

## EMBEBIÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *PHASEOLUS VULGARIS* IRRADIADAS COM RAIOS GAMA

### SOAKING WATER AND GERMINATION OF GAMA-IRRADIATED *PHASEOLUS VULGARIS* SEEDS.

K. G. Hell<sup>(1)</sup> e Maria Angela V. da Silveira<sup>(2)</sup>

#### R E S U M O

Sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), variedade "bico-de-ouro", foram irradiadas com raios gama de uma fonte de Cs<sup>137</sup>. Mediu-se a velocidade de germinação, a 30°C, em teor ótimo e em excesso de água de embebição. Dos resultados ressalta-se a germinação significativamente maior ( $p < 0,05$ ) encontrada após 24 horas de germinação, com um tratamento de 5 Kr, nos dois teores de água. Esta diferença permanece como tendência nas horas seguintes, apesar de não ser detectável pelo teste estatístico empregado ( $X^2$ ). Outras diferenças estatisticamente significativas também foram encontradas, principalmente indicando um retardamento ou inibição na germinação. Verificou-se também a manutenção da alta germinabilidade das sementes tratadas, mesmo em doses como 120 Kr, quando as sementes são germinadas em condições ótimas. A germinabilidade revelou-se significativamente menor, em doses altas, quando a germinação ocorre em condições de excesso de água. Nas doses de 20 Kr e acima, nota-se um retardamento na germinação, principalmente nas primeiras 24 horas. Nas sementes germinadas em teor ótimo de água ocorre uma recuperação deste atraso, notável principalmente após 40 horas de germinação. Esta recuperação não ocorre em sementes germinadas em excesso de água de embebição. Sugere-se que este efeito pode ser provocado pela interferência no metabolismo energético, importante no fenômeno da recuperação de danos rádio-induzidos, decorrente da menor velocidade de difusão de oxigênio nos tecidos submetidos a um excesso de água de embebição. Os dados obtidos corroboram os resultados apresentados por outros autores que indicam o segundo dia de germinação como fase mais sensível à ação das radiações X e gama sobre a germinação de sementes.

(1) Dep. Botânica — Univ. S. Paulo.

(2) Aluna de Pós-graduação do Dep. Botânica — Univ. S. Paulo.

## SUMMARY

Bean seeds (*Phaseolus vulgaris* var. "bico-de-ouro") were treated with gamma-rays from a Cs<sup>137</sup> irradiation device. The germination rate was measured at 30°C, at two different amounts of soaking water. There was a significant increase ( $p < 0.05$ ) in germination, after 24 hours, at 5 Kr, both in excess and in optimal soaking water. This difference could not be detected in later hours, but still remained as a tendency. Other statistically different germination amounts were detected, but mainly inhibitory in nature and at heavy doses of radiation. Even at heavy doses a high germinability could be detected when the seeds were germinated with optimal soaking water. With excess of soaking water there was a significant decrease in the germinability. With doses of 20 Kr and above, a marked retardation could be detected, mainly in the first 24 hours. In optimal soaking water this retardation disappears within a few hours, most strikingly in the first 40 hours of germination. This restoration does not occur when the seeds are germinated in excess of soaking water. It is suggested that this effect might occur by interference with energetic metabolism, important component of restitution of radio damaged systems, and as a consequence of decreased diffusion of oxygen through the tissues soaked in excess of water. As previously related by other authors, and also suggested by our results there seems to be a highly sensitive phase in plant germination about the 2<sup>nd</sup> day of germination.

## INTRODUÇÃO

O estudo da germinação de sementes irradiadas situa-se entre as primeiras pesquisas realizadas sobre efeitos biológicos das radiações ionizantes (Maldiney & Thouvenin, 1898). Os efeitos destas radiações sobre a germinação, descritos por vários autores, indicam que doses medianas e altas provocam um retardo ou inibição na germinação, havendo para doses baixas, citações contraditórias de estimulação, ausência de alterações, ou mesmo, retardamento na germinação (Gunckel, 1965). A radio-sensibilidade das sementes é muito variável; sementes de *Lilium regale* são inibidas em sua germinação por doses de 2 000 r, enquanto que sementes de repolho (*Brassica oleraceae*) e de rabanete (*Raphanus sativus*) não são praticamente afetadas por doses de até 64 000 r de raios-X (Bacq & Alexander, 1961). A intensidade com que as sementes são afetadas depende não somente da espécie de radiação empregada e das condições em que esta é ministrada, como também das condições de pós-irradiação, tais como, entre outras, da temperatura, teor de água das sementes, concentração de oxigênio, etc. (Caldecott & North, 1961).

A alta sensibilidade das sementes de feijoeiro a um teor excessivo de água de embebição (Lang, 1965), bem como a constatação de que um dos principais fatores envolvidos neste processo pode ser a diminuição na velocidade de difusão do oxigênio através dos tecidos (Ohmura & Howell, 1960), levou-nos a investigar este efeito sobre a velocidade de germinação das sementes irradiadas e embebidas em teor ótimo e excessivo de água.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram usadas sementes de *Phaseolus vulgaris* var. "bico-de-ouro", de uma mesma safra, e com 13% de teor de água. As sementes foram irradiadas a uma taxa de dose de 1 700 r/h de raios gama, provenientes de uma fonte de césio <sup>137</sup> (\*). A irradiação processou-se ao ar e temperatura ambiente. Imediatamente após a irradiação as sementes foram germinadas em caixas de plástico (11 x 11 cm) em número de 40 por caixa, sobre papel de filtro embebido em água de torneira. Dois teores de água de embebição foram utilizados: 12 ml e 16 ml, considerados, respectivamente como "ótimo" e como "excesso" de água de embebição. Estes teores foram escolhidos a partir de ensaios prévios, com sementes não irradiadas, escolhendo-se como ótimo aquele teor que provocasse maior velocidade de germinação e como excesso aquele que provocasse um retardamento na germinação, sem contudo inibi-la totalmente. Os lotes de irradiação comportavam 80 sementes cada; destas, 40 foram germinadas em teor ótimo de água e 40 em excesso. Cada tratamento foi repetido 5 vezes. Em todos os tratamentos havia um controle paralelo de sementes não irradiadas. Este procedimento foi adotado em virtude da longa duração de tempo previsto para o término de todos os tratamentos. Procuramos desta forma minimizar as possíveis alterações na rádio-sensibilidade das sementes, decorrentes de variações estacionais (Zdansky et al., 1954; Barnetzky, 1960). A germinação processou-se no escuro, à temperatura constante de 30°C. As sementes foram consideradas como germinadas no primeiro sinal visível da emergência da radícula. A velocidade de germinação foi estabelecida por contagens sucessivas do número de sementes germinadas, a 24, 40, 48, 64 e 72 horas após início da embebição. As contagens realizaram-se às 9,00 e 17,00 horas de cada dia.

## RESULTADOS

As porcentagens parciais e acumuladas de germinação, por tratamento, são apresentadas na tabela 1, para embebição em teor ótimo de água e na tabela 2 para excesso de água. Estes resultados mostram a existência de uma relação entre dose de radiação e porcentagem de germinação. Para as sementes germinadas em teor ótimo de água, esta relação é bem visível após 24 horas, tornando-se menos nítida nas horas seguintes, principalmente em decorrência das altas porcentagens de germinação parcial constatadas a 40 horas, nas doses de 20, 40 e 80 Kr. Pode-se notar, ainda, as altas porcentagens de germinação atingidas pelas sementes irradiadas, após 72 horas de germinação. Nas sementes germinadas em teor excessivo de água de embebição esta relação permanece durante todo o processo de germinação, não havendo recuperação nítida, para as doses altas, a 40 horas.

(\*) Doação da Fundação Rockefeller, ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da USP.

TABELA 1 — Porcentagens de germinação em teor ótimo de água de embebição: Valores parciais (P) e acumulados (A).

Tratamento	Tempo em horas									
	24		40		48		64		72	
	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A
2,5 Kr	46,5	46,5	45,5	92,0	3,0	95,0	2,0	97,0	0,0	97,0
Controle	49,5	49,5	40,5	90,0	5,0	95,0	1,5	96,5	0,0	96,5
5 Kr	56,5	56,5	38,5	95,0	3,0	98,0	1,0	99,0	0,0	99,0
Controle	38,5	38,5	53,0	91,5	3,5	95,0	0,5	95,5	0,5	96,0
10 Kr	47,5	47,5	49,5	97,0	1,5	98,5	1,0	99,5	0,0	99,5
Controle	42,5	42,5	49,5	92,0	4,5	96,5	0,5	97,0	0,5	97,5
20 Kr	32,0	32,0	61,0	93,0	1,5	94,5	1,5	96,0	0,5	96,5
Controle	40,0	40,0	54,0	94,0	1,0	95,0	1,0	96,0	0,0	96,0
40 Kr	31,0	31,0	61,0	92,0	2,5	94,5	2,0	96,5	0,0	96,5
Controle	45,5	45,5	50,0	95,5	1,5	97,0	0,5	97,5	0,0	97,5
80 Kr	24,0	24,0	64,0	88,0	4,0	92,0	1,5	93,5	0,0	93,5
Controle	38,0	38,0	51,5	89,5	4,0	93,5	0,0	93,5	0,0	93,5
120 Kr	28,5	28,5	54,5	83,0	5,0	88,0	4,5	92,5	0,0	92,5
Controle	41,5	41,5	50,0	91,5	4,0	95,5	2,0	97,5	0,0	97,5

TABELA 2 — Porcentagens de germinação em excesso de água de embebição: Valores parciais (P) e acumulados (A).

Tratamento	Tempo em horas									
	24		40		48		64		72	
	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A
2,5 Kr	43,5	43,5	23,0	66,5	8,5	75,0	10,0	85,0	1,0	86,0
Controle	43,5	43,5	20,0	63,5	3,0	66,5	11,0	77,5	1,5	79,0
5 Kr	42,5	42,5	23,0	65,5	7,0	72,5	5,5	78,0	0,5	78,5
Controle	31,0	31,0	32,0	63,0	9,0	72,5	6,0	78,5	2,5	81,0
10 Kr	41,5	41,5	24,5	66,0	3,5	69,5	5,0	74,5	1,0	75,5
Controle	40,0	40,0	28,0	68,0	8,5	76,5	2,5	79,0	1,0	80,0
20 Kr	29,0	29,0	15,0	44,0	11,5	55,5	4,0	59,5	1,5	61,0
Controle	40,5	40,5	22,5	63,0	6,0	69,0	3,0	72,0	1,0	73,5
40 Kr	23,0	23,0	25,0	48,0	6,0	54,0	5,5	59,5	0,5	60,0
Controle	31,0	31,0	31,5	62,5	2,5	65,0	2,5	67,5	2,0	69,5
80 Kr	21,5	21,5	24,5	46,0	7,0	53,0	3,5	56,5	3,0	59,5
Controle	37,5	37,5	25,0	62,5	3,5	66,0	3,0	69,0	0,5	69,5
120 Kr	19,5	19,5	25,0	44,5	7,5	52,0	1,0	53,0	5,5	58,5
Controle	38,5	38,5	25,0	63,5	5,5	69,0	4,5	73,5	1,5	75,0

A relação entre dose de radiação e germinação está esquematizada na Figura 1, que representa o número médio de sementes germinadas após o tratamento com as diferentes doses de radiação e germinadas em teor ótimo e em excesso de água. Neste caso, apenas para comparação de tendências, apresentamos para a dose zero o valor médio de germinação de todos os controles. Nesta figura, nota-se, nas doses baixas de radiação (2.5, 5 e 10 Kr), uma tendência para valores médios maiores. As sementes tratadas com doses altas de radiação (de 20 a 120 Kr) e germinadas em teor ótimo de água mostram um nítido retardo na germinação, característico nas primeiras 24 horas, desaparecendo gradualmente, a partir de 40 horas. Já nas sementes germinadas em excesso de água, este retardo também aparece nas mesmas doses, porém a recuperação não ocorre como no caso precedente.

Na Tabela 3 apresentamos os valores de  $X^2$  para os tratamentos germinados com teor ótimo de água de embebição. Estes valores foram calculados por meio de tabelas de contingência 2 x 2, entre tratados e respectivos controles, a partir de valores absolutos de germinação. Nesta tabela pode se verificar que o número de sementes germinadas após 24 horas, com tratamento de 5 Kr é significativamente maior que no respectivo controle, bem como a de 10 Kr após 40 horas de germinação. Outras diferenças significativas são encontradas nas doses de 40 e 80 Kr, após 24 horas de germinação e 120 Kr em todas as contagens realizadas; todas estas diferenças mostram uma germinação menor nos tratados em relação aos respectivos controles. Nos demais casos o teste não revelou diferenças significativas entre controles e tratados. A tabela 4 mostra os valores de  $X^2$  para os tratamentos germinados em excesso de água. Diferenças significativas indicando uma germinação maior nos tratados são encontradas na dose de 2.5 Kr, após 64 horas de germinação e para a dose de 5 Kr após 24 horas. Todas as contagens feitas para a dose de 20 Kr mostraram uma diferença significativamente menor para as sementes tratadas. Na dose de 40 Kr, encontramos germinação significativamente menor após 40, 48 e 72 horas. Todas as contagens feitas para as doses de 80 e 120 Kr mostraram uma germinação significativamente menor nos tratados. Nos demais casos analisados, o teste não revelou diferenças significativas entre controles e tratados. A tabela 5 apresenta a germinação expressa como porcentagem em relação ao respectivo controle (considerado 100%), para teores ótimo e excesso de água de embebição. Verifica-se que, excetuando-se a dose de 2.5 Kr em todos os pontos, e a dose de 40Kr a 24 horas, todas as demais porcentagens para tratamentos com excesso de água são menores que as correspondentes à germinação em teor ótimo de água.

#### DISCUSSÃO

Da análise dos resultados ressalta a maior germinação, estatisticamente significativa, encontrada nos tratamentos com 5 Kr, nas primeiras 24 horas de germinação, tanto nas sementes germinadas

TABELA 3 — Valores de  $X^2$ , controles x tratados, germinação em teor ótimo de água de embebição ( $X^2_{0,05} = 3,84$  e  $X^2_{0,01} = 6,63$ ).

Tratamentos em Kr	Tempo em horas				
	24	40	48	64	72
2,5	0,36	0,48	0,00	0,03	0,03
5	12,99	1,94	2,66	3,36*	2,56
10	1,85	3,89*	0,16	2,32*	1,52*
20	2,77	0,16	0,05	0,00	0,00
40	8,90	2,09	1,53	0,08*	0,08*
80	9,16	0,22	0,33	0,00	0,00
120	7,42	5,75*	6,47*	4,26*	4,26*

\* Com correção de Yates.

TABELA 4 — Valores de  $X^2$ , controles x tratados, germinação em excesso de água de embebição ( $X^2_{0,05} = 3,84$  e  $X^2_{0,01} = 6,63$ ).

Tratamentos em Kr	Tempo em horas				
	24	40	48	64	72
2,5	0,00	0,84	3,49	5,33	3,39
5	5,68	0,27	0,00	0,02	0,38
10	0,93	0,18	2,42	2,74	1,17
20	5,83	14,51	7,75	6,93	7,09
40	3,24	8,50	5,02	2,76	3,95
80	12,30	10,96	7,01	6,68	4,36
120	17,53	14,43	12,09	18,07	12,26

em teor ótimo como em excesso de água. Esta diferença, nas horas seguintes, deixa de ser detectada através do método estatístico empregado, permanecendo porém como tendência, como pode ser visto na figura 1. Esta figura mostra-nos ainda a mesma tendência, em vários pontos, nas doses de 2.5 e 10 Kr. Há também diferenças estatisticamente significativas para a dose de 2.5 Kr, a 64 horas de germinação, em teor excessivo de água e 10 Kr, a 40 horas, em teor ótimo de água. O fenômeno constatado, geralmente chamado de "estimulação", já foi descrito por vários autores e observado nos mais diferentes materiais e processos fisiológicos, sendo objeto de grande

TABELA 5 — Germinação como porcentagem em relação ao respectivo controle, para teores ótimo e excesso de água de embebição.

Tratamento em Kr	Teor de água	Tempo em horas				
		24	40	48	64	72
2,5	Ótimo	93,9	102,2	100,0	100,5	100,5
	Excesso	100,0	104,7	112,7	109,6	108,8
5	Ótimo	146,7	103,8	103,1	103,6	103,1
	Excesso	137,0	103,9	100,0	99,3	96,9
10	Ótimo	117,7	105,4	102,0	102,5	102,5
	Excesso	103,7	97,0	90,8	94,3	94,3
20	Ótimo	80,0	98,9	99,4	100,0	100,5
	Excesso	71,6	69,8	80,4	82,6	82,9
40	Ótimo	68,1	96,3	97,4	98,9	98,9
	Excesso	74,1	76,8	83,0	88,1	86,3
80	Ótimo	63,1	98,3	98,3	100,0	100,0
	Excesso	57,3	73,6	80,3	81,8	85,6
120	Ótimo	68,6	90,7	92,1	94,8	94,8
	Excesso	50,6	70,0	75,3	72,1	78,0

controvérsia, principalmente devido à dificuldade de ser detectado, bem como ao seu caráter transitório. Segundo Sax (1963) em sua revisão sobre o assunto, as evidências acumuladas pelos inúmeros trabalhos relatados, indicam claramente que em resposta à irradiação com doses baixas de radiações ionizantes, podem aparecer efeitos estimulatórios em determinados estágios do desenvolvimento das plantas. Não há porém, apesar do grande número de ensaios já realizados, resultados consistentes que indiquem a possibilidade de empregar-se esta “estimulação” para fins aplicados. O mecanismo fisiológico envolvido no processo é desconhecido. Gunckel & Sparrow (1961) consideram que em alguns casos o metabolismo da planta poderia ser suficientemente alterado por uma determinada dose de radiação ionizante, resultando daí um aumento na razão de crescimento. Como fator possivelmente envolvido no processo, estes autores citam a queda no teor de auxina que pode ser detectado em alguns casos de material irradiado. Como outra alteração no metabolismo, eventualmente relacionada ao fenômeno, podemos lembrar a constatação do aumento no consumo de oxigênio, verificável em alguns casos quando o material é irradiado (Hell, 1971).

Na faixa de doses mais altas (de 20 a 120 Kr), após 24 horas de germinação, percebe-se o retardamento deste processo, seguido de uma nítida recuperação após 40 horas quando as sementes são germinadas em teor ótimo de água de embebição. Esta recuperação não ocorre, pelo menos na mesma intensidade, nas sementes germinadas em excesso de água de embebição. Desta maneira, a embebição de sementes de feijoeiro, em excesso de água durante a germinação, aumenta sua sensibilidade às radiações ionizantes, medida como velocidade de germinação, pelo menos nas doses testadas em nosso experimento. Este resultado pode ser uma conseqüência da menor velocidade de difusão de oxigênio pelos tecidos, interferindo no metabolismo energético, que segundo Klein & Klein (1971) é um dos fatores envolvidos no fenômeno da restauração de danos induzidos pelas radiações ionizantes. O controle inadequado do teor de água de embebição em experimentos com sementes irradiadas pode ser responsável por variações na germinabilidade deste material, mesmo em sementes menos sensíveis à excesso de água de embebição. A interferência de condições ambientais no processo de recuperação pode ser uma das causas da constatação de que a germinação de sementes irradiadas, no campo, é sempre menor que a esperada a partir de testes de laboratório (Heaslip, 1959).

Biebl (1958) assinala, para trigo e soja, uma variação na radiosensibilidade quando o material é irradiado durante o processo de germinação, variação esta que se caracteriza por um pico de maior sensibilidade no segundo dia de germinação. Considera o mesmo autor, que esta maior radio-sensibilidade corresponde à mobilização e infiltração dos reguladores de crescimento dos tecidos de reserva para o embrião. Os resultados obtidos em nosso experimento indicam que para o feijão o período compreendido entre 24 a 40 horas após o início da embebição é crítico para a expressão do dano causado pelas radiações gama.

#### BIBLIOGRAFIA CITADA

- BACQ, Z. M. and ALEXANDER, P. — 1961 — Fundamentals of radiobiology, 2<sup>nd</sup> ed. Pergamon Press. 555 pp.
- BARNETZKY, F. — 1960 — Eine jahresperiodische Änderung der Strahlenempfindlichkeit bei Gerste. *Naturwiss.* 47:116-117.
- BIEBL, R. — 1958 — The radiosensitive phase in plant germination. *Internat. Conf. Peaceful uses Atomic Energy Proc.* 2(27):299-304.
- CALDECOTT, R. S. and NORTH, D. T. — 1961 — Factors modifying the radio-sensitivity of seeds and the theoretical significance of the acute irradiation of successive generations. *Symposium on mutation and plant breeding. Nat. Acad. Sci. Publ.* 891:365-400.
- GUNCKEL, J. E. and SPARROW, A. H. — 1961 — Ionizing radiations: biochemical, physiological and morphological aspects of their effects on plants p. 555-611, "in" Ruhland, W. *ed.* *Encyclopedia of Plant Physiol.* 16. Springer-Verlang.



- GUNKEL, J. E. — 1965 — Modifications of plant growth and development induced by ionizing radiations p. 365-387, "in" Ruhland W. *ed.* *Encyclopedia of Plant Physiol.* 15/2. Springer-Verlag.
- HEASLIP, M. B. — 1959 — Effects of seed irradiation and seedling growth of certain deciduous trees. *Ecology* 40:383-388.
- HELL, K. G. — 1971 — Respiração em sementes de mamona submetidas à radiação gama. *Ciência e Cultura* 23:52-55.
- KLEIN, R. M. and KLEIN, D. T. — 1971 — Post-irradiation modulation of ionizing radiation damage to plants. *Bot. Rev.* 37:397-436.
- LANG, A. — 1965 — Effects of some internal and external conditions on seed germination p. 848-893, "in" Ruhland, W. *ed.* *Encyclopedia of Plant Physiol.* 15/2. Springer-Verlag.
- MALDINEY et THOUVENIN — 1898 — De l'influence des rayons X sur la germination. *Rev. Gen. Bot.* 10:81-86 + 2 pl.
- OHMURA, T. and HOWELL, R. W. — 1960 — Inhibitory effects of water on oxygen consumption by plant materials. *Plant Physiol.* 35:184-188.
- SAX, K. — 1963 — The stimulation of plant growth by ionizing radiation. *Rad. Bot.* 3:179-186.
- ZDANSKY, E., DREXLER, L. and WEKGARTNER, R. H. — 1954 — The effects of ionizing radiation on non-germinating plant seed. *Strahlentherapie* 93:289-294.

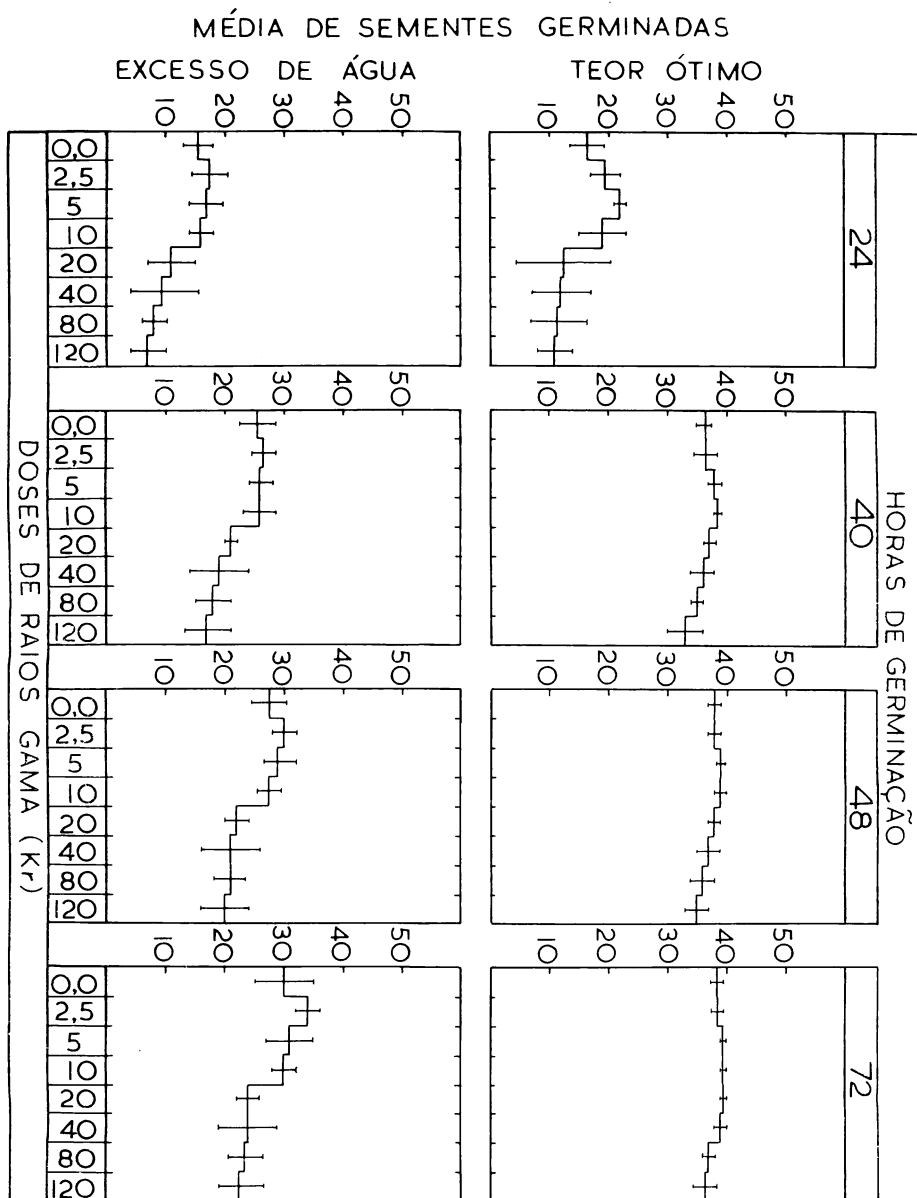


Fig. 1 — Número médio de sementes germinadas após tratamento com radiação gama, e embebidas em teor ótimo e excessivo de água. As barras verticais representam  $\pm 1$  desvio padrão da média (s).

Fig. 1 — Mean of germinated seeds after gamma-irradiation followed by soaking in optimal and excess of water. Vertical bars represent  $\pm 1$  standard deviation of the mean (s).