorecido pela atmosfera enriquecida em CO_2 apenas quando induzido por SNP no período de 20 horas de incubação, porém a indução da flavona apigenina (Figura 16 D) foi muito maior em relação à luteolina (Figura 16 B).

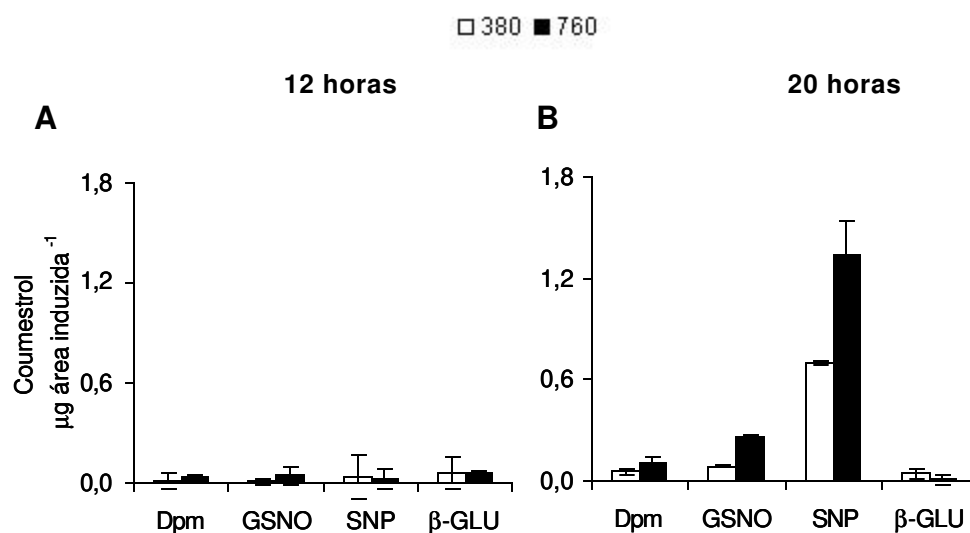


Figura 14. Produção de coumestrol em cotilédones (n = 21) de plântulas de soja crescidas em atmosfera ambiente (380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e enriquecida em CO_2 (760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) por 9 dias em resposta aos eliciadores Dpm (*Diaporthe phaseolorum*), GSNO (*S*-nitrosoglutathione), SNP (nitroprussiato de sódio) e β -GLU (β -glucano de *P. megasperma*), após 12 e 20 horas de incubação. Os valores do controle (água) foram descontados. Área cotiledonar induzida = 50,24 mm^2 . As barras representam o desvio padrão da média.

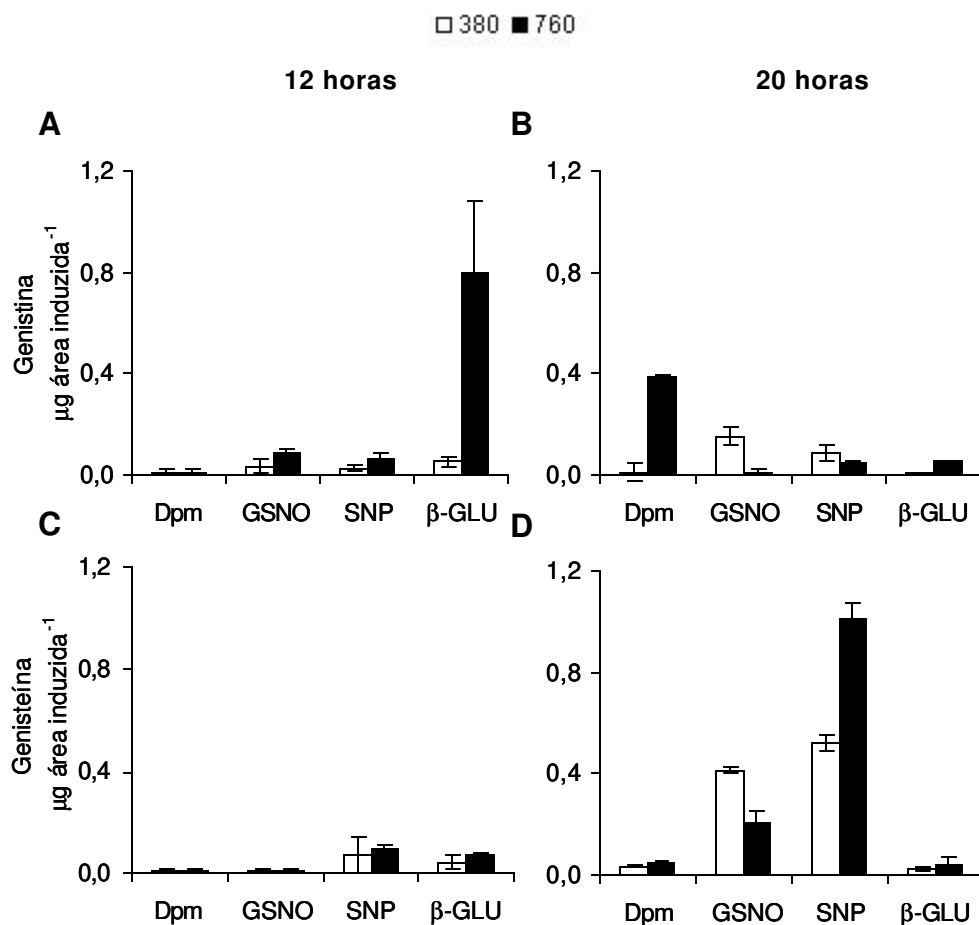


Figura 15. Produção de genistina (A) e genisteína (B) em cotilédones (n = 21) de plântulas de soja crescidas em atmosfera ambiente (380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e enriquecida em CO₂ (760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) por 9 dias em resposta aos eliciadores Dpm (*Diaporthe phaseolorum*), GSNO (*S*-nitrosoglutationa), SNP (nitroprussiato de sódio) e β-GLU (β-glucano de *P. megasperma*), após 12 e 20 horas de incubação. Os valores do controle (água) foram descontados. Área cotiledonar induzida = 50,24 mm². As barras representam o desvio padrão da média.

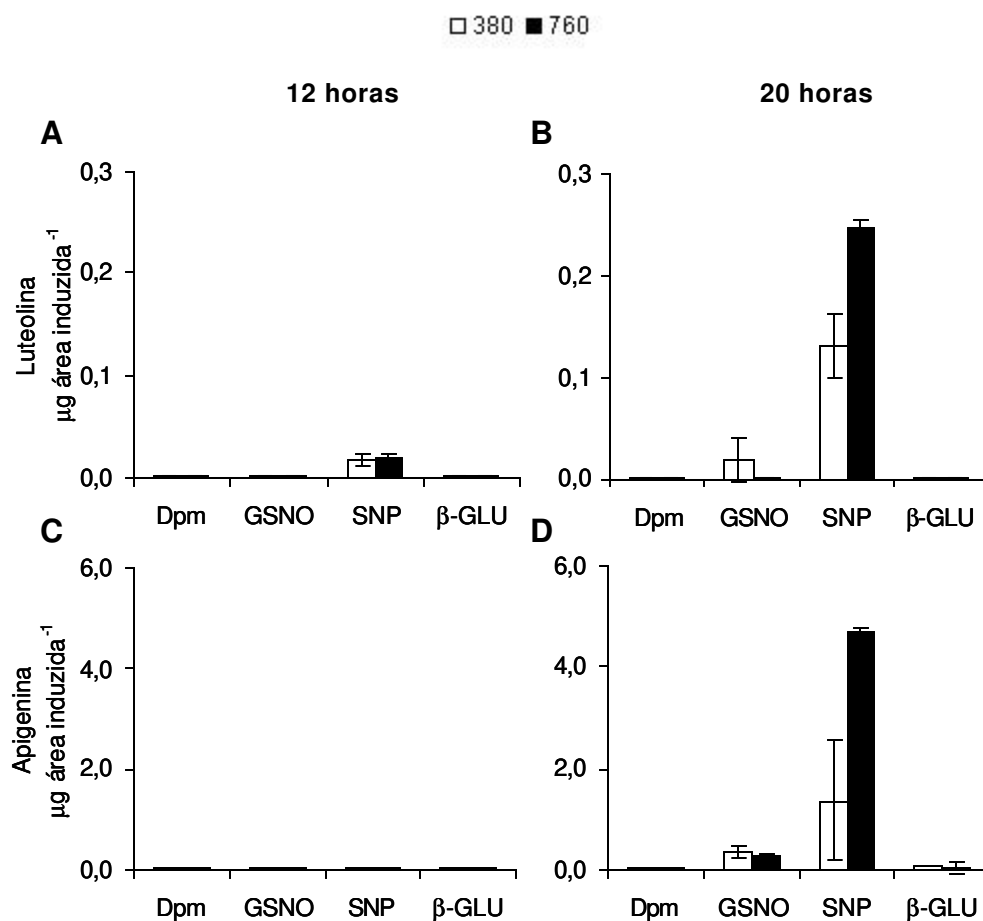


Figura 16. Produção de (A) luteolina e (B) apigenina em cotilédones (n = 21) de plântulas de soja crescidas em atmosfera ambiente (380 μmol mol⁻¹) e enriquecida em CO₂ (760 μmol mol⁻¹) por 9 dias em resposta aos eliciadores Dpm (*Diaporthe phaseolorum*), GSNO (*S*-nitrosoglutationa), SNP (nitroprussiato de sódio) e β-GLU (β-glucano de *P. megasperma*), após 12 e 20 horas de incubação. Os valores do controle (água) foram descontados. Área cotiledonar induzida = 50,24 mm². As barras representam o desvio padrão da média.

4.3. Atividade das enzimas PAL, β -gluc e F-3H nos cotilédones eliciados

A atividade da fenilalanina-amônia-liase (PAL), enzima que atua no início da via dos fenilpropanóides, transformando a fenilalanina em ácido cinâmico, foi diferente entre os tratamentos com os eliciadores e também entre os períodos de incubação de 12 e 20 horas, como apresentado na Figura 17.

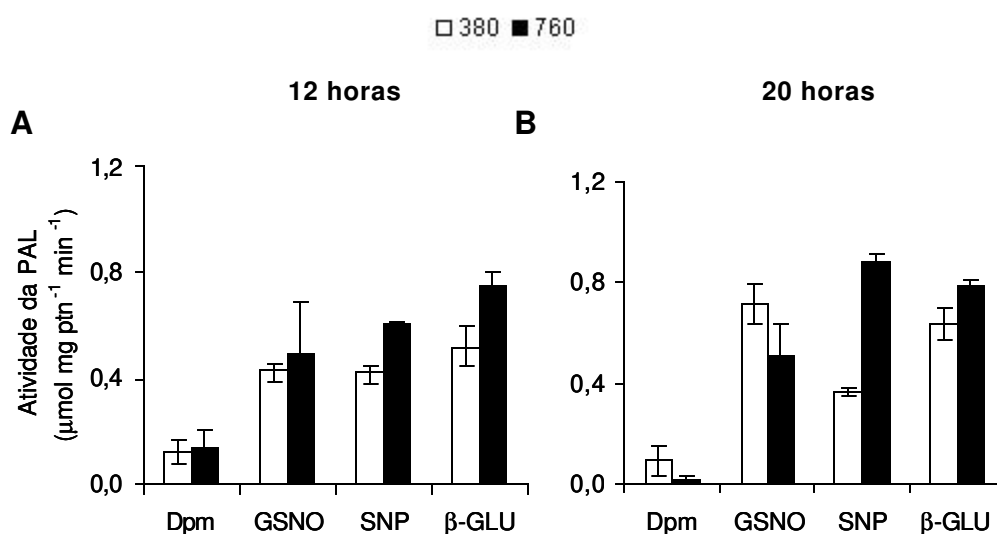


Figura 17. Atividade da fenilalanina-amônia-liase (PAL) medida em cotilédones ($n = 15$) de plântulas de soja crescidas em atmosfera ambiente ($380 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e enriquecida em CO_2 ($760 \mu\text{mol mol}^{-1}$) por 9 dias em resposta aos eliciadores Dpm (*Diaporthe phaseolorum*), GSNO (*S*-nitrosoglutationa), SNP (nitroprussiato de sódio) e β -GLU (β -glucano de *P. megasperma*). Incubação por 12 h (A) e incubação por 20 h (B). Os valores do controle (água) foram descontados. As barras representam o desvio padrão da média.

A PAL apresentou atividade em ambos os períodos de incubação pela indução com todos os eliciadores utilizados, sendo o CO₂ um fator estimulante da atividade desta enzima, com diferenças significativas apenas na eliciação com SNP e β-GLU (Figura 17). A atividade da PAL foi mais pronunciada, no período de 12 horas de incubação, na indução pelo β-GLU naquelas plantas cultivadas em atmosfera enriquecida em CO₂ em relação ao SNP neste mesmo período (Figura 17 A). No período de 20 horas a indução desta enzima por SNP foi bastante estimulada pela alta disponibilidade de CO₂, enquanto que para o GSNO a resposta foi oposta, tendo sido a atividade da enzima diminuída com o aumento CO₂ (Figura 17 B).

A atividade da β-glucosidase (β-gluc), enzima que faz a clivagem das ligações beta-glicosídicas de compostos conjugados com glucose, no caso, a glucosil-daidzeína (daidzina) e glucosil-genisteína (genistina), formando respectivamente daidzeína e genisteína (Figura 2), é mostrada na Figura 18. A incubação dos cotilédones de soja com GSNO, SNP e β-GLU mostrou eliciação variável na atividade da enzima β-glucosidase em ambos os períodos de incubação. Foi notável o fator estimulante da atmosfera enriquecida em CO₂ na indução por SNP com 12 e 20 horas de incubação (Figura 18 A e B) e por β-GLU apenas no período de 20 horas (Figura 18 B).

A atividade da enzima flavanona-3-hidroxilase (F-3H) foi quantificada pelo consumo de naringenina (Figura 19), substrato necessário para a formação das flavonas apigenina e luteolina (Figura 2). Embora seja também possível visualizar a formação dessas duas flavonas nos cromatogramas obtidos (Figura 20), estes dados não foram utilizados para a quantificação da atividade da enzima devido à formação de outros produtos, por ação da F-3H, que podem não aparecer nos perfis cromatográficos obtidos pelo sistema de eluição utilizado.

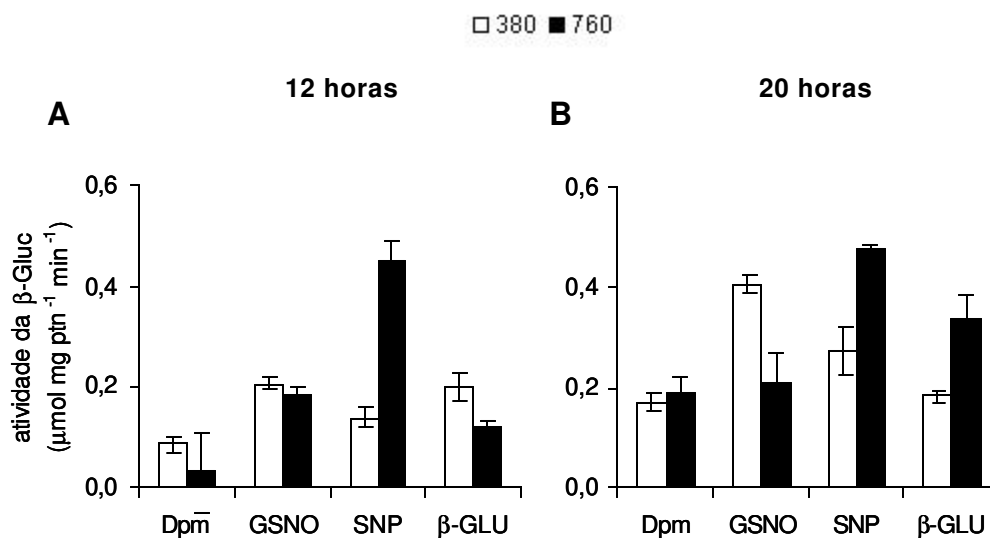


Figura 18. Atividade da β -glucosidase (β -gluc) medida em cotilédones ($n = 15$) de plântulas de soja crescidas em atmosfera ambiente ($380 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e enriquecida em CO_2 ($760 \mu\text{mol mol}^{-1}$) por 9 dias em resposta aos eliciadores Dpm (*Diaporthe phaseolorum*), GSNO (*S*-nitrosoglutathione), SNP (nitroprussiato de sódio) e β -GLU (β -glucano de *P. megasperma*). Incubação por 12 h (A) e incubação por 20 h (B). Os valores do controle (água) foram descontados. As barras representam o desvio padrão da média.

O consumo de naringenina nos cotilédones induzidos por GSNO foi maior no período de incubação por 12 horas (Figura 19 A), embora para este período não tenha sido observada a produção de nenhuma das flavonas analisadas (Figura 16) por nenhum dos eliciadores. O SNP induziu o consumo de naringenina pela F-3H em ambos os períodos de incubação, porém com 20 horas é possível perceber a influência da atmosfera enriquecida em CO_2 nesta atividade (Figura 19 B). O consumo de naringenina dos extratos induzidos por SNP estão apresentados na Figura 20.

O β -GLU foi o melhor indutor da atividade da F-3H para o período de 20 horas, porém esta indução não sofreu influência significativa da atmosfera enriquecida em CO_2 (Figura 19 B).

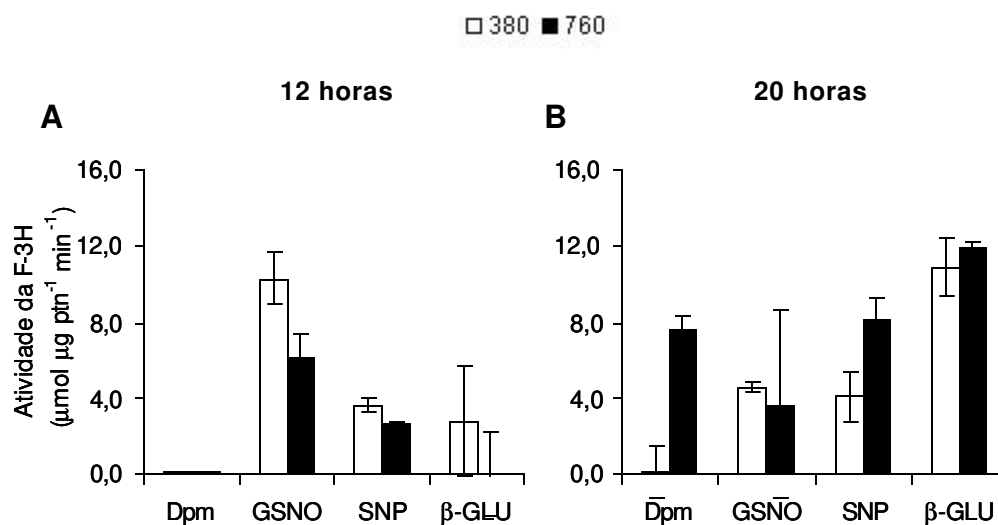


Figura 19. Atividade da flavanona-3-hidroxilase (F-3H) medida em cotilédones ($n = 9$) de plântulas de soja crescidas em atmosfera ambiente ($380 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e enriquecida em CO_2 ($760 \mu\text{mol mol}^{-1}$) por 9 dias em resposta aos eliciadores Dpm (*Diaporthe phaseolorum*), GSNO (nitrosoglutamina), SNP (nitroprussiato de sódio) e β -GLU (β -glucano de *P. megasperma*). Incubação por 12 h (A) e incubação por 20 h (B). Os valores do controle (água) foram descontados. As barras representam o desvio padrão da média.

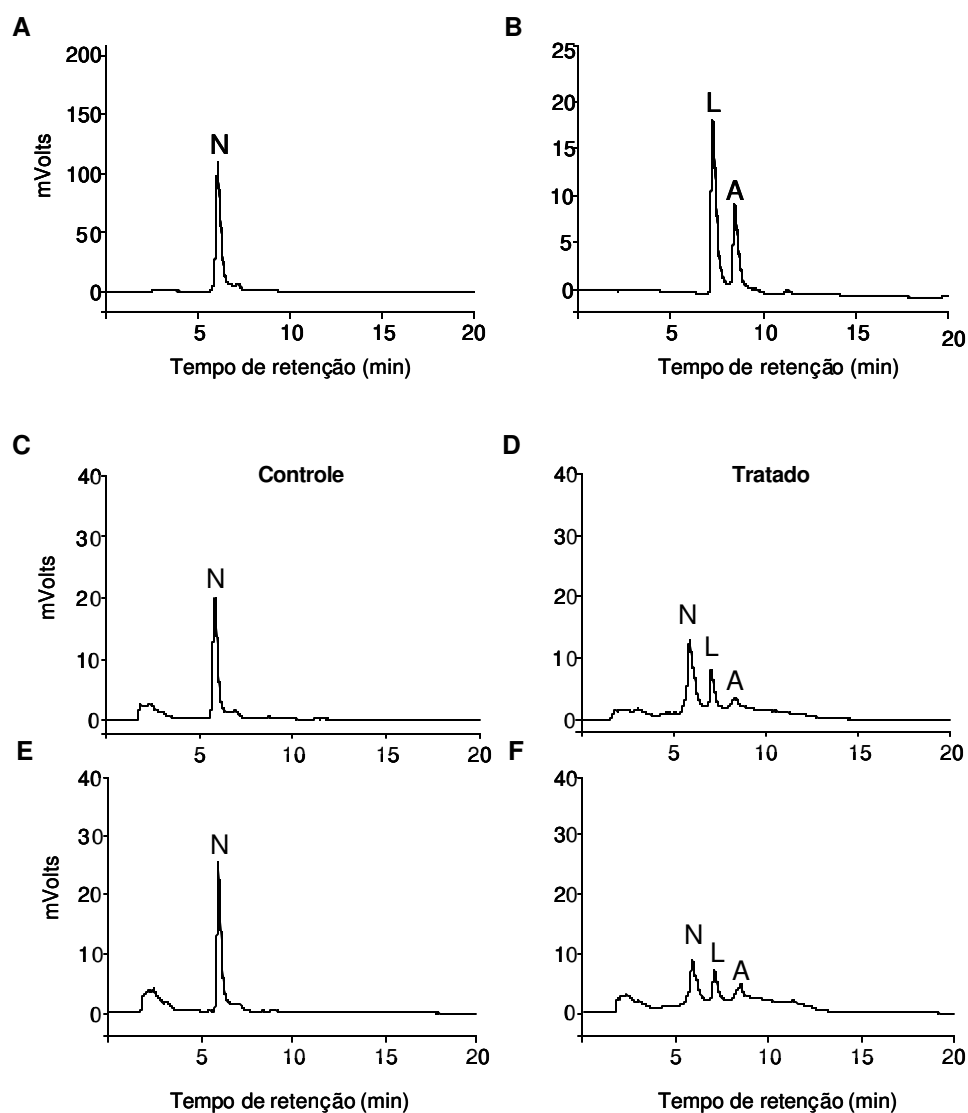


Figura 20. Perfil cromatográfico dos padrões de naringenina (A) luteolina e apigenina (B) e do consumo de naringenina pela F-3H nos extratos de cotilédones induzidos por SNP no período de 20 horas de incubação em atmosfera ambiente ($\sim 380 \mu\text{mol mol}^{-1}$) (C e D) e enriquecida em CO₂ (E e F). N, naringenina; L, luteolina; A, apigenina.

5 DISCUSSÃO

5.1. CO₂ e parâmetros fisiológicos

Para que a soja apresente crescimento homogêneo e boa resposta à indução de fitoalexinas por eliciadores, a temperatura deve ser superior a 25 °C durante os 9 dias de manutenção dos vasos dentro das câmaras, uma vez que a soja apresenta melhor desenvolvimento e produtividade de grãos no verão (Marchiori *et al.*, 1999; Braga *et al.*, 2006). As altas temperaturas do verão de 2006 favoreceram os bons resultados obtidos para emergência de plântulas e crescimento (Tabela 2 e Figura 7), sendo a atmosfera enriquecida em dióxido de carbono um fator estimulante do desenvolvimento das plântulas de soja. Braga *et al.*, (2006), estudando a mesma cultivar (IAC-18), obteve o mesmo perfil de plantas emergidas e o mesmo valor (97%) sob altas concentrações de dióxido de carbono, indicando que este gás atua significativamente já no início do processo germinativo.

Os valores de incremento obtidos para área foliar e cotiledonar (28%) das plântulas de soja com 9 dias de idade (Tabela 2) apresentaram-se acima da média de acordo com dados de Ainsworth *et al.* (2002). Estes autores, através de meta-análise, constataram que a área foliar total de soja em ambiente enriquecido em gás carbônico é maior nas fases de floração e de enchimento de grãos com incremento de 25% e 18% respectivamente, quando comparadas com a soja cultivada em atmosfera ambiente; as áreas das plantas em estágio vegetativo apresentaram apenas 10% de incremento. Essas diferenças podem estar relacionadas à cultivar de soja utilizada e às suas condições de cultivo, especialmente à temperatura. Embora somente os valores do peso de matéria fresca de folhas, cotilédones e de epicótilos tenham apresentado diferenças significativas entre as plantas cultivadas em atmosfera ambiente e enriquecida em CO₂ (Tabela 2), pode-se

constatar uma tendência positiva quanto ao incremento em biomassa, uma vez que as plântulas foram cultivadas por apenas nove dias.

Diversos trabalhos apontam incremento na biomassa de plantas crescidas sob atmosfera enriquecida em CO₂. Castells *et al.* (2002) descrevem que duas espécies de gramíneas perenes do Mediterrâneo tiveram sua biomassa aumentada em até 86,9% quando crescidas em atmosfera enriquecida de CO₂. Deepak & Agrawal (2001) concluíram que o aumento do crescimento e de biomassa nas plantas de soja sob alta [CO₂] é resultado de uma quantia extra de assimilados particionados entre as diferentes estruturas das plantas, em consequência de uma maior taxa fotossintética. Muitos trabalhos relatam grande incremento em biomassa, porém há muitas contradições na literatura em relação a biomassa de soja e produção de sementes em resposta ao aumento da concentração de CO₂ atmosférico. Tem sido sugerido que essas variações podem depender do genótipo, da espécie e como ela aloca seu carbono; diferentes cultivares utilizam diferentes estratégias (Ainsworth *et al.*, 2002; Ziska & Bunce, 2000).

As plantas C₃, como a soja, apresentam correlação positiva entre aumento da concentração de CO₂ atmosférico, temperatura e incremento em biomassa com a fotossíntese. O aumento de CO₂ atmosférico estimula a fotossíntese nas plantas C₃ uma vez que este gás, na concentração que se encontra hoje na atmosfera (~380 µmol mol⁻¹), não é suficiente para saturar a Rubisco, enzima que capta a molécula de CO₂ do ar e leva à formação de esqueletos de carbono (açúcares), forma pela qual a energia é estocada nas células (Rogers *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). Além disso, em atmosfera rica em CO₂ há uma inibição da atividade da oxigenase da Rubisco, reduzindo a fotorrespiração nas plantas (Teramura *et al.*, 1990).

As plântulas de soja cultivadas sob atmosfera enriquecida em CO₂ apresentaram incremento de 97,7% na fotossíntese em relação às cultivadas em atmosfera ambiente (Figura 8

A), valores muito mais altos do que os obtidos por Ainsworth *et al.* (2007). Estes autores estudaram folhas expandidas de soja em estágio vegetativo do desenvolvimento e constataram um incremento de apenas 24% na fotossíntese das folhas crescidas em atmosfera enriquecida em CO₂, embora a concentração deste gás utilizada pelos autores tenha sido de 550 µmol mol⁻¹ em sistema FACE (free-air CO₂ enrichment), indicando que provavelmente essa diferença está relacionada ao tipo de fumigação de CO₂ e à sua concentração.

A menor perda de água por transpiração (Figura 8 B) das plantas crescidas em atmosfera enriquecida em CO₂ parece estar relacionada a um fenômeno conhecido e relatado por Rogers *et al.* (1984) da diminuição da condutância estomática (Figura 8 C). Este fenômeno também foi constatado por Ainsworth *et al.* (2007) em folhas de soja, acarretando em maior eficiência do uso da água pelas plântulas cultivadas em atmosfera enriquecida em CO₂ (Figura 8 D).

Os dados relativos à eficiência do fotossistema II (dados não mostrados) não apresentaram diferenças significativas entre as plantas cultivadas sob atmosfera ambiente e enriquecida em CO₂ e podem indicar que o aumento do dióxido de carbono na atmosfera não atuou como agente estressante, uma vez que a eficiência do fotossistema II é utilizada como parâmetro indicador de estresse ambiental (Costa, 2004).

A atmosfera enriquecida em CO₂ estimulou o maior acúmulo de amido nos cotilédones e de celulose nas folhas de soja (Figura 9 A e B). O incremento de 22,5 % de celulose nas folhas provavelmente está relacionado às maiores taxas fotossintéticas obtidas nestes tecidos das plantas crescidas em atmosfera enriquecida (Figura 8 A). É possível sugerir que, pelo incremento da fotossíntese, houve diminuição do efeito dreno das outras partes da planta em relação aos cotilédones, com conseqüente acúmulo de amido nestes órgãos.

Os dados de açúcares obtidos por HPLC (Figura 10) estão de acordo com os obtidos por

Ainsworth *et al.* (2007), que não constatarem diferenças significativas nas proporções de sacarose e hexoses, embora tenha havido um pequeno aumento nos níveis destes açúcares, no tratamento contendo alta [CO₂], em folhas expandidas de soja. O pequeno incremento em carboidratos das plântulas de soja com nove dias de idade cultivadas sob atmosfera enriquecida em CO₂ está localizado nos cotilédones, constatado pelo aumento da sacarose (Figura 10 B) e dos CTNs (Figura 9 D), indicando uma possível redução do efeito dreno pelas outras partes da planta em relação aos cotilédones, conforme já mencionado.

As plantas possuem um mecanismo chamado de “sugar-sensing” pelo qual podem reconhecer e controlar as concentrações internas de carbono e nitrogênio, por exemplo, através da diminuição da fotossíntese, quando esqueletos de carbono encontram-se em abundância nas células ou aumentando a captação de nitrogênio quando este está escasso nos tecidos. Este mecanismo permite às plantas utilizarem eficientemente a energia necessária para controlar o transporte e o metabolismo de C e N entre os diferentes tecidos que atuam como fonte ou dreno (Coruzzi & Zhou, 2001). A soja, aos nove dias de idade, não apresentou diferenças na relação carbono:nitrogênio nas folhas das plantas cultivadas em ~380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e ~760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, já os cotilédones das plântulas crescidas em atmosfera enriquecida em CO₂ apontam uma tendência no aumento da razão C/N (Tabela 3), indicando que, nestas condições, há um aumento do estoque de carbono nos cotilédones, corroborando com sua função de órgão fonte. Curtis *et al.* (1990) estudaram a dinâmica de carbono e nitrogênio em plantas adultas C₃ e C₄ cultivadas sob elevado CO₂ e constatarem incremento de 20-40% na razão C/N nas folhas de *Scirpus olneyi* (C₃) ao longo do crescimento da planta sob atmosfera enriquecida em CO₂.

Os valores muito menores de atividade nitrato redutase nos cotilédones em relação às folhas (Figura 11) já eram esperados, uma vez que estes órgãos servem como fonte de reservas

para o desenvolvimento inicial da plântula, sendo descartados com cerca de 15 dias após a germinação das sementes, e aos 9 dias de idade ainda não foi possível constatar influência da atmosfera enriquecida em CO₂ na atividade desta enzima.

5.2. Efeito do CO₂ e do óxido nítrico na ativação do metabolismo de defesa em soja

O Dpm, molécula que tem sido descrita como forte indutora de respostas de defesa em soja (Modolo *et al.* 2002), não induziu significativamente a produção de nenhum dos metabólitos analisados. Esse aparente conflito com os resultados obtidos no presente trabalho, poderia ser explicado pelo fato de que o composto ativo do material utilizado estivesse degradado. Assim, os dados referentes a este eliciador devem ser considerados com reservas e novas análises com compostos de diferentes origens e tempos de estocagem merecem ser realizados.

A hipótese do balanço de carbono-nutriente de Bryant *et al.* (1983) propõe que a expressão fenotípica dos metabólitos secundários é determinada primariamente pela disponibilidade de carbono e nutrientes e é inversamente proporcional às concentrações de nitrogênio nos tecidos, embora haja uma grande variação na produção e nos compostos produzidos nos diferentes estudos (Lindroth *et al.*, 1995; Peñuelas *et al.*, 1997). Nas plântulas de soja com nove dias de idade foi possível perceber uma tendência nessa relação inversa, pois, embora os valores da porcentagem de nitrogênio dos cotilédones tenham diminuído apenas 0,28% (Tabela 3), os fenóis totais aumentaram nos cotilédones e diminuíram nas folhas das plântulas cultivadas em atmosfera enriquecida em CO₂ (Figura 12). Ainda, a qualidade dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas de soja mostrou diferenças entre os tratamentos, entre os tipos de eliciadores utilizados e entre os tempos de incubação (Figuras 13,

14, 15 e 16) fortalecendo a proposição de Braga *et al.* (2006), na qual este trabalho foi baseado, de que o CO₂ atmosférico não afeta igualmente os metabólitos secundários de defesa, e sim a resposta distinta e individual dos componentes.

O resultado diferencial na produção de metabólitos secundários de defesa induzidos pelo excesso de carbono e pelos diferentes eliciadores nas plântulas de soja confirmam, mais uma vez (Lindroth *et al.*, 1993; Chakraborty & Datta, 2003; Ghini, 2005), as previsões de que as mudanças climáticas globais causadas pelas atividades antrópicas podem alterar os padrões de distribuição geográfica de doenças de plantas, favorecendo uma espécie em detrimento de outras. Embora a soja apresente bom desenvolvimento sob atmosfera enriquecida em CO₂, não é possível afirmar que ela será uma das espécies favorecidas. Porém, os resultados obtidos com as plântulas indicam que há incremento de alguns metabólitos secundários de defesa, que conferem proteção à espécie e que são importantes para o estabelecimento da planta no ambiente.

Neste trabalho foi constatado que além da produção diferencial dos metabólitos secundários, em resposta a elevada disponibilidade de CO₂ e aos eliciadores, as enzimas analisadas (PAL, β -gluc e F-3H) também apresentaram variação de atividade. Pruski *et al.* (1996) em estudo da biossíntese de epicatequina em suspensões celulares de abacate cultivadas sob atmosfera enriquecida em CO₂, demonstraram que o aumento dos fenilpropanóides se deve ao incremento da atividade das enzimas que participam da biossíntese desses compostos e que foram influenciadas pelo ambiente, no caso, a atmosfera enriquecida em CO₂.

Na natureza não é fácil definir quais componentes são necessários e suficientes para conferir proteção a uma determinada espécie, devido às respostas de defesa serem invariavelmente dependentes de múltiplos componentes. Por exemplo, sabe-se que muitos isoflavonóides são produzidos sinergisticamente em resposta à herbivoria, porém são detectadas

taxas muito altas de cumarina e coumestrol em relação aos outros compostos produzidos. Estes metabólitos são tóxicos para os herbívoros e estão relacionados com efeitos estrogênicos e anti-coagulantes nos tecidos de leguminosas (Dixon & Paiva, 1995).

No presente trabalho, o β -glucano de *P. megasperma* (β -GLU) não foi eficaz na indução de gliceolinas em atmosfera ambiente (Figura 13 E e F), porém quando a soja foi cultivada sob excesso de carbono ($\sim 760 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2) houve grande incremento na produção desses metabólitos (Figura 21), principalmente com 12 horas de incubação, bem como incremento nas concentrações de daidzina (daidzeína glicosilada) e daidzeína (Figura 13 A e C; Figura 21). A daidzina é convertida em daidzeína e esta é a precursora das gliceolinas (Figura 2) de modo que é possível sugerir que o excesso de carbono disponível para a planta quando cultivada em atmosfera enriquecida em CO_2 parece ativar a rota que leva à produção de gliceolinas, já com 12 horas de incubação quando o β -GLU é o eliciador (Figura 21).

O β -GLU, conhecido como o eliciador mais ativo já descrito (Hahn, 1996), é capaz de induzir a síntese de uma grande variedade de fenilpropanóides em soja, incluindo aqueles produzidos após a hidrólise de conjugados de isoflavonas e as gliceolinas (Graham, 1995). Os dados obtidos com as plântulas de soja neste trabalho corroboram com os resultados de Braga *et al.* (2006), que, estudando a mesma cultivar dessa planta (IAC-18) em atmosfera enriquecida em CO_2 , constataram um grande incremento na produção de gliceolinas após 20h de eliciação com β -GLU, entretanto, pode-se observar que o melhor tempo de incubação para a produção de gliceolinas induzidas por β -GLU sob atmosfera enriquecida em dióxido de carbono é de 12 horas (Figura 13 E).

A produção de daidzeína (Figura 13 C e D), metabólito que ainda não está em sua forma ativa de defesa na planta, em relação às gliceolinas, tem como melhor eliciador a molécula

liberadora de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP), no período de 20 horas de incubação, sendo a atmosfera enriquecida em dióxido de carbono agente maximizante do efeito desta eliciação (Figura 13 D, Figura 21). Modolo *et al.* (2002) já haviam constatado que o SNP pode elevar a concentração de daidzeína e também de genisteína, a níveis muito mais altos do que aqueles pré-existentes na soja cultivadas sob atmosfera ambiente.

O SNP também foi o melhor indutor na produção de coumestrol (Figura 14 B), genisteína (Figura 15 D), apigenina e luteolina (Figura 16 B e D) no período de 20 horas, indicando que 12 horas de incubação ainda não são suficientes para sua atividade máxima. Ainda, a produção destes metabólitos foi significativamente estimulada em atmosfera enriquecida de dióxido de carbono (Figura 21).

O perfil da produção de coumestrol observado pela indução por SNP e GSNO no período de 20 horas (Figura 14 B) é semelhante ao encontrado para estes mesmos tratamentos na produção de daidzeína (20 horas- Figura 13 D), embora o CO₂ não tenha influenciado o GSNO, portanto parece que uma parte da daidzeína produzida por 20 horas de incubação é direcionada para a produção de coumestrol (Figura 21).

Na indução por SNP, provavelmente também há um desvio na rota de produção de genisteína (Figura 15 D) para a produção da flavona apigenina (Figura 16 D, Figura 21), já que ambos apresentam o mesmo precursor, a naringenina (Figura 2), e os níveis desta flavona apresentaram-se elevados quando comparados à produção de outros metabólitos, resposta que foi significativamente favorecida com o enriquecimento de CO₂ atmosférico. Assim, os dados de produção de apigenina e luteolina indicam haver uma sinalização mediada por NO na resposta de defesa contra patógenos, que é influenciada pelo ambiente, no caso, a atmosfera enriquecida em dióxido de carbono, e que o SNP se confirma como um ótimo eliciador, como já constatado

anteriormente por Modolo *et al.* (2002).

Modolo *et al.* (2002), através de aplicação de inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS) em cotilédones de soja cultivados em atmosfera ambiente, constataram que a produção de fitoalexinas foi comprometida quando a indução foi feita por Dpm, porém não quando se tinha o SNP como eliciador. Através deste estudo os autores verificaram que a produção de fitoalexinas (incluindo a daidzeína e a genisteína) não é dependente da NOS, ou seja, não requer a formação de NO endógeno quando este radical é fornecido exogenamente pelo eliciador, no caso o SNP. Estes resultados levaram à proposição de que as plantas de soja apresentam uma resposta de defesa contra ao ataque de patógenos mediada por NO (Modolo *et al.*, 2002) e os presentes resultados sugerem que a atmosfera enriquecida em CO₂ pode influenciar, positiva ou negativamente, essa resposta.

Desta forma, a contribuição deste trabalho parece ir além do previsto inicialmente, uma vez que o NO fornecido aos tecidos cotiledonares das plântulas de soja, através dos eliciadores, pode simular o efeito do óxido nítrico atmosférico, gás que vem aumentado globalmente por consequência de atividades antrópicas (Beligni & Lamattina, 2001; Ghini, 2005).

O estado de redução pelo qual a molécula de NO é fornecida aos tecidos das plântulas de soja parece influenciar a intensidade da resposta de defesa. O GSNO, molécula doadora de NO (eletricamente estável) induz a produção de metabólitos secundários de defesa em níveis muito menores quando comparados aos produzidos pela indução por SNP, molécula doadora de NO⁺. Portanto, a utilização do nitroprussiato de sódio combinado com a atmosfera enriquecida em CO₂, pode simular uma situação atmosférica prevista para um futuro próximo, importante para se estudar os efeitos fisiológicos nos vegetais e também, por outro lado, pode ser uma ferramenta importante para a biotecnologia, no sentido de incrementar a produção de isoflavonóides de

interesse econômico. Os resultados de indução obtidos nos cotilédones de plântulas de soja podem ser extrapolados para as outras partes da planta, uma vez que os flavonóides estudados estão presentes nas sementes, raízes, hipocótilos e folhas (Dixon & Paiva, 1995), podendo assim potencializar sua produção. Desse modo, a observação já patenteada (Salgado & Modolo, 2003), de que o SNP pode ser utilizado para incrementar em soja a produção de metabólitos de interesse econômico, acrescenta-se a descoberta de que esse efeito do NO pode ser potencializado se a planta crescer em ambiente que leve a um incremento da fotossíntese, como é o caso da alta disponibilidade de carbono por aumento da concentração de CO₂ na atmosfera.

Outro grande foco de interesse biotecnológico é superexpressar enzimas da via de biossíntese de flavonóides para se obter quantidades maiores de metabólitos de interesse (Yu & McGonigle, 2005). A eliciação por β -GLU, no período de 12 horas de incubação, induziu a atividade da PAL, primeira enzima da via de biossíntese dos flavonóides, e a atmosfera enriquecida em CO₂ influenciou positivamente a resposta (Figura 17 A; Figura 21), corroborando com os dados de indução para este período, observados na Figura 13.

A atividade da F-3H no período de 20 horas de incubação foi influenciada pela atmosfera enriquecida em dióxido de carbono na eliciação por SNP, embora a maior atividade neste período tenha sido constatada na indução por β -GLU (Figura 19 B), portanto pode-se sugerir que a naringenina tenha sido substrato para a formação de metabólitos diferentes das flavonas apigenina e luteolina quando a indução foi feita por β -GLU.

A conversão das isoflavonas glicosiladas em seus produtos é feita pela β -glucosidase, enzima que tem alta afinidade por isoflavonas e que está amplamente distribuída em todos os tecidos da soja (Hsieh & Graham, 2001). Neste trabalho a enzima β -glucosidase apresentou alta atividade no período de 20 horas quando induzida por SNP (Figura 18 B) e sofreu influência da

atmosfera enriquecida em CO₂ (Figura 21), indicando sua ação na conversão de daidzina em daidzeína (Figura 13 A e C) e genistina em genisteína (Figura 15 A e C). Esta enzima também foi induzida por β -GLU no período de 12 horas, porém não houve influência da atmosfera enriquecida em dióxido de carbono em sua atividade (Figura 18 A), apesar de ter ocorrido essa influência na produção de daidzeína por este eliciador (Figura 13 C), pode-se inferir essa diferença devido às altas taxas de conversão de daidzina em daidzeína no período de 20 horas (por SNP) (Figura 13 B e D) em relação ao período de 12 horas (por β -GLU) (Figura 13 A e C).

Pelos resultados obtidos foi possível confirmar os dados anteriormente obtidos por Modolo *et al.* (2002) e Braga *et al.* (2006) que indicam a indução diferencial das rotas de biossíntese de flavonóides dependendo do agente eliciador utilizado. O óxido nítrico leva ao acúmulo de precursores como daidzeína e genisteína possivelmente pelo incremento na atividade da beta-glucosidase, enzima responsável para desglucosilação de daidzina e genistina constitutivamente encontrados em soja (Graham, 1995). O beta-glucano, por sua vez, parece estimular a conversão de daidzeína em gliceolinas, fitoalexinas diretamente relacionadas às respostas de resistência de soja a patógenos, conforme relatado por Braga *et al.* (2006). Esses achados indicam claramente mecanismos de sinalização celular diferencial, dependendo se um eliciador biótico ou abiótico é utilizado. Além disso, os dados obtidos sugerem que o excesso de carbono leva a um aumento no acúmulo de metabólitos de defesa, induzido por diferentes eliciadores (Figura 21).

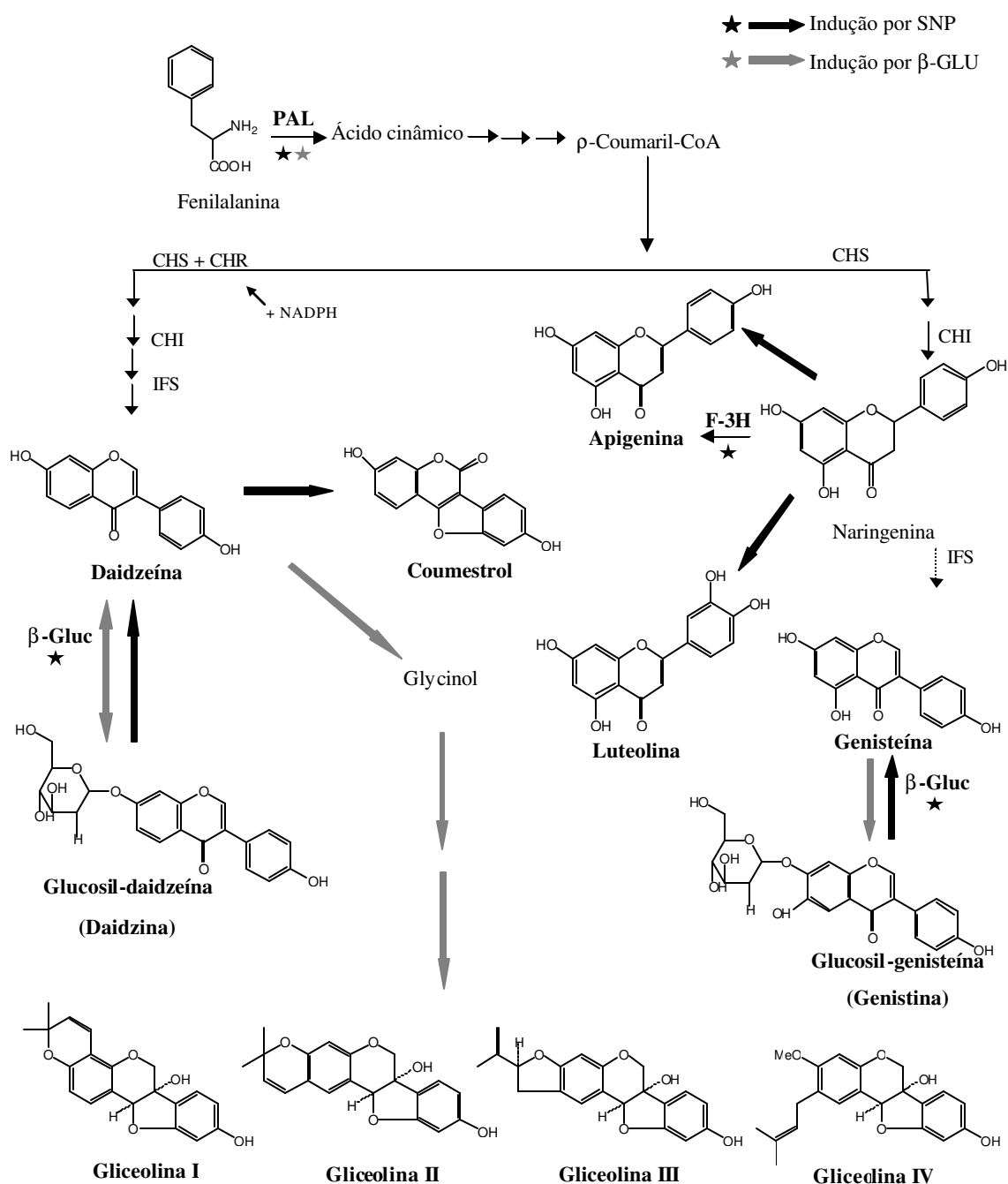


Figura 21. Influência da atmosfera enriquecida em CO₂ na biossíntese de isoflavonóides em soja. PAL, fenilalanina amônia liase; CHS, CHR, CHI, chalcona sintase, redutase e isomerase, respectivamente; IFS, isoflavona sintase; β-Gluc: β-glucosidase e F-3H, flavanona-3-hidroxilase. As setas e estrelas pretas indicam indução por SNP; em cinza, indução por β-GLU.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A soja é influenciada pela atmosfera enriquecida em CO₂ no início de seu desenvolvimento, apresentando maiores taxas de emergência, crescimento e fotossíntese;
- ✓ Sob altas concentrações de CO₂, os metabólitos secundários de defesa e as enzimas PAL, β-gluc e F-3H são ativados diferentemente quando comparados à atmosfera ambiente, sendo observada variações com o tempo de incubação e o eliciador utilizado;
- ✓ O beta glucano de *Phytophthora megasperma* em combinação com a atmosfera enriquecida em CO₂ é o melhor indutor das gliceolinas e das isoflavonas glicosiladas (daidzina e genistina) com 12 horas incubação.
- ✓ O melhor indutor da síntese de coumestrol, genisteína, luteolina e principalmente de daidzeína e apigenina é o SNP, molécula doadora de óxido nítrico, no período de 20 horas de incubação; a produção desses metabólitos é incrementada pelo ambiente enriquecido em CO₂;
- ✓ O efeito combinado de CO₂ e óxido nítrico pode servir de ferramenta importante para a biotecnologia no sentido de incrementar a síntese de isoflavonóides de importância econômica e de se compreender melhor a fisiologia dos vegetais frente a potenciais agentes patogênicos. Mais relevantemente, pode também ajudar a simular o efeito da atmosfera prevista para um futuro próximo e alertar para possíveis extensões destes efeitos no equilíbrio ecológico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, P.A., Graham, M.Y. & Graham, T.L. 2001. Effects of soybean genotype on the glyceollin elicitation competency of cotyledon tissues to *Phytophthora sojae* glucan elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **59**: 95-105.
- Adlercreutz, H. 1995. Phytoestrogens: epidemiology and possible role in cancer protection. **Environmental Health Perspectives** **103**:103-112.
- Aidar, M.P.M., Martinez, C.A., Costa, P.M.F., Dietrich, S.M.C. & Buckeridge, M.S. 2002. Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Biota Neotropica** **2**:
www.biotaneotropica.org.br/v2n1/pt/article+BNO010602012002.
- Ainsworth, E.A., Davey, P.A., Bernacchi, C.J., Dermody, O.C., Heaton, E.A., Moore, D.J., Morgan, P.B., Naidu, S.L., Yoo, H.S., Zhu X.G., Curtis, P.S., & Long, S.P. 2002. A meta-analysis of elevated [CO₂] effects on soybean (*Glycine max*) physiology and yield. **Global Change Biology** **8**: 695-709.
- Ainsworth, E. A., Rogers, A., Leakey, A.D.B., Heady, L.E., Gibon, Y., Stitt, M. & Schurr, U. 2007. Does elevated atmospheric [CO₂] alter diurnal C uptake and the balance of C and N metabolites in growing and fully expanded soybean leaves? **Journal of Experimental Botany** **58**: 579-591.
- Ardi, R., Kobiler, I., Jacoby, B., Keen, N.T. & Prusky, D. 1998. Involvement of epicathechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **53**: 269-285.
- Beligni, M.V. & Lamattina, L. 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. **Plant, Cell and Environment** **24**: 267-278.
- Beligni, M.V., Farth, A., Bethke, P.C., Lamattina, L. & Jones, R.L. 2002. Nitric oxide acts as an oxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiology** **129**: 1642-1650.

- Beno-Moualem, D., Vinokur, Y. & Prusky, D. 2001. Cytokinins increase epicatechin content and fungal decay resistance in avocado fruits. **Journal of Plant Growth Regulation** **20**: 95-100.
- Bethke, P.C., Badger, M.R. & Jones, R.L. 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. **The Plant Cell** **16**: 332-341.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** **72**: 248-254.
- Braga, M.R., Aidar, M.P.M., Marabesi M.A. & Godoy J.R.L. 2006. Effects of elevated CO₂ on the phytoalexin production of two soybean cultivars differing in the resistance to stem canker disease. **Environmental and Experimental Botany** **58**: 85-92.
- Braga, M.R., Pessoni, R.A.B. & Dietrich, S.M.C. 1998. Cell wall polysaccharide composition of leaves of tropical Rubiaceae differing in phytoalexin response. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **10 (02)**: 71-78.
- Brett, R.G. 2003. Climate change and plant pathosystems – future disease prevention starts here. **New Phytologist** **159**: 531-538.
- Bryant, J.P., Chapin, F.S. & Klein, D.R. 1983. Carbon/nutrient balance of boreau plants in relation to vertebrate herbivory. **Oikos** **40**: 357-368.
- Burdon, J.J. 1987. **Diseases and plant population biology**. Cambridge University Press: Cambridge.
- Castells, E., Roumet, C., Peñuelas, J. & Roy, J. 2002. Intraspecific variability of phenolic concentrations and the year responses to elevated CO₂ e to mediterranean perennial grasses. **Experimental and Environmental Botany** **47**: 205-216.
- Chakraborty, S. 2001. Effects of climate change. **Plant pathologist's pocketbook**. In: WALLER, J.M.L. & WALLER, S.J. (Eds.) Wallingford: CAB International: 203-207.
- Chakraborty, S. & Datta, S. 2003. How will plant pathogens adapt to host resistance at elevated CO₂ under a changing climate? **New Phytologist** **159**: 733-742.
- Cheong, J.J., Birbeg, W., Fügedi, P., Pilotti, A., Garegg, P.G. & Hong, N. 1991. Structure-activity relationships of oligo- β -glucoside elicitors of phytoalexin accumulation in soybean. **The Plant Cell** **3**: 127-136.

- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., Hancock, J.T. & Neill, S.J. 2000. NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. **Plant Journal** **24**: 667-677.
- Cornille, P., Battesti, C., Agnel, J. & Montillet, J. 1998. Evidence against a role of lipid peroxidation in the induction of glyceollin biosynthesis in *Glycine max*. **Plant Physiology and Biochemistry** **36**: 525-532.
- Coruzzi, G.M. & Zhou, L. 2001. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging “matrix effects”. **Current Opinion in Plant Biology** **4**: 247-253.
- Costa, P.M.F. 2004. **Efeitos da alta concentração de CO₂ sobre o crescimento e o estabelecimento de plântulas de jatobá de mata *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Heyne) Lee & Langenheim (Leguminosae, Caesalpinoideae, Detarieae)**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas-SP.
- Coward, L., Barnes, N., Setchell, K.D.R. & Barnes, S. 1993. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: anti-tumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural Food Chemistry** **41**:1961-1967.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., & Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). In: **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Buchanan, B.B., Grussem, W. & Jones, L.(Eds.) American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, p.1250-1318.
- Curtis, P.S., Balduman, L.M., Drake, B.G. & Whigham, D.F. 1990. Elevated atmospheric CO₂ effects on belowground processes in C₃ and C₄ estuarine marsh communities. **Ecology** **71** (5): 2001-2006.
- Davidson, E.A. & Kinglerlee, W. 1997. A global inventory of nitric oxide emissions from soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems** **48**: 37-50.
- Daxberger, A., Nema, A., Mithöfer, A., Fliegmann, J., Ligterink, W., Hirt, H. & Ebel, J. 2006. Activation of members of a MAPK module in β -glucan elicitor-mediated non-host resistance of soybean. **Planta** **6**: 1559-1571.
- Deepak, S.S. & Agrawal, M., 2001. Influence of elevated CO₂ on the sensitivity of two soybean cultivars to sulphur dioxide. **Environmental and Experimental Botany** **46**: 81-91.
- Delledonne, M. 2005. NO news is good news for plants. **Current Opinion in Plant Biology** **8**: 390-396.

- Delledonne, M., Xia, Y.J., Dixon, R.A. & Lamb, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature** **394**: 585-588.
- Dewick, P.M. 1993. Isoflavonoids. *In* “**The flavonoids: Advances in Research since 1986**” (J.B. Harborne, Ed), **Chapman & Hall, London**.
- Dixon, R.A. & Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant cell** **7**: 1085-1097.
- Dixon, R.A. & Ferreira, D. 2002. Genistein. **Phytochemistry** **60** (3): 205-211.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebels, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** **3**: 350-356.
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2007/marco/foldernoticia.2007-03-19.7513237988/noticia.2007-03-21.8401011048/mostra_noticia
Acesso em Abril de 2007.
- Estiarte, M., Peñuelas, J., Kimball, B.A., Hendrix, D.L., Pinter, P.J., Wall, G.W., LaMorte, R.L. & Hunsaker, D.J. 1999. Free-air CO₂ enrichment of wheat: leaf flavonoid concentration throughout the growth cycle. **Physiologia Plantarum** **105**: 423-433.
- Feig, G.T. & Meixner, F.X. 2007. Disturbance and vegetation properties affect soil biogenic nitric oxide emissions from an arid Kalahari Savanna. **Geophysical Research Abstracts** **9**: 06469.
- Floryszak-Wieczorek, J., Milczarek, G., Arasimowicz, M. & Ciszewski, A. 2006. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? **Planta** **224**: 1363-1372.
- Friebe, A., Malkewitz, J., Schultz, G. & Koesling, D. 1996. Positive effects of pollution? **Nature** **382**: 120.
- Ghini, R. 2005. **Mudanças climáticas globais e doenças de plantas**. Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna. 104p.
- Graham, T.L. 1995. Celular biochemistry of phenylpropanoids response of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. In Daniel, M., Purkayastha, R.P. (Eds.), **Handbook of phytoalexin metabolism and action**. Marcel Dekker: New York. Pp. 85-116.
- Hahn, M.G. 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology** **34**: 387-412.

- Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology** **37**: 285-306.
- Harborne, J.B. 1999. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. **Biochemical Systematics and Ecology** **27**: 335-367.
- Hartley, S.E., Jones, C.G. & Couper, G.C. 2000. Biosynthesis of plant phenolic compounds in elevated atmospheric CO₂. **Global Change Biology** **6**: 497-506.
- Hibberd, J.M., Whitbread, R., Farrar, J.F. 1996a. Effect of elevated concentrations of CO₂ on infection of barley by *Erysiphe graminis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **48**: 37-53.
- Hibberd, J.M., Whitbread, R., Farrar, J.F. 1996b. Effect of 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ and infection with powdery mildew on the growth and carbon partitioning of barley. **New Phytologist** **134**: 309-315.
- Hsieh, M.C. & Graham, T.L. 2001. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry** **58**: 995-1005.
- Hunter, M.D. 2001. Effects of elevated atmospheric carbon dioxide on insect-plant interactions. **Agricultural and Forest Entomology** **3**: 153-159.
- Ingham, J.L., Keen, N.T., Mulheirn, L.J. & Lyne, R.L. 1981. Inducibly formed isoflavonoids from leaves of soybean **Phytochemistry** **20**: 795-798.
- Instituto Agronômico de Campinas. 2000. Soja e Agronômico, história de sucesso! **O Agrônomo** **52**: 2-3, Campinas.
- IPCC. Intergovernmental Panel of Climate Change. 2002. Gitay, H., Suárez, A., Watson, R.T. & Dokken, D.J. (Eds.) **Climate change and biodiversity. IPCC technical paper V**. 86p.
- Keen, N.T. 1975. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens? **Science** **187**: 74-75.
- Keen N.T. 1978. Phytoalexins - efficient extraction from leaves by a facilitated diffusion technique. **Phytopathology** **68**: 1237-1239.

- Kim, S-H., Jung, W-S., Ahn, J-K, Kim, J-A. & Chung, III-M. 2005. Quantitative analysis of the isoflavone content and biological growth of soybean (*Glycine max* L.) at elevated temperature, CO₂ level and N application. **Journal of the Science of Food and Agriculture** **85**: 2557-2566.
- Kimati, H., Amorim, L., Bergami, A.F., Camargo, L.E.A. & Rezende, J.A.M. 1997 **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: **Agropecuária Ceres** **2**: 725p.
- Knorzer, O.C., Lederer, B., Durner, J. & Boger, P. 1999. Antioxidative defense activation in soybean cells. **Plant Physiology** **68**: 1237-1239.
- Koch, W., Wagner, C. & Seitz, H.U. 1998. Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. **Planta** **206**: 523-532.
- Koricheva, J., Larsson, S., Haukioja, E. & Keinänen, M. 1998. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. **Oikos** **83**: 212-226.
- Lindroth, R.L., Kinney, K.K. & Platz, C.L. 1993. Responses of deciduous trees to elevated atmospheric CO₂: productivity, phytochemistry, and insect performance. **Ecology** **74**: 763-777.
- Lindroth, R.L., Arteel, G.E. & Kinney, K.K. 1995. Responses of three saturniid species to paper birch grown under enriched CO₂ atmospheres. **Functional Ecology** **9**: 306-311.
- Lozovaya, V.V., Lygin, A.V., Li, S., Hartman, G.L. & Widholm, J.M. 2004. Biochemical response of soybean roots to *Fusarium solani* f. sp. *glycines* infection. **Crop Science** **44**: 819-826.
- Marchiori, L.F.S., Câmara, G.M.S, Peixoto, C.P. & Martins, M.C. 1999. Desempenho vegetativo de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] em épocas normal e safrinha. **Scientia Agricola** **56**: 383-390.
- Mathews, R.W. & Kerr, S.W. 1993 Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** **267**: 1529-1537.
- Matros, A., Amme, S., Kettig, B. *et al.* 2006. Growth at elevated CO₂ concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with *potato virus Y*. **Plant, Cell and Environment** **29**: 126-137.

- Mattson, W.J., Julkunen-Tiitto, R. & Herms, D.A. 2005. CO₂ enrichment and carbon partitioning to phenolics: do plant responses accord better with the protein competition or the growth differentiation balance models? **Oikos** **2**: 337-347.
- MerzDemlow, B.E., Duncan, A.M., Wangen, K.E., Xu, X., Carr, T.P., Phipps, W.R., & Kurzer, M.S. 2000. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition** **71**:1462-1469.
- Messina, M. J. 2003. Emerging evidence on the role of soy in reducing prostate cancer risk. **Nutrition Reviews** **61**: 117-131.
- Mcelrone, A.J., Reid, C.D., Hoyer, K.A., Hart, E. & Jackson, R.B. 2005. Elevated CO₂ reduces disease incidence and severity of a red maple fungal pathogen via changes in host physiology and leaf chemistry. **Global Change Biology** **11** (10): 1828-1836.
- Miller, M.R. & Megson, I.L. 2007. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**: 1-17.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., Magalhães, J.R. & Salgado, I. 2005. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. **FEBS Letters** **579**: 3814-3820.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., Pinto-Maglio, C.A.F., Oliveira, H.C., Seligman, K. & Salgado, I. 2006. Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. **Plant Science** **171**: 34-40.
- Modolo, L.V., Cunha, F.Q., Braga, M.R. & Salgado, I. 2002. Nitric oxide synthase mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. **Plant Physiology** **130**: 1288-1297.
- Mur, L.A.J., Carver, T.L.W. & Prats, E. 2006. NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany** **57**: 489-505.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A. & Hancock, J.T. 2002. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. **Plant Physiology** **128**: 13-16.
- Neill, S.J., Desikan, R. & Hancock, J.T. 2003. Nitric oxide signaling in plants. **New Phytologist** **159**: 11-35.

- NOAA- National Oceanic and Atmospheric Administration. Disponível em:
<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/aggi/>
 Acesso em Abril de 2007(a).
- NOAA- National Oceanic and Atmospheric Administration. Disponível em:
<http://www.cmdl.noaa.gov/ccgg/globalview/co2/index.html>
 Acesso em Abril de 2007(b).
- NOAA- National Oceanic and Atmospheric Administration. Disponível em:
<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>
 Acesso em Abril de 2007(c).
- Nowak, R.S., Ellsworth, D.S. & Smith, S.D. 2004. Functional responses of plant to elevated atmospheric CO₂- do photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions? **New Phytologist** **162**: 253-280.
- Owensby, C.E. 1994. Climate change and grasslands: ecosystem-level responses to elevated carbon dioxide. *Proceedings of XVII International Grassland Congress*. Palmerston North, New Zealand: **New Zealand Grassland Association**: 1119-1124.
- Park, D.S., Graham, M.Y. & Graham, T.L. 2001. Identification of soybean elicitation competency factor, CF-1, as the soybean Kunitz trypsin inhibitor. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **59**: 265-273.
- Paxton, J.D. 1991. Biosynthesis and accumulation of legume phytoalexins. *In* RP Sharma, DK Shalunke (Eds.). **Mycotoxins and Phytoalexins**. CRC Press, Boca Raton, FL: 485-499.
- Paxton, J.D. 1995. Soybean phytoalexin: elicitation, nature, mode of action and role. *In*: **Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action**. Marcel Dekker. p. 69-83.
- Pelicice F.M., Dietrich S.M.C., Braga M.R. 2000. Phytoalexin response of fifteen Brazilian soybean cultivars. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **12**: 45-53.
- Peñuelas, J., Estiarte, M. & LLusià, J. 1997. Carbon-based secondary compounds at elevated CO₂. **Photosynthetica** **33**: 313-316.
- Peñuelas, J. & Estiarte, M. 1998. Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem future? **Tree** **13**: 22-24.

- Perez, T. & Romero, J. 2007. Effect of conversion of natural grassland to cropland on nitric oxide emissions from Venezuelan Savanna soils. A four-year monitoring study. **Nutrient Cycling in Agrosystems** **77**: 101-113.
- Poorter, H., Van Berkel, Y., Baxter, R. *et al.* 1997. The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C₃ species. **Plant, Cell and Environment** **20**: 472-482.
- Priolli, R.H.G., Mendes-Junior, C.T., Sousa, S.M.B., Sousa, N.E.A. & Contel, E.P.B. 2004. Diversidade genética da soja entre períodos e entre programas de melhoramento no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **39**: 967-975.
- Prusky, D., Hamdan, H., Ardi, R. & Keen, N.T. 1996. Induction of biosynthesis of epicatechin in avocado suspension cells treated with an enriched CO₂ atmosphere. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **48**: 171-178.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. & Kaiser, W.M. 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Experimental Botany** **53**: 103-110.
- Rogers, H.H., Cure, J.D., Thomas, J.F. & Smith, J.M. 1984. Influence of elevated CO₂ on growth of soybean plant. **Crop Science** **24**: 361-366.
- Rogers, A., Allen, D.J. & Davey, P.A. *et al.* 2004. Leaf photosynthesis and carbohydrate dynamics of soybeans grown throughout their life-cycle under Free-Air Carbon dioxide Enrichment. **Plant, Cell and Environment** **27**: 449-458.
- Romero-Puertas, M.C., Perazzolli, M., Zago, E. & Delledonne, M. 2004. Nitric oxide signalling functions in plant pathogen interaction. **Cellular Microbiology** **6**: 795-803.
- Salgado, I. & Modolo, L.V. 2003. Método para aumentar a produção de daidzeína e genisteína em soja (**PI0304.014-3**) Patente Nacional.
- Salgado, I., Saviani, E.E., Modolo, L.V. & Braga, M.R. 2004. Nitric Oxide Signaling in Plant Defence Responses to Pathogen Attack. **In:** (A. Hemantaranjan, Ed.), **Advances in Plant Physiology**, Vol. 7, Scientific Publishers, Jodhpur, India. 121-141.
- Setchell, K.D.R., Brown, N.M. & Lydeking-Olsen, E. 2002. The clinical importance of the metabolite equol-A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. **Journal of Nutrition** **132**: 3577-3584.

- Shaner, G., Stromberg, E.L., Lacy, G.H., Barker, K.R. & Pirone, T.P. 1992. Nomenclature and concepts of aggressiveness and virulence. **Annual Review of Phytopathology** **30**: 47-66.
- Shibuya, N. & Minami, E. 2001. Oligosaccharide signaling for defence responses in plant. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **59**: 223-233.
- Smith, C.J. 1996. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. **New Phytologist** **132**: 1-45.
- Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry** **160**: 61-68.
- Stewart, G.R., Popp, M., Hol Zaptel, I., Stewart, J.I. & Dickieskew, A. 1986. Localization of nitrate reduction interns and its relationship to environmental and physiological characteristics. **New Phytologist** **104**: 373-384.
- Stewart, G.R., Schmidt, S., Handley, L.L., Turnbull, M.H., Erskine, P.D. & Joly, C.A. 1995. ¹⁵N natural abundance of vascular rainforest epiphytes: implications for nitrogen source and acquisition. **Plant Cell and Environment** **18**: 85-90.
- Stoëssl, A. 1986. Secondary plant metabolites in plant disease resistance. II. Phytoalexins. **Fitopatologia Brasileira** **11**: 25-53.
- Swain, T. & Hillis, W.E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal Science of Food and Agriculture** **10**: 63-68.
- Teramura, A.H., Sullivan, J.H. & Ziska, L.H. 1990. Interaction of elevated ultraviolet-B radiation and CO₂ on productivity and photosynthetic characteristics in wheat, rice and soybean. **Plant Physiology** **94**: 470-475.
- Tyler, J.M. 1996. Characterization of stem canker resistance in “Hutcheson” soybean. **Crop Science** **36 (3)**: 591-593.
- Vechiato, M.H., Maringoni, A.C. & Martins, E.M.F. 2006. Desenvolvimento de iniciadores para detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica** **32 (2)**: 161-169.
- Veteli, T.O., Kuokkanen, K., Julkunen-Tiitto, R., Roininen, H. & Tahvanainen, J. 2002. Effects of elevated CO₂ and temperature on plant growth and herbivory defensive chemistry. **Global Change Biology** **8**: 1240-1252.

- Vu, J.C.V., Gesch, R.W., Pennanen, A.H., Allen, L.H.J., Boote, K.J. & Bowes, G. 2001. Soybean photosynthesis, Rubisco, and carbohydrate enzymes function at supraoptimal temperatures in elevated CO₂. **Journal of Plant Physiology** **158**: 295-307.
- Wei, H.C., Saladi, R., Lu, Y.H., Wang, Y., Palep, S.R., Moore, J., Phelps, R., Shyong E., Lebwohl, M.G. 2003. Isoflavone genistein: Photoprotection and clinical implications in dermatology. **Journal of Nutrition** **133**: 3811S-3819S.
- Yamasaki, H., Shimoji, H., Ohshiro, Y. & Sakihama, Y. 2001. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. **Nitric Oxide** **5**: 261-270.
- Yu, O. & McGonigle, B. 2005. Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis. **Advances in Agronomy** **86**: 147-190.
- Zähringer, U., Schaller, E. & Grisebach, H. 1981. Induction of phytoalexin synthesis in soybean: structure and reactions of naturally occurring and enzymatically prepared prenylated pterocarpan from elicitor-treated cotyledons and cells cultures of soybean. **Zeitschrift Naturforschung** **36**: 234-241.
- Ziska, L.H. & Bunce, J.A. 2000. Sensitivity of field-grown soybean to future atmospheric CO₂: selection for improved productivity in the 21st century. **Australian Journal of Plant Physiology** **27**: 979-984.

ANEXO I

Elevated CO₂ atmosphere in combination with NO enhances production of defense-related flavonoids in soybean

*FERNANDA DOS SANTOS KRETZSCHMAR, *MARCOS PEREIRA MARINHO AIDAR,
‡IONE SALGADO and *MARCIA REGINA BRAGA

**Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, CP 3005, 01061-970, São Paulo, SP, Brazil, ‡Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil*

Date of receipt:

Keywords: air pollution, β -glucosidase, carbohydrates, chemical defenses, elicitor, flavones, 3-flavone hydroxylase, glyceollins, PAL, phytoalexins

Running title: Effect of elevated CO₂ and NO on soybean

Correspondence: Marcia Regina Braga, Av. Miguel Estéfano 3678, 04301-012, São Paulo, SP, Brazil, fax +55 11 5073 3678, e-mail:bragamr@canalvip.com.br or bragamr@ig.com.br

Abstract

Increased atmospheric pollutants have large impacts on vegetation, with detrimental or beneficial influence on plant growth and metabolism. In the present work we evaluated the combined effect of two air pollutants, elevated CO₂ atmosphere and nitric oxide (NO), on the production of soybean defensive secondary chemicals. Soybean plants (*Glycine max* [L.] Merr.) were kept under 380 and 760 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ of atmospheric CO₂ in open top chambers, from germination up to 9 days (cotyledon stage), when biochemical and physiological parameters were measured. Defense-related flavonoids were evaluated in detached cotyledon diffusates elicited with two different NO donors (sodium nitroprusside and *S*-nitrosoglutathione) and with β -glucan elicitor from mycelial walls of *Phytophthora sojae*. CO₂-enriched atmosphere stimulated initial growth, photosynthetic efficiency and altered C/N ratio in soybean plantlets resulting in allocation of precursors into different branches of the phenylpropanoid pathway in the cotyledons. Under elevated concentration of atmospheric CO₂, the biotic elicitor caused the accumulation of phytoalexins (glyceollins) as the natural end products of the phenylpropanoid pathway. Differently, elevated CO₂ combined with NO resulted in increase of intermediates and diverted end products (daidzein, coumestrol, genistein, luteolin and apigenin) with concomitant increment in the activity of enzymes related to their biosynthetic routes. These observations point out to changes in the pool of defense-related flavonoids in soybean due to increased carbon availability and indicate the pressure on the responsiveness of plants to pathogens in an ambient of elevated CO₂ combined with increased NO-derived species in the atmosphere.

Introduction

Anthropogenic activities are the major source of the increase in the atmospheric concentrations of gaseous, particulate and photochemical pollutants, which are known to contribute to the greenhouse effect. Increased atmospheric pollutants have large impacts on vegetation, with detrimental or beneficial influence on plant growth and metabolism, depending on the contaminant, its concentration, and interaction with other pollutants and environmental factors (Deepak & Agrawal, 2001; Vu *et al.*, 2001; Gregg *et al.*, 2003).

Elevated CO₂ atmospheric concentrations as those predicted for next decades alter plant growth, biomass allocation patterns, and accumulation of carbon-based secondary compounds (CBSC) (Koricheva *et al.*, 1998; Peñuelas *et al.*, 2002; Gregg *et al.*, 2003; Mattson *et al.*, 2005). CO₂-enriched atmospheres under non-limiting nutrient conditions have been shown to enhance plant growth and productivity in many species, including soybean, mainly through stimulation of the photosynthesis (Bowes, 1993; Ainsworth *et al.*, 2002; 2007). Changes in the chemical composition are also common to many plants grown under elevated CO₂ conditions (Julkunen-Tiitto *et al.*, 1993; Peñuelas & Estiarte, 1998; Kim *et al.*, 2005).

A number of source-sink hypotheses proposed in the last 20 years predict a larger accumulation of total non-structural carbohydrates (TNC) and CBSC in plant tissues when the provided carbon and nutrient amounts exceed growth requirements (e.g. Bryant *et al.*, 1983; Herms & Mattson, 1992; Peñuelas & Estiarte, 1998). Experimentally, studies with crop plants and trees have indicated that allocation to CBSC in response to increased CO₂ show enormous inter- and intraspecific variations (e.g. Lindroth *et al.*, 1993; Peñuelas & Estiarte, 1998) and dependence on the other environmental variables (Hartley *et al.*, 2000).

Allocation of carbon to secondary metabolites in plants is linked to primary metabolism by the rates at which substrates are diverted from primary pathways and funnelled into secondary biosynthetic routes. Therefore, several factors affecting growth, photosynthesis and other parts of primary metabolism such as increased CO₂ and other air pollutants will also affect the accumulation of CBSC (Lavola *et al.*, 2000). Such changes can significantly affect plant performance in altered atmospheres to herbivores and microbial pathogens (Lindroth *et al.*, 1993; McElrone *et al.*, 2005).

Studies have shown that phenylpropanoid metabolism can be stimulated by air pollutants (Booker & Miller, 1998; Kim *et al.*, 2005). Among distinct groups of CBSC, flavonoids have shown to be more sensitive to CO₂, increasing in some species in response to a metabolic excess of carbon (Lindroth *et al.*, 1993; Estiarte *et al.*, 1999). According to Koricheva *et al.* (1998), high responsiveness of phenylpropanoids to an increase in carbon supply could be due to the fact that these compounds and proteins share a common precursor, phenylalanine. Therefore, changes in growth and protein synthesis are expected to affect the availability of this amino acid for the phenylpropanoid biosynthetic pathway.

Isoflavonoids constitute a group of natural products derived from the phenylpropanoid pathway abundant in soybean. These compounds have diverse biological activities and play numerous roles in the interaction between the plant and the environment. The inducible accumulation of low molecular weight antimicrobial pterocarpan phytoalexins, the glyceollins, is one of the major defence mechanisms implicated in providing resistance to soybean. Rapid and large accumulation of glyceollins has been observed in incompatible interactions between soybean and *Phytophthora sojae* (Abbasi & Graham, 2001). Expression and activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), the first enzyme of the phenylpropanoid pathway, have also

shown to increase in response to pathogen attack (Delledonne *et al.*, 1998). The isoflavone daidzein is the first committed metabolite in the biosynthetic pathway to the phytoalexin glyceollin. Genistein is also an antifungal isoflavone involved in the pathway leading to the phytoalexin response of soybean cells. Both daidzein and genistein are present as large pools of pre-formed conjugates in soybean tissues (e.g. daidizin and genistin), being released by hydrolysis by β -glucosidases in response to incompatible interaction with pathogens or treatment with fungal or plant elicitors (Graham *et al.*, 1990; Hsieh & Graham, 2001). Apigenin and luteolin are flavones also found in soybean tissues (Modolo *et al.*, 2002) but their role in plant defense against pathogen remains to be established.

Remarkable differences in the phytoalexin production in soybean were observed, between susceptible and resistant cultivars, in response to a biotic elicitor when the plants were previously exposed to a CO₂-enriched atmosphere. High levels of CO₂ caused significant improvement of glyceollin production only in the soybean resistant cultivar (IAC-18). This increase was not followed by an increment of daidzein, meaning that increased carbon supply seem to affect more specifically the biosynthetic steps leading to conversion of this precursor into glyceollins rather than equally stimulate the whole phenylpropanoid pathway (Braga *et al.*, 2006).

Recently, convincing evidences of the involvement of nitric oxide (NO) in the induction of phytoalexins in soybean were also obtained. We have demonstrated that NO is implicated in the activation of phenylpropanoid biosynthesis as part of the defense mechanism of soybean plants against attack by the fungus *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Dpm), the causal agent of stem canker disease (Modolo *et al.*, 2002).

The gas NO is a common air pollutant generated by traffic and industrial combustion and can exert a number of diverse effects in plant metabolism, being toxic or beneficial depending on its concentration. Substantial amounts of NO can also be emitted by plants into the atmosphere, as a result of different mechanisms of endogenous biosynthesis, related to nitrate assimilation and reduction of nitrite (Betke *et al.*, 2004; Salgado *et al.*, 2006).

Produced endogenously or reaching from the atmosphere, there is compelling evidence that plant metabolism is highly influenced by NO. As a developmental regulator it promotes root growth and seed germination, controls stomata movement and delay flowering and senescence (Lamattina *et al.*, 2003; del Río *et al.*, 2004; Crawford, 2006). As a modulator of disease resistance NO induces localized cell death in host tissue, and the expression of several defence genes, resulting in the activation of biosynthetic pathways leading to accumulation of antimicrobial compounds, such as phenylpropanoids in soybean, preventing pathogen spread (Delledonne *et al.*, 1998; Modolo *et al.*, 2002; 2006).

Anthropogenic activities is bringing up pollutant concentration in the troposphere, generating a natural pressure on plant processes controlled or dependent of CO₂ and NO that may cause unexpected site-effects. Recently, Gregg *et al.* (2003) observed an increase in plant growth in New York's Central park and a reduced growth in the neighbouring country areas. These differences were attributed to NO-derived species (NO_x) scavenging reactions, which resulted in lower cumulative urban O₃ exposures compared to country sites. In some plants, including wheat and soybean, some reports reveal that CO₂ enrichment mitigates the toxic effects of various air pollutants, including SO₂ (Deepak & Agrawal, 2001) and O₃ (McKee *et al.*, 1997).

In the present work we studied the responsiveness of soybean grown under increased CO₂ concentration to the induction of defensive responses when activated by exogenous NO. A very

active fungal elicitor was used for comparison. Besides physiological parameters, we assessed the flavonoid metabolism in soybean related to its defensive response examining changes in the production of phytoalexins and some of their precursors, and in the activity of three enzymes related to their biosynthetic pathways.

Materials and methods

Species

Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) seeds of the cultivar IAC-18, resistant to the fungus *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. f. sp. *meridionalis* Morgan-Jones (Dpm) were provided by Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. Seeds were sown in a bed of soil and vermiculite (1 layer of vermiculite at the bottom, 1 of soil on top of which the seeds were placed, and 1 layer of vermiculite on top) into large pots (6L) and watered daily with tap water. Water tension in the soil was monitored using a tensiometer and kept above - 10 KPa, as recommended for soybean (Doorenbos & Pruitt, 1984). Leaves and/or cotyledons of 9-day-old plantlets, corresponding to the VC stage (cotyledon stage, Fehr *et al.*, 1971), were used for all determinations described below.

Open-top chamber experiments

Seven pots containing 50 seeds each were held in open top chambers - OTCs (1.53 m³ each) located inside the glasshouse at Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, São Paulo - SP, Brazil. Details of chambers construction and CO₂ injection and monitoring were already described by Braga *et al.* (2006). Two OTCs were kept with 760 ± 11 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ of atmospheric CO₂ and other two in normal CO₂ atmospheric concentration (380 ± 9 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Six independent experiments were conducted during summer of 2005-2007 (December – February) with natural photoperiod (13.5 h) and photosynthetic flux density at the pot surface of 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Air temperature in the chambers varied from 32 to 18 °C (day/night) and relative humidity from 51 to 69%.

Gas exchange measurements

Net carbon assimilation rate (A), stomatal conductance (g_s) and transpiration rate (E) under saturating photosynthetic photon flux ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were measured using a portable, open-system infrared gas analyzer (LI-6400, Li-Cor, USA). Measurements were made between 08:00 – 11:00 h in ten attached leaves for each treatment (ambient and elevated CO_2 concentrations) before sampling for elicitation assay. Five measurements were performed in each of the ten selected leaves per treatment. Instantaneous water use efficiency (WUE) was calculated as the ratio of A to E (A/E).

Chlorophyll a fluorescence measurements

Chlorophyll a fluorescence was measured in the morning (between 9:00 – 11:00 am) using a Modulated Chlorophyll Fluorometer (Opti-sciences, model OS5-FL). Ten leaves and cotyledons, dark-adapted for 30 min, were illuminated with a weak modulated measuring beam to obtain the initial fluorescence (F_0). A saturating white light pulse of $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was applied for 1 s to ensure maximum fluorescence emission (F_m). From this measurements the maximum photochemical efficiency of PSII ($F_v/F_m = F_m - F_0 / F_m$) was estimated.

Growth parameters

The percentage of seed germination and growth parameters were evaluated after nine days of sowing, each pot being considered as a replicate. The plantlets were evaluated for epicotyl and hypocotyl length. Leaf and cotyledon area was measured through a Portable Area meter (LI-3000A, Li-Cor, USA). Dry mass was obtained after oven drying plant material at 80°C . From these data, specific area ($\text{mm}^2 \text{g}^{-1}$ of dry mass) of leaf and cotyledons were also calculated.

Carbohydrate Analysis

Samples for carbohydrate analyses were taken just before the gas exchange measurements. Leaves and cotyledons were harvested and immediately immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C . Soluble carbohydrates were extracted as described by Rogers *et al.* (2004). Total and reducing sugar contents were evaluated by the phenol-sulphuric acid (Dubois *et al.*, 1956) and Somogyi-Nelson (Somogyi 1945) procedures, using glucose as standard. Glucose, fructose and sucrose in the extracts were determined by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detection (HPAEC/PAD) in a Dionex DX-300 using a Carbo-Pac PA1 column eluted with 0.9 mL min^{-1} of 16 mM NaOH.

Starch was extracted according to Vu *et al.* (2001) and quantified by the glucose oxidase-peroxidase (GOD-POD)/2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay (Bergmeyer, 1974), using glucose as standard. The total non-structural carbohydrate content (TNC) was considered as the sum of starch and soluble carbohydrate yields. Cellulose was quantified as described by Updegraff (1969).

Phenolic Content

Leaves and cotyledons were powdered in liquid nitrogen and 50 mg were extracted five times with boiling methanol:water (1:1 v/v) under reflux for 1 min. After filtration, the total phenolic content was estimated by the Folin-Dennis procedure (Swain & Hillis, 1959), using tannic acid Sigma (St. Louis, MO) as standard.

Nitrate Reductase Activity

A hundred mg of fresh leaves and cotyledons were blade-cut into pieces and analyzed for nitrate

reductase activity as described in Stewart *et al.* (1986). The measures of absorbance were performed at 540 nm. Enzyme activity is expressed in $\mu\text{mol NO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ g}^{-1}$ fresh weight.

Carbon and nitrogen contents

Leaves and cotyledons were oven-dried at 60 °C, ground to a fine powder and analyzed by elemental analyzer (Carlo Erba EA 1110 CHNS, CE Instruments, UK) and mass spectrometry (Delta Plus, ThermoQuest-Finnigan; Thermo Fisher Scientific, Inc. MA USA) by the Laboratório de Ecologia Isotópica, CENA/USP, São Paulo, Brazil.

Elicitation Assay

The production of phytoalexins was evaluated using the soybean cotyledon assay (Ayers *et al.*, 1976). Detached cotyledons were soaked in 10% commercial sodium hypochloride for 15 min and subsequently washed thoroughly with distilled water. A sterilized cork borer of 8 mm diameter was used to delimitate the area of the 1mm-deep well performed with a scalpel. The wounded surface (50.2 mm²) was treated with either 50 μl of water (control) or the biotic and abiotic elicitors. The β -glucan elicitor from mycelial walls of *Phytophthora sojae* (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was kindly provided by Dr M. G. Hahn (University of Georgia –USA). This elicitor was chosen since it is the most active elicitor described so far (Hahn, 1996). *S*-nitrosoglutathione (GSNO) was synthesized according to Matheus & Kerr (1993), few minutes before the cotyledon assay. GSNO and sodium nitroprusside (SNP, Sigma) were applied on the cotyledon wound area as 10 mM aqueous solutions (Modolo *et al.*, 2002).

Groups of eight cotyledons in triplicate were used per each treatment. The cotyledons

were kept in a Petri dish containing water-absorbed filter paper in the dark at 26 °C for 12 or 20 h. The cotyledons were washed with deionized water (1 mL per cotyledon) and isoflavonoid production was estimated in the diffusates by the HPLC analysis. Tissue samples of the cotyledons just under the wound inoculated area were removed with a scalpel and immersed immediately in liquid nitrogen and stored at -80 °C for enzyme assays.

Flavonoid Analysis

Diffusates from the soybean cotyledon assay (24 cotyledons) underwent liquid-liquid extraction with ethyl acetate (Keen, 1978). Organic fractions were evaporated to dryness, and the residues then dissolved in methanol and analyzed by HPLC in a Shimadzu chromatograph fitted with a UV-VIS detector. Samples were run on a 4.6 mm x 250 mm Shimadzu CLS ODS C18 column with a linear gradient from 20% to 60% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid (0.8 mL min⁻¹) and monitored at 286 nm (Pelicice *et al.*, 2000).

For apigenin and luteolin analysis samples were run in methanol in 10% formic acid (Modolo *et al.*, 2002). Elution was done at a flow rate of 1 mL min⁻¹ using a gradient that started with 50% methanol and increased to 60% at 10 min, followed by 100% methanol for 3 min and then by holding at 50% methanol for 4 min. The runs were monitored at 350 nm.

Peak area *versus* compound concentration was plotted for various concentrations of available authentic standards of daidzin (glucosyl-daidzein), daidzein, genistin (glucosyl-genistein), genistein, coumestrol, apigenin and luteolin (Sigma). Diffusates from the Williams 82 soybean cultivar from Illinois Foundation Seeds, Inc., USA (kindly supplied by Dr. M. G. Hahn, University of Georgia, USA) were used as the glyceollin standard.

PAL, β -Glucosidase and Flavanone-3- hydroxylase activities

The activity of PAL was assayed by the modified procedure of Prusky *et al.* (1996). Four hundred mg of cotyledon tissues were ground with 2 mL of 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0 containing 2% Triton X-100 and centrifuged at 10000 *g* for 10 min at 4°C, and the supernatant used to measure PAL activity. The reaction mixture consisted of 200 μ l of the extract and 1.2 mL of 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0, containing 6 mM de L-phenylalanine (Sigma). The incubation was performed at 37°C for 60 min and the reaction stopped by adding 100 μ L of 500 mM HCl. PAL was assayed by measuring the amount of trans-cinnamic acid formed at 290 nm and the specific enzyme activity expressed in μ mol cinnamic acid min⁻¹ mg⁻¹ protein.

β -Glucosidase activity was determined as described by Hsieh & Graham (2001). A hundred μ L of the extract were incubated with 500 μ L of 50 mM p-nitrophenyl- β -glucopyranoside (PNP, Sigma) in 100 mM citrate-phosphate buffer pH 6.0 for 15 min at 40 °C. The reaction was stopped by alkalization of the assay with 1 mL of 0.1 N sodium carbonate. The incubations were measured at 495 nm and the specific enzyme activity expressed as μ mol p-nitrophenol min⁻¹ mg⁻¹ protein.

Flavanone-3-hydroxylase (F-3H) extraction was performed according to the modified method of Beno-Moualem *et al.* (2001). F-3H activity was measured in a reaction mixture consisting of 100 μ L of the extract, 0.5 mL of 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.3 containing 30 mM naringenin (Sigma) and 3 mM NADPH (Sigma). The reaction was incubated for 90 min at 37°C and stopped by adding 50 μ L of 2 M HCl. The incubation mixtures were then extracted according to Keen (1978). The organic fraction was recovered, evaporated under N₂ flux, and the

dry extracts dissolved in 200 μL of methanol and analysed by HPLC as described above for apigenin and luteolin. F-3H specific activity was measured by the disappearance of naringenin in $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein.

All enzymatic determinations were performed in triplicates. For all enzyme assays, controls were performed using pre-boiled extracts (10 min, 100°C). Protein content in the extracts was quantified by the Bradford (1976) method with bovine serum albumin (BSA) (Sigma) as standard.

Statistical Analysis

All growth, photosynthetic and biochemical parameters were subjected to ANOVA and, when test F was significant, the means were compared using Student's t -test at 5% or 1% of probability.

Results

Although soybean was submitted to a short-term elevated CO₂ exposition, considerable alterations in physiological and biochemical parameters were observed (Tables 1-4). CO₂-enriched atmosphere was effective in stimulating germination (97%) and increased significantly leaf and cotyledon fresh weight (19 and 12%, respectively) and area (28%) (Tables 1, 4). As dry weight showed no difference between treatments, specific area (area/dry mass) was higher for both tissues under high CO₂ exposition. Soybean plants grown under elevated CO₂ were also higher, and the difference was established by the plantlet epicotyl length (12% longer).

The photosynthetic parameters indicate a general increment in A_{sat} for soybean leaves under CO₂-enriched atmosphere (Table 2), showing increment of 97% in leaf area basis. When based on leaf mass, assimilation increment was even higher (154%) (Table 4). Fluorescence of chlorophyll *a* showed non-significant differences between CO₂ treatments for leaves indicating no changes in the photochemical efficiency of the Photosystem II. Probably resulting from a high CO₂ availability to Rubisco, plants submitted to a higher atmospheric CO₂ concentration showed a decrease in both stomatal conductance (g_s) and transpiration (E) and, consequently, an increase in the water use efficiency (61.1%).

Elevated CO₂ concentration resulted in a significant increase in the levels of cotyledon total non-structural carbohydrate (Table 3). Starch was the principal carbohydrate stored, followed by total soluble sugars. As shown by Fig. 1, increased total soluble carbohydrates was due the accumulation of sucrose since no effect of elevated CO₂ was observed on the content of reducing sugars in the cotyledons (Table 3). There was also a significantly lower ratio of hexose-carbon to sucrose-carbon at elevated CO₂ concentration (~2.5) in cotyledons when compared to

ambient CO₂ atmosphere (~1.8) (Fig. 1). In leaves, significant effect of increased CO₂ concentration was only observed in the cellulose content (22.5%).

Cultivation of soybean plants at elevated CO₂ led to increased C/N ratios in cotyledons due to higher content of carbon and a decrease in the content of total nitrogen. Nitrate reductase activity was barely detected in cotyledons and did not change in leaves when soybean was cultivated under CO₂-enriched atmosphere (Table 3).

The average concentration of soluble total phenolics increased in the cotyledons (8%) and decreased in leaves (25%) of plantlets grown under elevated CO₂ (Tables 3, 4).

In the elicitation assays, the flavonoid contents measured in the controls (water instead of NO or β -glucan) revealed that elevated CO₂ atmosphere had effects only in the amount of the constitutive isoflavone daidzein and in the content of the flavone apigenin, which doubled their concentrations (data not shown). Data presented in their respective figures had these values discounted.

Significant effect of the NO donor SNP was observed only after 20 h of incubation through the enhancement of daidzein and coumestrol contents in response to doubled CO₂ atmosphere (Fig. 2 D, H). In contrast, in soybean cotyledons elicited with β -glucan a significant increase in daidzin, daidzein, and glyceollins was observed after 12 h of incubation. Glyceollins increased more than 10 times in response to doubled CO₂ and were the only metabolites still detected in high amounts after 20 h of elicitation (Fig. 2C, D). These results indicate an intense effect of elevated CO₂ on the conversion of daidzin into daidzein and then glyceollins, what resulted in no accumulation of the intermediate metabolite daidzein and the phytoalexin coumestrol, in β -glucan-elicited soybean cotyledons. Differently, the enriched CO₂ atmosphere

stimulated a delayed response to SNP leading to a significant accumulation of daidzein and coumestrol, suggesting that the synthesis of the final metabolites, glyceollins, was inhibited. The NO donor, GSNO, was not effective as β -glucan and SNP in activating the phenylpropanoid pathway. Cotyledons treated with GSNO accumulated reduced amounts of glyceollins and coumestrol after 12 and 20 h of incubation, respectively, in elevated CO₂ atmosphere (Fig. 2 E, H).

The glycosylated isoflavone genistin increased in response to fungal elicitor in the high CO₂ concentration after 12 h of incubation, but genistein only when cotyledons were treated with SNP for 20 h. Thus, as observed in Fig. 2, response to elevated CO₂ was faster in β -glucan- than in SNP-elicited cotyledons and conversion of genistin into genistein seems to be inhibited in the latter treatment. Under ambiente atmospheric CO₂ accumulation of genistein induced by GSNO or SNP were almost equivalent. However, the treatment with GSNO led to a reduction in the amounts of genistein produced by cotyledons maintained under elevated CO₂ atmosphere (Fig. 3 D), an opposite response when compared to that observed for SNP.

NO, supplied to the cotyledons as SNP, was the only inducer to promote significant accumulation of the flavones apigenin and luteolin and this response was very stimulated in doubled CO₂ atmosphere (Fig. 4). The amount of luteolin was twice and the apigenin four times higher in the elevated CO₂ than at ambient CO₂ atmosphere. Accordingly, prominent increase in 3-FH activity at elevated CO₂ condition was observed only in cotyledons treated with SNP for 20 h (Fig. 5 E). This enzyme is committed with the pathway leading to the accumulation of the flavones apigenin and luteolin.

PAL activity was stimulated after 12 h of treatment with SNP or β -glucan (Fig. 5A) in plants maintained under elevated CO₂, this effect being more acute after 20 h of treatment with the NO donor (Fig. 5B). These results are in accordance with the levels of the phenylpropanoid metabolites detected under enriched CO₂ atmosphere, where the higher amounts of daidzin (Fig. 2A), glyceollins (Fig. 2E) and genistin (Fig. 3A) were detected after 12 h of elicitation with β -glucan while in SNP-elicited tissues the amounts of daidzein (Fig. 2D), coumestrol (Fig. 2H), genistein (Fig. 3D), luteolin (Fig. 4B) and apigenin (Fig. 4D) were very increased only after 20 h of elicitation. PAL activity was slightly inhibited after 20 h treatment of the cotyledons with GSNO under enriched CO₂ atmosphere. Although this inhibitory effect was not statistically significant, it could at least partially account for the very low effectiveness of GSNO in inducing the phenylpropanoid metabolites (Figs. 2-4) under high CO₂ atmosphere.

Under enriched CO₂ atmosphere, β -glucosidases showed increased activity mainly after incubation with SNP (Fig. 5 C, D), corroborating the high accumulation of daidzein (Fig. 2D) and genistein (Fig. 3D) under this treatment. The fungal elicitor also evoked β -glucosidase activity under elevated CO₂ concentration but only after 20 h of incubation. This delayed activation of β -glucosidases did not result in an accumulation of the aglycone isoflavones probably because most of the flavonoid precursors were rapidly converted into glyceollins after 12 h of elicitation with β -glucan under enriched CO₂ atmosphere (Fig. 2E). GSNO significantly reduced the β -glucosidase activity in the doubled CO₂ atmosphere after 20 h of elicitation what may explain the decreased levels of genistein observed at this time (Fig. 3D).

Discussion

Research on the effects of elevated CO₂ on soybean is of particular relevance as this crop is one of the most important worldwide. There are a vast numbers of studies documenting soybean responses to elevated CO₂ (Ainsworth *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2004; Ainsworth *et al.*, 2007 and refs therein), but few studies have assessed how flavonoid metabolism related to defence will change under predicted future climate conditions (Kim *et al.*, 2005 and refs therein, Braga *et al.*, 2006). Moreover, the combined effect of raised CO₂ atmosphere and NO is only now being investigated.

NO has been claimed as bioactive molecule able to modulate several physiological processes in plants, being implicated in defensive response of plants to pathogens (Delledonne *et al.*, 1998; Modolo *et al.*, 2006; Salgado *et al.*, 2006). Its activity can result of variations in the endogenous levels or supply from exogenous sources as polluted atmosphere. Recently, it has been reported that NO from polluted areas can mitigate the inhibitory effect caused by ozone on plant growth (Gregg *et al.*, 2003), indicating that its interaction with other air pollutants affect plant performance.

Here we document the prominent increase of some induced-defensive flavonoids in soybean cotyledons by the combined effect of elevated CO₂ concentration and NO. A potent fungal elicitor, to which the effect on soybean grown in high CO₂ is already known, was used to simulate the challenge by a pathogen. Raised CO₂ seemed to provide excess of carbon under high nitrogen availability that was allocated to secondary metabolism. Responses of soybean plants to CO₂ in combination with NO and a fungal elicitor resembled those induced by pathogens that result in increased levels of phenylpropanoid metabolism. This increase was related to changes in the concentration of available substrates and precursors, and enhanced enzyme activity (Fig. Figs

2-5). How CO₂ in combination with NO and fungal elicitor interfered in phenylpropanoid metabolism is presented in Fig. 6.

Elevated CO₂ is widely reported to change photosynthetic efficiency, plant growth and biomass allocation and the balance of carbon and nitrogen in several species, including tobacco and soybean (Nielsen & Stitt, 2001; Ainsworth *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2006; Ainsworth *et al.*, 2007). In the present work, experiments conducted with soybean corroborated these previous findings showing that enriched-CO₂ atmosphere increases photosynthesis and growth, excepting that plantlets analyzed during very early developmental stage (9 days old) presented higher responses to elevated CO₂ than those already described (Table 2). These increased values may be explained by the high responsiveness of young expanding leaves to elevated CO₂ and the growth of soybean at 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ in OTCs in our study compared to 550 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ in FACE (free-air CO₂ enrichment) system in the experiments performed by Ainsworth *et al.* (2007). Moreover, differences in air temperature inside the chambers, which had higher day/night range during summer of 2005-2007 when compared to previous experiments carried out in 2003/2004 could also have contributed to divergent values from that reported by Braga *et al.* (2006).

The higher assimilation under CO₂ treatment lead to higher availability of carbon for sink tissues (like expanding leaves) resulting in lower sink strength for use of cotyledon reserves (Fig. 1, Table 3). This could explain the higher content of carbon (starch and TNC) in cotyledons under CO₂ treatment (Tables 3, 4). Total carbon content and reduced N for cotyledons support this hypothesis. Also, with more carbon available and lower sink strength for growth, carbon in the cotyledons can be partitioned to other metabolic pathways, as secondary compounds

(phenolics) for defense. These findings are in agreement with the Carbon Nutrient Balance hypothesis (Bryant *et al.*, 1983) that proposes that concentration of CBSC is positively correlated with the C/N ratio, a parameter indicative of the existence of excess carbon that can be invested in CBSC.

The decline in concentrations of low-molecular phenolic compounds in leaves in elevated CO₂ as we observed in the present work (Table 3) is well documented (e.g. Hartley *et al.*, 2000; Veteli *et al.*, 2002 and refs therein) and can be explained by a simple dilution effect since leaves of plants grown under elevated CO₂ contained more structural carbohydrates (cellulose) and higher total and specific area (Tables 1, 3). It appears that the extra resources gained by the plants grown in these circumstances were allocated mainly to foliar expansion and not to production of foliar phenolic compounds. In contrast, in soybean cotyledons increased carbon supply enhanced biosynthetic steps leading to accumulation of phenolics (Table 3).

The altered C/N ratio in soybean cotyledons allowed an increased allocation of precursors into different branches of the phenylpropanoid pathway when tissues were exposed to elicitors. The differential activation of flavonoid routes observed by a combined effect of elevated CO₂ with NO or a fungal elicitor (Fig. 6) confirms and extends our previous results. We found that although NO was effective in stimulating the initial steps of the phenylpropanoid pathway in soybean cotyledons under ambient CO₂ atmosphere, this radical seems not to be a signalling molecule implicated in the late conversion of daidzein into glyceollins (Modolo *et al.*, 2002). The β -glucan elicitor, in turn, led to a remarkable increment in the amounts of glyceollins in high levels of CO₂, but this increase was not followed by an increment in daidzein (Braga *et al.*, 2006).

In soybean, an early response to pathogens and their elicitors includes the rapid hydrolytic release of the isoflavones genistein and daidzein from pre-formed conjugates (genistin and daidzin) and the subsequent large accumulation of glyceollins (Graham *et al.*, 1990). Genistein, glyceollins, and coumestrol are key defence-related end products found in soybean elicited-cotyledons while daidzin and daidzein act as precursors (Fig. 6). As shown in Figs. 2 and 3, the NO donor SNP supplied to the cotyledons for 20 h was very effective in promoting the accumulation of the aglycones daidzein and genistein and the phytoalexin coumestrol, but not glyceollins. This effect was strongly enhanced by the CO₂-enriched atmosphere. The presence of the aglycones daidzein and genistein in soybean is related to the activity of vacuole- or cell-wall associated isoflavone specific β -glucosidases (Hsieh & Graham, 2001). Therefore, the increased amounts of daidzein and genistein induced by SNP seem to have resulted from the increase in the β -glucosidase activity stimulated by NO under high CO₂ concentration (Fig. 5) and could explain the absence or low amounts of the β -glucosides (daidzin and genistin) in the SNP-treated cotyledons (Fig. 2A, 3B).

Hsieh & Graham (2001) reported that aglycones released through β -glucosidase action can be used for further incorporation in other biosynthetic pathways, such as for the synthesis of the phytoalexins glyceollin or coumestrol. Although both phytoalexins are end products in their metabolic pathways, SNP seems to cause efficient isoflavone aglycone incorporation into the branch leading only to coumestrol production, this effect being enhanced by the higher carbon availability provided by the elevated CO₂ concentration (Fig. 2H). Additionally, under enriched CO₂ atmosphere SNP was the only inducer to divert the phenylpropanoid route for the synthesis of the flavones apigenin and luteolin (Fig. 4), by stimulating the F-3H activity (Fig. 5).

Effects of the elevated CO₂ on the phytoalexin biosynthesis were also observed when NO was supplied as GSNO. However, they were distinct and much lower than those caused by SNP and β -glucan. No induction of the precursors daidzin, daidzein, or genistin was observed by higher carbon availability (Fig. 2, 3), what was consistent with the lack of activation of PAL and β -glucosidase activities (Fig. 5). Actually, GSNO showed inhibitory effect on β -glucosidase activity in high CO₂ atmosphere after 20 h of incubation (Fig. 5D), what is in agreement with a significant reduction in genistein content detected after 20 h (Fig. 3D). Therefore, it seems that the weak effect of NO provided by GSNO on phytoalexin induction in soybean grown in high CO₂ is related to late steps in the biosynthetic pathway leading to phytoalexin production. This distinct effect between the two NO donors may be related to the fact that GSNO is thought to function as a mobile reservoir of NO in plants. GSNO can be formed through the *S*-nitrosylation reaction of NO with glutathione, an antioxidant molecule that is normally present in millimolar concentrations in plant cells. Thus, in a cellular reductive environment NO would be rapidly trapped as GSNO, not reaching toxic concentrations, but instead being released in amounts enough to participate in physiological processes that normally are activated at low levels of NO (Lamattina *et al.*, 2003; del Río *et al.*, 2004). Differently, NO released from SNP, depending on the redox state of the cell, can lead to the formation of other harmful N-oxides. In this way, SNP would more likely resemble NO-derived species (NO_x) that reach the plant cell from polluted atmosphere or is endogenously produced at high cellular levels with defensive purposes.

The above suggestion is reinforced by the differential PAL activation observed when NO was supplied as SNP or GSNO (Fig. 5). Increased PAL activity is a common response of soybean and many other species to abiotic and biotic stresses (Delledonne *et al.*, 1998). Here, PAL

activation was only observed when SNP and the β -glucan were used as elicitors (Fig. 5) despite of the cotyledons had increased carbon supply and less availability of nitrogen caused by CO₂-enriched atmosphere (Table 3), conditions expected to increase the responsiveness of phenylpropanoid biosynthetic pathway (Koricheva *et al.*, 1998).

The β -glucan elicitor also caused a significant increase in β -glucosidase activity and was very effective in stimulating the accumulation daidzin and genistin with 12 h of incubation under high CO₂ concentration (Fig. 2A), indicating that these isoflavone conjugates were newly formed in cotyledons. The daidzein-glucosyl conjugate was then diverted to the synthesis of the phytoalexins glyceollins, as previously reported by Braga *et al.* (2006), but not to coumestrol (Fig. 2 G, H).

In conclusion, the increase in the content of specific defense-related flavonoids in soybean cotyledons stimulated by NO or the fungal elicitor under CO₂ enrichment may be explained in terms of higher availability of carbon to be invested in CBSC as predicted for a number of source-sink hypotheses (Bryant *et al.*, 1983; Herms & Mattson, 1992; Peñuelas & Estiarte, 1998). However, the most important finding of this study is that high concentration of atmospheric CO₂ combined with NO generated some differences in the flavonoid composition induced in soybean cotyledons due to a shift in branches of the phenylpropanoid pathway (Fig. 6). Differently from the biotic elicitor, in which phytoalexins are accumulated as the natural end products of the phenylpropanoid pathway, NO caused accumulation of intermediates and diverted end products, under enriched CO₂ atmosphere. These observations point out to changes in the pool of defence-related flavonoids in soybean due to increased carbon availability and indicate the pressure on the

responsiveness of plants to pathogens in an ambient of elevated CO₂ combined with increased NO_x in the atmosphere.

Acknowledgements

We thank Dr Emerson A. Silva for help with measures of water tension and helpful comments on the manuscript. Thanks are due to FAPESP for grants (2005/04139-7 and 2005/54246-4) and the fellowship of F.S. Kretschmar, and CNPq for the grant (475192/04-4) and research fellowships of M.R. Braga and I. Salgado.

References

- Abbasi PA, Graham MY, Graham TL (2001) Effects of soybean genotype on the glyceollin elicitation competency of cotyledon tissues to *Phytophthora sojae* glucan elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **59**, 95-105.
- Ainsworth EA, Davey PA, Bernacchi CJ, Dermody OC, Heaton EA, Moore DJ, Morgan PB, Naidu SL, Yoo HS, Zhu XG, Curtis PS, Long SP (2002) A meta-analysis of elevated [CO₂] effects on soybean (*Glycine max*) physiology and yield. *Global Change Biology*, **8**, 695-709.
- Ainsworth EA, Rogers A, Leakey ADB, Heady LE, Gibon Y, Stitt M, Schurr U (2007) Does elevated atmospheric [CO₂] alter diurnal C uptake and the balance of C and N metabolites in growing and fully expanded soybean leaves?. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 579-591.
- Ayers AR, Ebel J, Finelli F, Berger N, Albersheim P (1976) Host-pathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of elicitor present in extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiology*, **57**, 751-759.
- Beno-Moualem D, Vinokur Y, Prusky D (2001) Cytokinins increase epicatechin content and fungal decay resistance in avocado fruits. *Journal of Plant Growth Regulation*, **20**, 95-100.
- Bergmeyer HU (1974) Methods of enzymatic analysis. Vol 3, New York, Academic Press, 1212-1215.
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell*, **16**, 332-341.
- Booker FL, Miller JE (1998) Phenylpropanoid metabolism and phenolic composition of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves following exposure to ozone. *Journal of Experimental Botany*, **49**, 1191-1202.
- Bowes G (1993) Facing the inevitable: plants and increasing atmospheric CO₂. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **44**, 309-332.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Braga MR, Aida MPM, Marabesi MA, Godoy JRL (2006) Effects of elevated CO₂ on the phytoalexin production of two soybean cultivars differing in the resistance to stem canker disease. *Environmental and Experimental Botany*, **58**, 85-92.
- Bryant JP, Chapin FS, Klein DR (1983) Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*, **40**, 357-368.
- Crawford NM (2006) Mechanisms of nitric oxide synthesis in plants. *Journal Experimental of Botany*, **57**, 471-478.
- Deepak SS, Agrawal M (2001) Influence of elevated CO₂ on the sensitivity of two soybean cultivars to sulphur dioxide. *Environmental and Experimental Botany*, **46**, 81-91.
- Delledonne M, Xia YJ, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, **394**, 585-588.
- del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry*, **65**, 783-792.
- Doorenbos J, Pruitt WO (1984) Las necesidades de agua en los cultivos. Estudio FAO Riego y Drenaje, 24, FAO, Rome.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **3**, 350-356.
- Estiarte M, Peñuelas J, Kimball BA, Hendrix DL, Pinter PJ, Wall GW, Lamorte RL, Hunsaker DJ (1999) Free-air CO₂ enrichment of wheat: leaf flavonoid concentration throughout the growth cycle. *Physiologia Plantarum*, **105**, 423-433.
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max.* (L). Merrill. *Crop Science*, **11**, 929-931.
- Graham TL, Kim JE, Graham MY (1990) Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **3**, 157-166.
- Gregg JW, Jones CG, Dawson TE (2003) Urbanization effects on tree growth in the vicinity of

- New York City. *Nature*, **424**, 183-187.
- Hahn MG (1996) Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology*, **34**, 387-412.
- Hartley SE, Jones CG, Couper GC (2000) Biosynthesis of plant phenolic compounds in elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biology*, **6**, 497-506.
- Hermes DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, **67**, 283-335.
- Hsieh M-C, Graham TL (2001) Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry*, **58**, 995-1005.
- Julkunen-Tiitto R, Tahvanainen J, Silvola J (1993) Increased CO₂ and nutrient status affect phytomass and the production of plant defensive secondary chemicals in *Salix myrsinifolia* (Salib.). *Oecologia*, **95**, 495-498.
- Keen NT (1978) Phytoalexins - efficient extraction from leaves by a facilitated diffusion technique. *Phytopathology*, **68**, 1237-1239.
- Kim S-H, Jung W-S, Ahn J-K, Kim J-A, Chung H-M (2005) Quantitative analysis of the isoflavone content and biological growth of soybean (*Glycine max* L.) at elevated temperature, CO₂ level and N application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, 2557-2566.
- Koricheva J, Larsson S, Haukioja E, Keinänen M (1998) Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos*, **83**, 212-226.
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology*, **54**, 109-136.
- Lavola A, Julkunen-Tiitto R, de la Rosa TM, Lehto T, Aphalo PJ (2000) Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. *Physiologia Plantarum*, **108**, 260-267.

- Lindroth RL, Kinney KK, Platz CL (1993) Responses of deciduous trees to elevated atmospheric carbon dioxide: productivity, phytochemistry and insect performance. *Ecology*, **74**, 763–777.
- Mathews, RW, Kerr SW (1993) Biological activity of *S*-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **267**, 1529-1537.
- Mattson WJ, Julkunen-Tiitto R, Herms DA (2005) CO₂ enrichment and carbon partitioning to phenolics: do plant responses accord better with the protein competition or the growth differentiation balance models? *Oikos*, **2**, 337-347.
- McElrone AJ, Reid CD, Hoyer KA, Hart E, Jackson RB (2005) Elevated CO₂ reduces disease incidence and severity of a red maple fungal pathogen via changes in host physiology and leaf chemistry. *Global Change Biology*, **11**, 1828-1836.
- McKee IF, Eiblmeier M, Polle A (1997) Enhanced ozone tolerance in wheat grown at an elevated CO₂ concentration. *New Phytologist*, **137**, 275-284.
- Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, Salgado I (2002) Nitric oxide synthase mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiology*, **130**, 1288-1297.
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IMG, Pinto-Maglio CAF, Oliveira HC, Seligman K, Salgado I (2006) Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Science*, **171**, 34-40.
- Nielsen TH, Stitt M (2001) Tobacco transformants with strongly decreased expression of pyrophosphate: fructose-6-phosphate expression in the base of their sink leaves contain much higher levels of fructose-2,6-bisphosphate but exhibit no major changes in fluxes. *Planta*, **214**, 106-116.
- Pelicice FM, Dietrich SMC, Braga MR (2000) Phytoalexin response of fifteen Brazilian soybean cultivars. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **12**, 45-53.
- Peñuelas J, Castells E, Joffre R, Tognetti R (2002) Carbon-based secondary and structural compounds in mediterranean shrubs growing near a natural CO₂ spring. *Global Change Biology*, **8**, 281-288.

- Peñuelas J, Estiarte M (1998) Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem future? *Tree*, **13**, 22-24.
- Prusky D, Hamdan H, Ardi R, Keen NT (1996) Induction of biosynthesis of epicatechin in avocado suspension cells treated with an enriched CO₂ atmosphere. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **48**, 171-178.
- Rogers A, Allen DJ, Davey PA *et al.* (2004) Leaf photosynthesis and carbohydrate dynamics of soybeans grown throughout their life-cycle under Free-Air Carbon dioxide Enrichment. *Plant, Cell and Environment*, **27**, 449-458.
- Salgado I, Modolo LV, Augusto O, Braga MR, Oliveira HC (2006) Mitochondrial nitric oxide synthesis during plant-pathogen interactions: role of nitrate reductase in providing substrates. In: *Nitric oxide in plant growth, development and stress physiology* (eds. Lamattina L, Polacco JC), pp. 239-254. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Somogyi M (1945) A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, **160**, 61-68.
- Stewart GR, Popp M, Hol Zapfel I, Stewart JI, Dickieskew A (1986) Localization of nitrate reduction interns and its relationship to environmental and physiological characteristics. *New Phytologist*, **104**, 373-384.
- Swain T, Hillis WE (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica*. *Journal Science of Food and Agriculture*, **10**, 63-68.
- Updegraff UM (1969) Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry*, **32**, 420-424.
- Veteli TO, Kuokkanen K, Julkunen-Tiitto R, Roininen H, Tahvanainen J (2002) Effects of elevated CO₂ and temperature on plant growth and herbivore defensive chemistry. *Global Change Biology*, **8**, 1240-1252.
- Vu JCV, Gesch RW, Pennanen AH, Allen LHJ, Boote KJ, Bowes G (2001) Soybean photosynthesis, Rubisco, and carbohydrate enzymes function at supraoptimal temperatures in elevated CO₂. *Journal of Plant Physiology*, **158**, 295-30

Table 1 Growth parameters (standard deviation in parenthesis) of soybean grown in ambient ($380 \pm 9 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and doubled CO_2 concentrations ($760 \pm 11 \mu\text{mol mol}^{-1}$); letters indicate significance for each parameter between the treatments ($P < 0.05$)

Variable	[CO ₂] (μmol mol ⁻¹)							
	380				760			
	Leaf	Cotyledon	Hipocotyl	Epicotyl	Leaf	Cotyledon	Hipocotyl	Epicotyl
Dry Weight (g) (N = 20)	0.03 (0.010) ^A	0.03 (0.004) ^A	0.03 (0.002) ^A	0.01 (0.002) ^A	0.03 (0.010) ^A	0.03 (0.004) ^A	0.03 (0.002) ^A	0.01 (0.002) ^A
Fresh Weight (g) (N = 15)	0.21 (0.04) ^A	0.33 (0.02) ^A	0.40 (0.05) ^A	0.14 (0.03) ^A	0.25 (0.04) ^B	0.37 (0.04) ^B	0.41 (0.08) ^A	0.18 (0.02) ^A
Area (mm ²) (N = 20)	716.4 (104.2) ^A	219.5 (20.90) ^A	-	-	917.4 (82.80) ^B	282.0 (14.77) ^B	-	-
Length (cm) (N = 16)	-	-	9.90 (1.31) ^A	5.94 (1.38) ^A	-	-	9.59 (1.69) ^A	6.67 (1.20) ^A
Specific leaf area (mm ² mg ⁻¹)	23,9	7,3	-	-	30,6	9,4	-	-
Germination (%) (N = 200)	89 ^A				97 ^B			
– not measured								

Table 2 Net carbon assimilation rate under saturating light conditions (A_{sat}), stomatal conductance (gs), transpiration rate (E) photochemical efficiency of PSII (Fv/Fm) and water use efficiency (WUE) of leaves of soybean grown under ambient ($380 \pm 9 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and doubled CO_2 concentrations ($760 \pm 11 \mu\text{mol mol}^{-1}$); standard deviation in parenthesis; letters indicate significance for each parameter between the treatments ($P < 0.05$)

Variable (N = 10)	[CO ₂] ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	
	380	760
A_{sat} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	9.78 (1.51) ^A	19.34 (2.10) ^B
Fv/Fm	0.82 (0.003) ^A	0.82 (0.003) ^A
A_{sat} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ kg}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	233.0	591.8
E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	3.41 (0.54) ^A	2.76 (0.49) ^B
Gs ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0.39 (0.10) ^A	0.27 (0.07) ^B
WUE ($\mu\text{mol CO}_2 / \text{mmol H}_2\text{O}$)	2.87 ^A	7.01 ^B

Table 3 Biochemical parameters (standard deviation in parenthesis) of soybean grown in ambient ($380 \pm 9 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and doubled CO_2 concentrations ($760 \pm 11 \mu\text{mol mol}^{-1}$); letters indicate significance for each parameter between the treatments ($P < 0.05$)

Variable (N = 10)	[CO ₂] ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)			
	380		760	
	Leaf	Cotyledon	Leaf	Cotyledon
Total Sugar (mg glc g ⁻¹ DW)	13.61 (1.4) ^A	27.84 (1.21) ^B	13.74 (0.83) ^A	30.21 (0.29) ^C
Reducing Sugar (mg glc g ⁻¹ DW)	3.52 (0.30) ^A	25.0 (4.02) ^B	4.29 (0.33) ^A	25.31 (4.56) ^B
Starch (mg glc g ⁻¹ DW)	24.75 (2.31) ^A	6.02 (1.11) ^B	19.49 (6.27) ^A	7.86 (0.22) ^C
TNC (mg glc g ⁻¹ DW)	38.36 ^A	33.86 ^B	33.23 ^B	38.07 ^A
Cellulose (mg g ⁻¹ DW)	133.33 (5.23) ^A	120.0 (6.37) ^B	163.33 (7.28) ^C	123.7 (2.73) ^B
Phenolics ($\mu\text{g phenol g}^{-1}$ DW)	14.10 (0.25) ^A	10.82 (0.14) ^B	11.28 (0.25) ^C	11.77 (0.11) ^D
Nitrate Reductase ($\mu\text{mol NO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ g}^{-1}$ FW)	8226.08 (1379.3) ^A	113.08 (39.94) ^B	8659.72 (519.3) ^A	100.23 (37.13) ^B
Carbon (%)	40.09	39.59	40.60	41.02
Nitrogen (%)	6.74	6.50	6.83	6.22
C/N ratio	5.95	6.09	5.95	6.59

DW, dry weight; TNC, total non-structural carbohydrate; FW, fresh weight

Table 4 Effects of enriched-CO₂ atmosphere ($760 \pm 11 \mu\text{mol mol}^{-1}$) on growth, photosynthesis and biochemical parameters of nine -day-old soybean

Variable	Leaf (%)	Cotyledon (%)
Dry Weight	0	0
Fresh Weight	+19.0	+12.1
Area	+28.1	+28.5
Specific area	+28.0	+28.9
A_{sat} area basis	+97.7	-
A_{sat} mass basis	+154.0	-
Fv/Fm	0	-
Transpiration	-23.5	-
Stomatic Conductance	-44.4	-
Water Use Efficiency	+144.2	-
Total Sugars	0	+8.5
Reducing Sugars	0	0
Starch	0	+30.6
TNC	-15.4	+12.4
Cellulose	+22.5	0
Phenolics	-25.0	+8.8
Nitrate Reductase	+5.3	0
Carbon	+1.3	+3.6
Nitrogen	+1.3	-4.5
C/N	0	-8.2

TNC, total non-structural carbohydrate; – not measured

Legend to the Figures

Fig. 1 Glucose (■), fructose (□), and sucrose (■) contents ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) in leaves and cotyledons of soybean grown under ambient atmosphere ($380 \pm 9 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and enriched in CO_2 ($760 \pm 11 \mu\text{mol mol}^{-1}$)

Figure 2 Production of **A-B** daidzin, **C-D** daidzein, **E-F** glyceollin and **G-H** coumestrol in cotyledons ($N = 24$) of soybean grown under ambient atmosphere ($380 \pm 9 \mu\text{mol mol}^{-1}$) (□) and enriched in CO_2 ($760 \pm 11 \mu\text{mol mol}^{-1}$) (■) in response to 12 and 20 h of elicitation with GSNO (*S*-nitrosoglutathione), SNP (sodium nitroprussiate) and β -GLU (β -glucan of *P. megasperma*). Induced cotyledon area = 50.24 mm^2 Bars indicate standard deviation. Significance levels are indicated by $*P < 0.05$ or $**P < 0.01$

Fig. 3 Production of **A-B** genistin and **C-D** genistein in cotyledons ($N = 24$) of soybean grown under ambient atmosphere ($380 \pm 9 \mu\text{mol mol}^{-1}$) (□) and enriched in CO_2 ($760 \pm 11 \mu\text{mol mol}^{-1}$) (■) in response to 12 and 20 h of elicitation with GSNO (*S*-nitrosoglutathione), SNP (sodium nitroprussiate) and β -GLU (β -glucan of *P. megasperma*). Induced cotyledon area = 50.24 mm^2 Bars indicate standard deviation. Significance levels are indicated by $*P < 0.05$ or $**P < 0.01$

Fig. 4 Production of **A-B** luteolin and **C-D** apigenin in cotyledons ($N = 24$) of soybean grown under ambient atmosphere ($380 \pm 9 \mu\text{mol mol}^{-1}$) (□) and enriched in CO_2 ($760 \pm 11 \mu\text{mol mol}^{-1}$) (■) in response to 12 and 20 h of elicitation with GSNO (*S*-nitrosoglutathione), SNP (sodium nitroprussiate) and β -GLU (β -glucan of *P. megasperma*). Induced cotyledon area = 50.24 mm^2 Bars indicate standard deviation. Significance levels are indicated by $*P < 0.05$ or $**P < 0.01$

Fig. 5 Activity of **A-B** phenylalanine ammonialyase (PAL), **C-D** β -glucosidase (β -Gluc), and **E-F** flavanone-3-hydroxylase (F-3H) measured in cotyledons ($N = 24$) of soybean grown under ambient atmosphere ($380 \pm 9 \mu\text{mol mol}^{-1}$) (□) and enriched in CO_2 ($760 \pm 11 \mu\text{mol mol}^{-1}$) (■) in response 12 and 20 h of elicitation with GSNO (*S*-nitrosoglutathione), SNP (sodium

nitroprussiate) and β -GLU (β -glucan of *P. megasperma*). Bars indicate standard deviation. Significance levels are indicated by * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$

Fig. 6 Biosynthetic pathways enhanced in soybean by elevated NO and the fungal elicitor (β -glucan) in soybean cultivated in elevated CO₂. PAL phenylalanine ammonia-lyase; CHS, CHR, CHI chalcone synthase, reductase and isomerase respectively; IFS isoflavone synthase; β -Gluc β -glucosidase; F-3H flavanone-3-hydroxylase. Grey arrows and stars indicate induction by β -glucan and dark ones by SNP

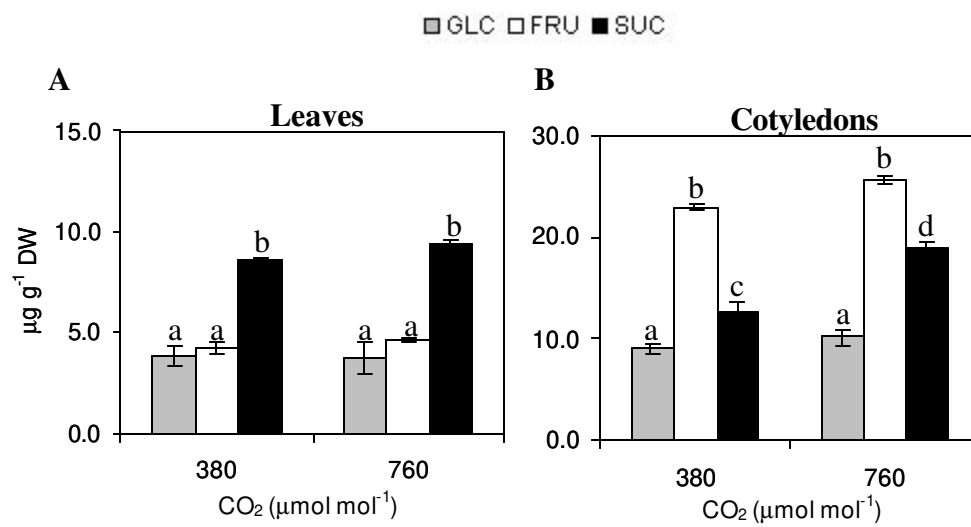


Figure 1

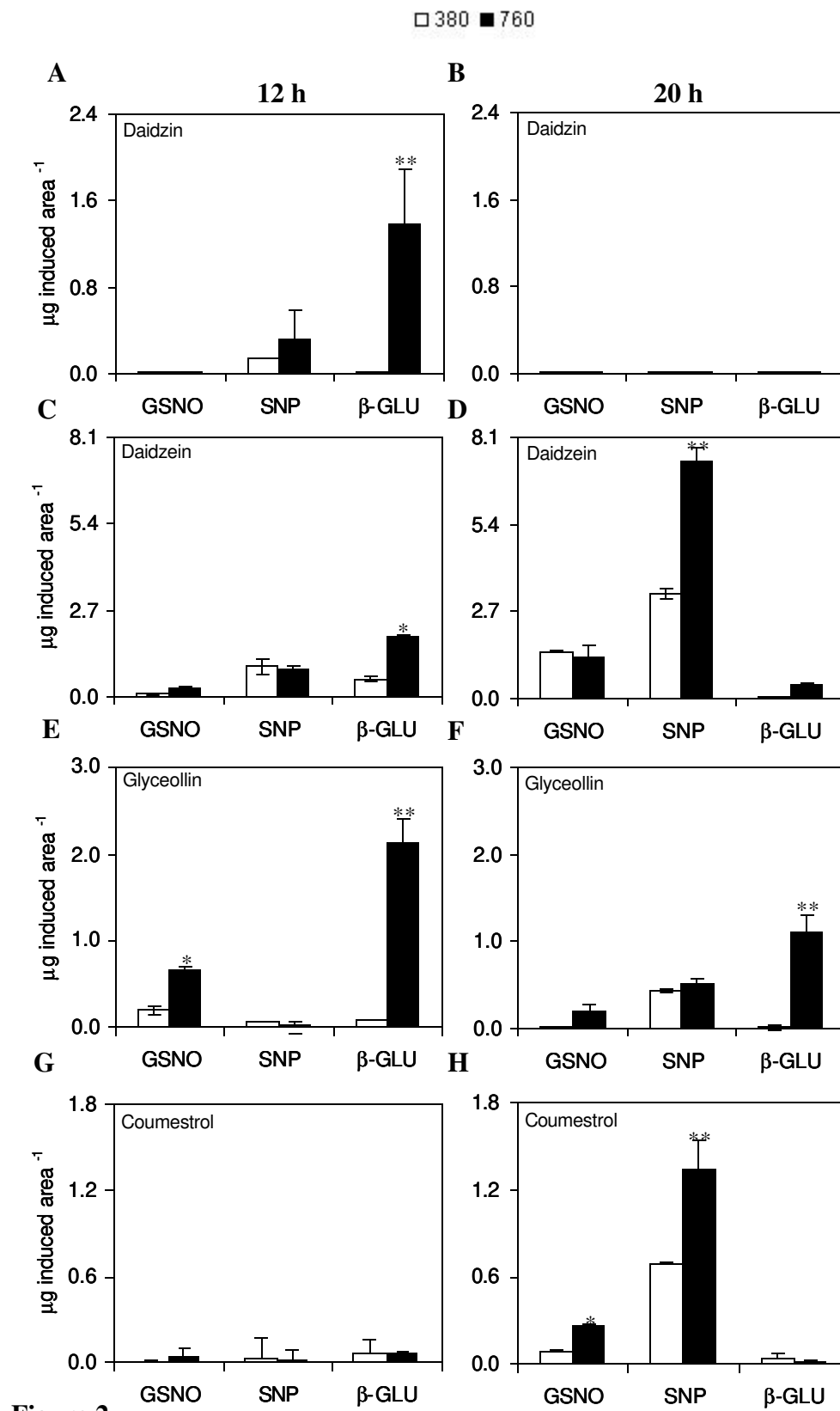


Figure 2

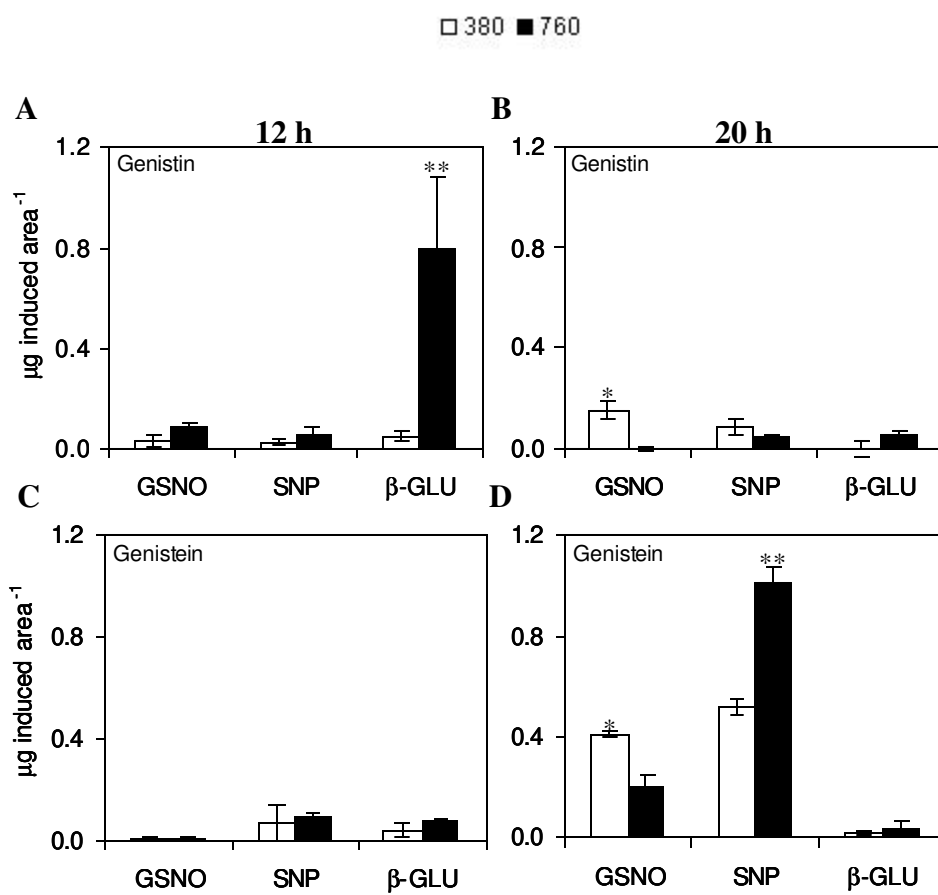


Figure 3

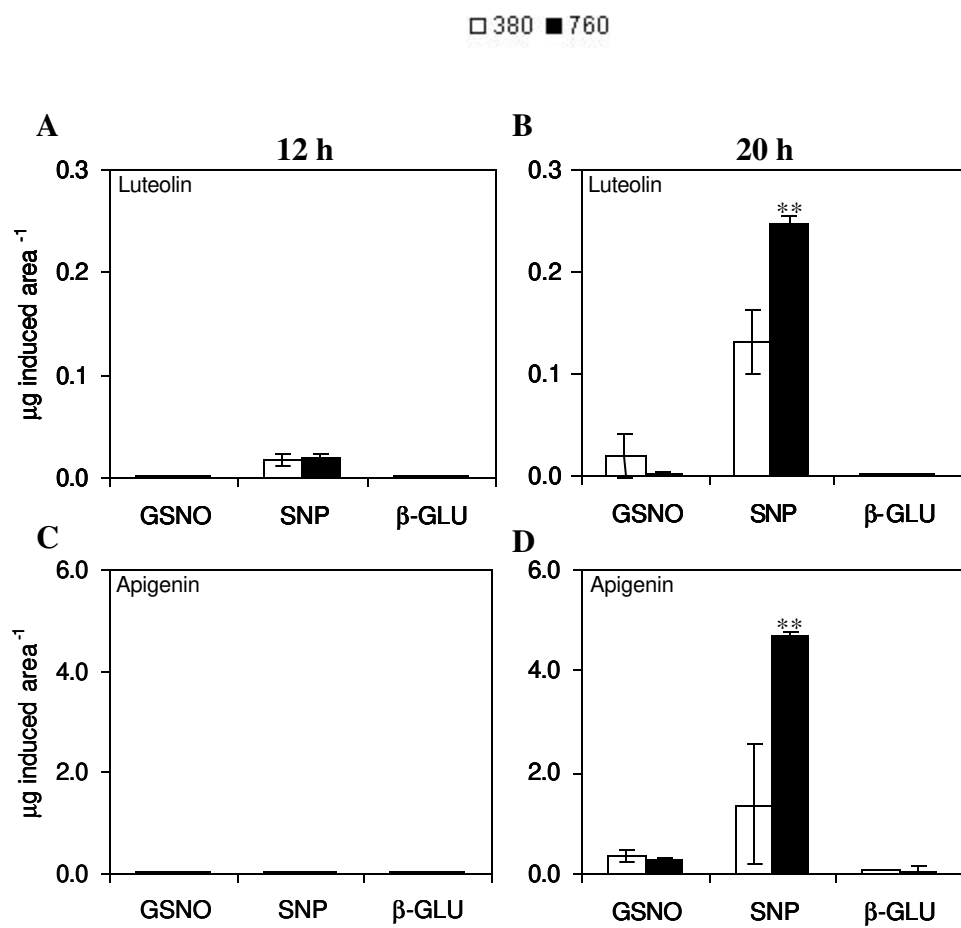


Figure 4

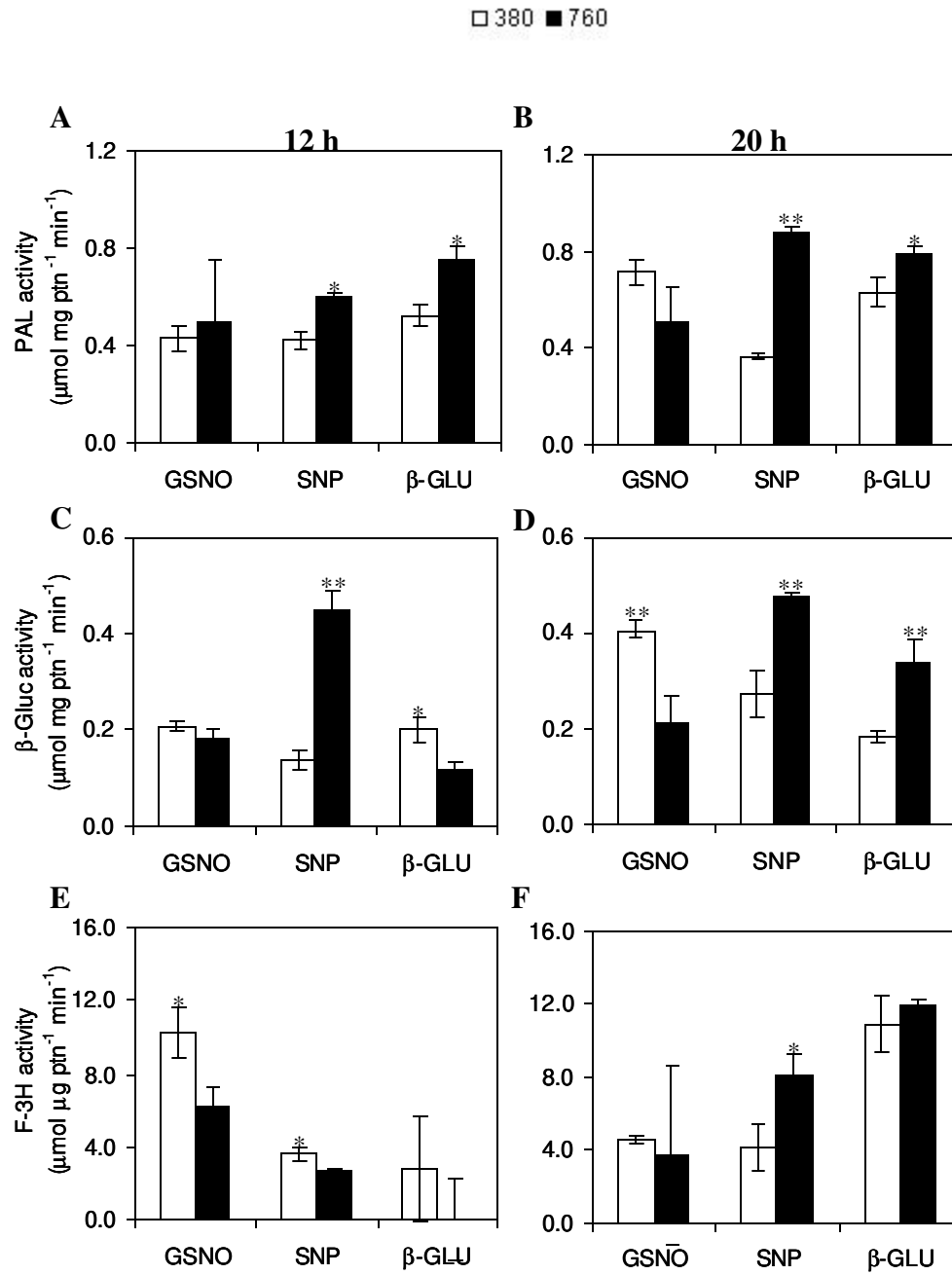


Figure 5

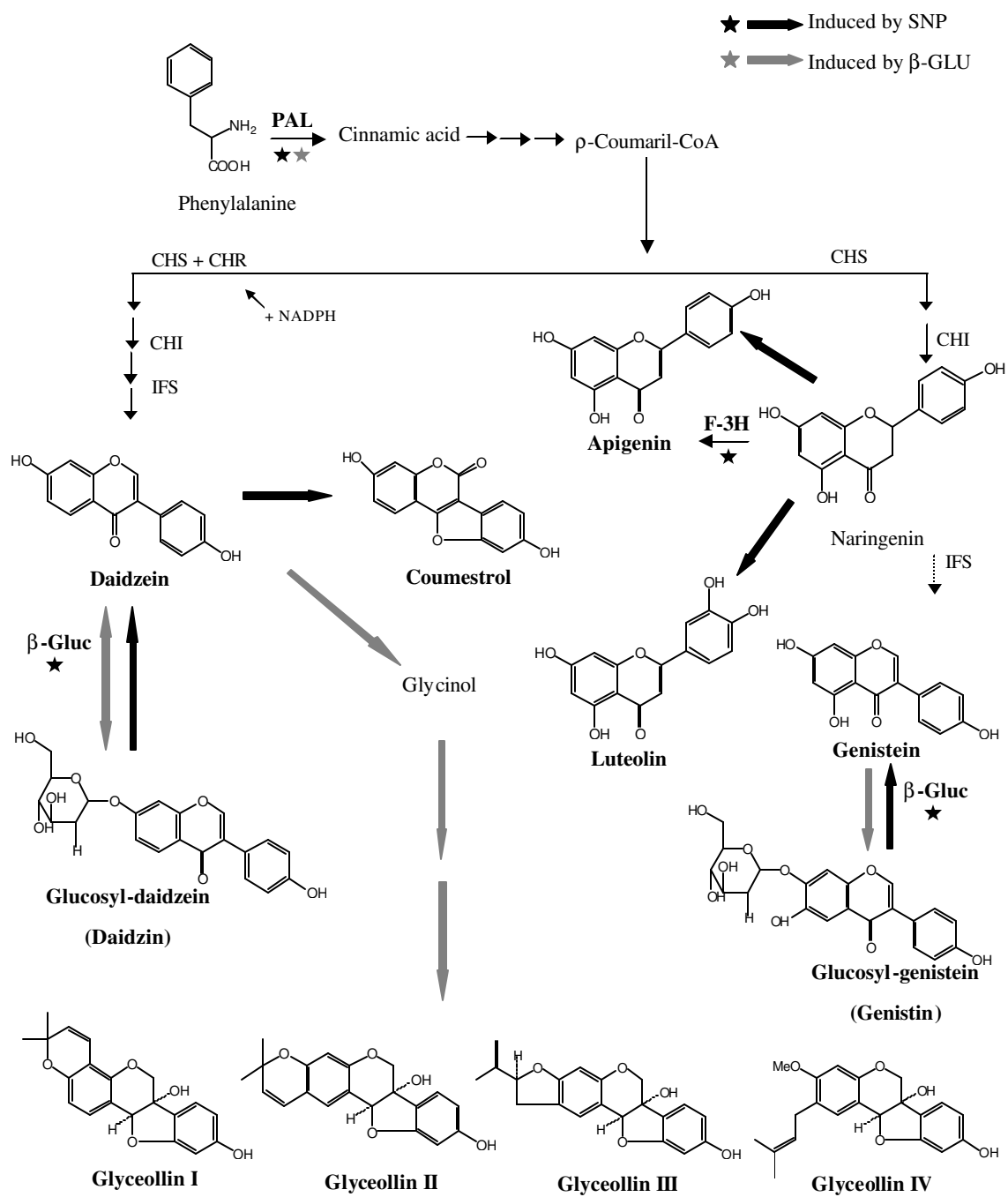


Figure 6