

ENSAIO SOBRE A UTILIZAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE RADIAÇÃO NO ESTUDO DA TRANSLOCAÇÃO DE FÓSFORO E CÁLCIO RADIOATIVOS EM FEIJÃO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.), A PARTIR DA APLICAÇÃO FOLIAR¹

Ivan Amaral Guerrini²
Marcos Antonio de Rezende²

ABSTRACT

Radioautograph technique, Geiger-Muller tube counter and liquid scintillation were the three different methods of radiation detection utilized to study the translocation of ³²P and ⁴⁵Ca in plants of beans. Radioactive solutions were applied in leaves and it was shown that as ³²P is highly mobile and ⁴⁵Ca is almost imobile, the Geiger Muller tube counter and the liquid scintillation methods allowed to quantify these results, while radioautograph method showed only qualitative but very illustrative results about the translocation of elements.

RESUMO

Foram utilizados a técnica de autorradiografia, o tubo contador Geiger Muller e a cintilação líquida como métodos de detecção de radiação para se estudar a translocação de ³²P e ⁴⁵Ca em plantas de feijão. Soluções radioativas foram aplicadas nas folhas das plantas e enquanto mostrou-se a grande mobilidade do ³²P e a pouca

- 1 Trabalho realizado com auxílio financeiro do CNPq e da FAPESP.
- 2 Professores Assistentes Doutores do Departamento de Física e Biofísica, IB, UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo. 18610 - Botucatu-SP, (0149) 22-0555/R.254.

Pesquisas	Botânica	Nº 44	1993	P.53-58
-----------	----------	-------	------	---------

mobilidade do ^{45}Ca , os métodos do tubo contador Geiger Muller e do cintilador líquido mostraram-se adequados na quantificação dos resultados. O método da autorradiografia mostrou apenas resultados qualitativos para a translocação dos elementos, muito embora claros e ilustrativos.

INTRODUÇÃO

Sabe-se do estudo da nutrição das plantas que o fósforo e o cálcio são classificados como macro nutrientes, sendo elementos essenciais ao desenvolvimento das plantas. Além disso, BOARETTO et al (1984) e BOARETTO et al (1985), dentre outros, mostram que o fósforo é um elemento de grande mobilidade no feijoeiro, enquanto que o cálcio não (MALAVOLTA, 1979), sendo esses fatores importantes na decisão de se utilizar ou não a aplicação foliar para a adubação referente a esses elementos.

Evidentemente, tanto o fósforo radioativo (^{32}P) como o cálcio radioativo (^{45}Ca) são elementos marcados que se constituem em importantes ferramentas no estudo da translocação e consequente função desses elementos na planta, devido à facilidade de sua localização através de sua detecção como material radioativo que são.

Neste trabalho foi feito um ensaio experimental com aplicações foliares de ^{32}P e ^{45}Ca em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.), com o objetivo de se estudar a trajetória desses elementos marcados na planta, através da utilização de três métodos distintos de detecção: a) cintilação líquida, utilizada para detectar a possível translocação do material radioativo para as soluções nutritivas utilizadas no cultivo; b) tubo Geiger Muller (GM), para a contagem de material radioativo nas várias partes das plantas depois de secas; c) autorradiografia, para verificar a translocação dos elementos nas folhas e nas plantas como um todo, através da impregnação de chapas fotográficas.

MATERIAL E MÉTODOS

Em solução nutritiva completa, de Hoagland, foram cultivadas plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) em dois vasos, em condições de casa de vegetação, sendo uma planta por vaso.

Com auxílio de micropipetas, espalhou-se num dos folíolos de uma das plantas, $1,0 \times 10^{-2}$ ml da solução de ácido fosfórico marcado ($\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$), sendo ^{32}P livre de carregador. Na planta do outro vaso repetiu-se a operação, utili-

zando-se porém $1,0 \times 10^{-1}$ ml de solução de cloreto de cálcio marcado ($^{45}\text{CaCl}_2$) contendo ^{45}Ca como carregador.

Depois desse procedimento, as plantas, em seus respectivos vasos, permaneceram em casa de vegetação, isoladas, por 5 dias. Após esse período, as plantas foram retiradas e colocadas inteiras para a secagem a 70°C durante 4 dias, em dois suportes distintos, os quais constituíam um sanduiche cada um, formado por folhas de jornal, papel absorvente e moldura para a sustentação do conjunto e amarras.

Da solução nutritiva remanescente nos vasos foram coletadas amostras para a detecção, através de cintilação líquida, da possível translocação dos elementos radioativos para a referida solução, via planta. Da solução onde havia estado a planta com fósforo, foram retirados 20 ml e colocados num frasco; também foi preparada uma amostra contendo 20 ml de água destilada para a prova em branco.

Também para a detecção através de cintilação líquida, retirou-se 5,0 ml da solução onde havia estado a planta com cálcio, os quais foram colocados em frasco do mesmo tipo, tendo sido adicionados 15 ml de solução cintiladora. De modo análogo, também neste caso, foi preparado um frasco com 5,0 ml de água destilada ao qual foram adicionados outros 15 ml da solução cintiladora para a contagem da radiação de fundo.

Por outro lado, as plantas já secas tiveram suas atividades medidas nas suas diversas partes através de um tubo contador GM e finalmente, depois disso foram colocadas em contacto com chapas de raios X, ou seja, filmes fotográficos, para a utilização da técnica de autorradiografia na detecção da translocação dos elementos marcados. Nesse último caso, colocou-se numa chapa os dois folíolos que foram tratados com as soluções radioativas; noutra chapa o restante da planta que recebeu fósforo e numa terceira o restante da planta que recebeu cálcio. Essa operação com as chapas foi realizada numa câmara escura, onde as partes da planta ficaram em contacto direto com as chapas fotográficas e depois de embrulhadas com papel foram deixadas assim pelo tempo necessário para a impregnação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme procedimento já mencionado, foram tomadas amostras da solução nutritiva que, através do método da cintilação líquida, apresentaram os resultados mostrados no Quadro I.

Para a obtenção dos valores do Quadro I foi utilizada a seguinte equação:

$$R_L = \left(\frac{N_B}{t_B} - \frac{N_F}{t_F} \right) \pm \sqrt{\frac{N_B}{t_B^2} + \frac{N_F}{t_F^2}}$$

onde:

R_L = taxa de contagem líquida da amostra radioativa, em impulsos por minuto;

N_B = contagem total (bruta), em impulsos;

N_F = contagem da radiação de fundo devido ao frasco, água, etc., em impulsos;

t_B, t_F = tempo, em minutos, decorridos para a determinação de N_B e N_F , respectivamente;

Esses resultados mostram claramente que o fósforo translocou-se da planta para a solução nutritiva, enquanto que o cálcio não o fez. De fato, o erro em R_L para o ^{32}P está em torno de 4%, enquanto que o erro em R_L para o ^{45}Ca é de mais de 100%, indicando que o valor medido está dentro do próprio erro.

Já no caso da análise das partes das plantas através do tubo contador GM, foram obtidos os resultados que estão no Quadro II.

Nesse Quadro II, cpm designa contagem por minuto e dpm, desintegração por minuto, enquanto que a passagem de um para outro foi feita através da eficiência do GM para cada radioisótopo, e ainda levando-se em conta a correção devida à meia-vida de cada um. A contagem da radiação de fundo já está descontada. Como o Folíolo 2 foi aquele que, em ambas as plantas, recebeu o elemento radioativo, nota-se novamente a grande translocação do fósforo em comparação com o cálcio, quando se analisam as contagens das demais partes das plantas. Por exemplo, enquanto que para o ^{32}P , 5,4% da taxa em dpm do Folíolo 2 foi detectado na Raiz, para o ^{45}Ca esse valor foi de apenas 0,038%, ou seja, cerca de 140 vezes menos.

Finalmente, no caso das chapas fotográficas, foram calculados os tempos de exposição de cada parte da planta segundo recomendações da literatura, o que está mostrado no Quadro III. Essa técnica da autorradiografia mostrou bons resultados, apesar de somente qualitativos, com a obtenção de boa nitidez nas chapas fotográficas, indicando exatamente a grande mobilidade do fósforo, enquanto que no caso do cálcio apenas apareceu uma grande mancha de impregnação da chapa colocada em contacto com o Folíolo 2; a outra chapa referente à mesma planta se mostrou praticamente intacta indicando a imobilidade do elemento.

CONCLUSÃO

O ensaio serviu para mostrar que os três métodos medem, de formas distintas, o fenômeno da translocação dos íons fósforo e cálcio em feijão, apresentando resultados semelhantes. Todos eles, entretanto, refletem medidas macroscópicas da translocação citada, não servindo para estudo em nível celular. Nesse sentido, a adubação foliar do fósforo pode ser indicada pela grande mobilidade desse elemento, ao contrário do cálcio. Quanto à técnica da autorradiografia e do uso do tubo contador GM, os mesmos mostraram-se bons localizadores dos elementos absorvidos na planta, porém a autorradiografia permitiu resultados apenas qualitativos. Enquanto isso, a cintilação líquida mostrou resultados quantitativos bem marcantes da mobilidade do fósforo e imobilidade do cálcio quando se analisaram amostras da solução nutritiva.

LITERATURA CITADA

- BOARETTO, A.E.; MURAOKA, T. e ROSA, J.P.P. Absorção foliar de fósforo pelo feijoeiro: Efeito de fontes, doses de uréia e sacarose. In: "Seminário Regional sobre Técnicas Nucleares na Produção de Plantas Agrícolas", Piracicaba-SP, 1984. *Anais*.
- BOARETTO, A.E.; MURAOKA, T.; CRUZ, A.P. e DAGHLIAN, C. Absorção de fósforo e enxôfre pelas folhas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Turrialba*, 36(1): 107-117, 1985.
- MALAVOLTA, E. Nutrição Mineral; In: *Fisiologia Vegetal 1*, EDUSP, pag. 97-113, 1979.

QUADRO I - Valores obtidos para medidas de radiação nas soluções nutritivas, através de cintilação líquida.

Elemento Radioativo	Contagem Total		Tempo de Contagem		Taxa Líquida de Contagem (RL)
	Solução c/ cintilador	Água destilada com cintilador	t _B	t _F	
³² P	1.702	240	20	10	61,1 ± 2,6
⁴⁵ Ca	1.029	492	20	10	2,27 ± 2,75

QUADRO II - Valores obtidos para medidas de radiação nas diversas partes da planta através de um tubo contador GM.

^{45}Ca		
PARTE DA PLANTA	cpm	dpm
Folíolo 1	112	2.240
Folíolo 2	209.097	4.181.940
Folhas	205	4.100
Raiz	79	1.580

^{32}P		
PARTE DA PLANTA	cpm	dpm
Folíolo 1	2.017	133.120
Folíolo 2	186.990	12.341.340
Folhas	9.669	638.154
Raiz	10.022	661.452

QUADRO III - Tempo de exposição das chapas fotográficas à cada parte da planta na técnica da autorradiografia.

Parte da planta com ^{45}Ca	Tempo de exposição
Folíolo 1	19,2 dias
Folíolo 2	3,0 dias
Folhas	11,0 dias
Raiz	35,0 dias
Parte da planta com ^{32}P	Tempo de exposição
Folíolo 1	12,6 horas
Folíolo 2	7,5 minutos
Folhas	2,5 horas
Raiz	2,5 horas