

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Sensores multiespectrais para detecção dos efeitos da radiação gama
na qualidade de sementes de soja**

Nielsen Moreira Oliveira

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2021**

Nielsen Moreira Oliveira
Engenheira Agrônoma

Sensores multiespectrais para detecção dos efeitos da radiação gama na qualidade de sementes de soja

Orientador:
Prof^a. Dra. **CLÍSSIA BARBOZA DA SILVA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Oliveira, Nielsen Moreira

Sensores multiespectrais para detecção dos efeitos da radiação gama na qualidade de sementes de soja / Nielsen Moreira Oliveira - Piracicaba, 2021.

71 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Cobalto⁶⁰ 2. SeedReporter 3. Videometerlab 4. Desempenho de plântulas I. Título

DEDICATÓRIA

À minha família que é o meu bem mais precioso nessa vida.

A vocês eu dedico meu trabalho de mestrado que sempre estiveram comigo nessa jornada e por sempre terem segurado a minha mão.

Minha mamãe, *Maria Inês Moreira (in memorian)*;

Meu pai, *Jose Divino*;

Minhas irmãs *Nayele Moreira Oliveira e Viniele Moreira Oliveira*;

Meu noivo, *Rafael Henrique Mendes*.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pela oportunidade de estar aqui neste momento com saúde. Obrigada meu pai pelo amor mais puro e verdadeiro e por me guiar pelos melhores caminhos; por ser meu ponto de paz, meu porto seguro;

Agradeço imensamente à minha amada mãe, Maria Inês Moreira (*in memorian*), pelo amor incondicional e dedicação por mim e pela nossa família. Por ter feito o que podia e o que não podia para que não desistisse dos meus sonhos; por ter me colocado em primeiro lugar várias vezes e por nunca esperar nada em troca, a não ser a minha felicidade. Obrigada por incentivar meus estudos e sempre confiar em mim; por ter sonhado junto comigo; pelos conselhos valiosos que sempre me acalmaram nas turbulências. Você foi e sempre será meu exemplo de ser humano nessa vida. Obrigada por me lapidar e ter me tornado a sua pedrinha preciosa. Obrigada pelos momentos tão prazerosos ao seu lado. Foi uma honra ter sido a sua filha e todas as minhas conquistas eu devo a você. Obrigada por ser a minha mãe.

Ao meu pai, Jose Divino por todo amor e dedicação, e que mesmo de longe, sempre acreditou em mim e nos meus estudos;

Às minhas irmãs pelo amor, companheirismo, por todos nossos momentos de alegrias. Vocês são a luz da minha vida;

Obrigada Adelle e Noah, meus sobrinhos, que encanta meus dias e me enche de alegria;

Ao meu melhor amigo, noivo e futuro marido, Rafael Henrique. Obrigada por todo cuidado e carinho comigo desde o primeiro momento que nos encontramos. Obrigada pelos conselhos, por me ouvir nos momentos de aflição, por entender a minha ausência e incentivar a minha entrada na Pós-graduação. Obrigada meu rafa, pelos momentos tão preciosos e por nunca medir esforços para me ver feliz;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Esalq e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Cena, e à Universidade de São Paulo – USP como um todo, pela oportunidade de realizar meu mestrado nesse local tão especial, com profissionais dedicados e sempre dispostos a ajudar;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela concessão da bolsa de estudos, permitindo a minha permanência na cidade de Piracicaba – SP;

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp, pela concessão dos equipamentos de análise de imagem, SeedReporter e VideoMeterLab e todos os outros

insumos utilizados a partir do Projeto Jovem Pesquisador conduzido pela Prof. Dr^a Clíssia Barboza da Silva;

À minha orientadora Prof.^a Dr^a Clíssia Barboza da Silva por toda experiência compartilhada e por ter ensinado com tanto amor e paciência. Pelo apoio acadêmico e pessoal, pela atenção e compreensão a mim dedicada. Obrigada por ter direcionado as nossas pesquisas pelos melhores caminhos;

Aos profissionais Adilson, Helena, João, Hodair e Davi do Departamento de Produção Vegetal da Esalq, e Cristina do Laboratório de Radiobiologia e Ambiente do Cena, por sempre estarem disponíveis para me ajudar a desenvolver meu trabalho;

Obrigada a todos os professores da Pós-graduação da Esalq, por terem sido tão profissionais e terem contribuído para minha formação;

Ao professor Valter Arthur por ter disponibilizado o Laboratório de Radiobiologia e Ambiente do Cena, tendo possibilitado a execução do meu trabalho;

Obrigada professor Thiago Mastrangelo pela eficiência, apoio e disponibilidade para irradiar as sementes;

Às empresas Lagoa Bonita e Sementes Analyce por cederem os lotes de sementes de soja no qual foram essenciais para o meu trabalho;

Às minhas parceiras de laboratório Érica, Anna, Júlia, Catharina e Patrícia pela amizade que tornaram meus dias mais leves;

Agradeço meus amigos do apartamento 174, Camila, Walleska, Igor e Mari que foram tão maravilhosos comigo. Obrigada por todas as conversas jogadas fora, pelas noites de descontração, pelos almoços e jantas comunitárias. Vocês, no momento que mais precisei, não hesitaram em me estender a mão. Nunca me esquecerei disso.

A todos os professores que passaram na minha vida. Toda a minha gratidão aos que contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal. Em especial, agradeço a Prof. Dr^a. Denise Garcia de Santana, por ter acreditado no meu potencial e por ter introduzido a vida de pesquisa com sementes. Obrigada pelos puxões de orelha e por ter sido a minha mãe acadêmica.

A todos os professores do Instituto Federal do Triângulo Mineiro, Campus Uberlândia, no qual tenho tanto orgulho de ter me formado Agrônoma e por ter me preparado para exercer essa profissão tão nobre;

À cidade de Piracicaba pela hospitalidade, pelos bons momentos vividos e por cada pessoa que conheci na cidade. Obrigada Pira, por ter me acolhido tão bem;

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação no mestrado em uma das melhores Universidades de ciências Agrárias do mundo!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Aspectos gerais da cultura da soja	13
2.2. Tratamentos físicos baseados em radiação gama.....	13
2.3. Sensores multiespectrais para detecção dos efeitos da radiação gama em sementes....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Sementes utilizadas	19
3.2. Caracterização inicial das sementes	19
3.2.1. Testes de germinação	19
3.2.2. Testes de vigor	20
3.2.3. Conteúdo de proteína e gordura bruta.....	20
3.2.4. Pigmentos em plântulas, fluorescência de clorofila e eficiência quântica do fotossistema II	22
3.3. Tratamentos de sementes com raios gama	23
3.3.1. Doses	23
3.3.2. Conteúdo de proteína e gordura bruta de sementes irradiadas.....	23
3.3.3. Análise de imagens multiespectrais de sementes irradiadas	24
3.3.4. Pigmentos, fluorescência de clorofila e eficiência quântica do fotossistema II de plântulas provenientes de sementes irradiadas.....	25
3.4. Procedimento estatístico	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Obtenção de classes de sementes de baixo e alto vigor	27
4.1.1. Germinação e vigor.....	27
4.1.2. Proteína e gordura bruta.....	29
4.1.3. Pigmentos e eficiência quântica máxima do fotossistema II em plântulas	29
4.2. Efeito da radiação gama no conteúdo de proteína e gordura bruta de sementes de baixo e alto vigor	31
4.3. Efeito da radiação gama sobre os padrões de refletância e autofluorescência em imagens multiespectrais de sementes de baixo e alto vigor	33

4.4. Tratamentos de sementes com raios gama e influência na síntese e atividade de pigmentos de plântulas detectada por tecnologias de imagens multiespectrais	41
5. DISCUSSÃO	49
5.1. Vigor inicial e efeito do tratamento de sementes com radiação gama	49
5.2. Efeito hormético de raios gama em sementes e plântulas	52
5.3. Respostas de diferentes cultivares aos efeitos da radiação gama	53
5.4. Relação da dose de radiação gama aplicada nas sementes com a síntese e atividade de pigmentos em plântulas	54
6. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	59

RESUMO

Sensores multiespectrais para detecção dos efeitos da radiação gama na qualidade de sementes de soja

O uso de métodos físicos para o tratamento de sementes, como a tecnologia de radiação gama, tem contribuído para a melhoria do desempenho de culturas agrícolas. Baixas doses de radiação podem exercer efeito estimulante em sistemas biológicos, conhecido como hormese, com melhorias na resposta adaptativa a desafios mais severos. Deste modo, existe a busca cada vez maior por métodos precisos para o diagnóstico em tempo real do efeito da radiação ionizante em sementes. O presente trabalho teve como objetivo o uso de sensores ópticos multiespectrais para detecção rápida dos efeitos de diferentes doses de radiação gama no desempenho de sementes de soja. A pesquisa foi conduzida com dois cultivares de soja (M5705 IPRO e NS7505 IPRO) representados por classes de sementes de baixo e alto vigor, irradiadas nas doses de 0, 12, 16 e 20 Gy. Foram capturadas imagens de reflectância utilizando 19 comprimentos de onda (365 a 970 nm), e de autofluorescência utilizando 11 combinações de excitação/emissão (365/400 a 660/700 nm). Paralelamente, foi determinado o conteúdo de proteína e gordura bruta das sementes. As plântulas resultantes das sementes irradiadas foram avaliadas quanto a parâmetros de fluorescência de clorofila *a*, eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m), além do índice de antocianinas e de clorofila *a*. O aumento da dose de radiação gama promoveu incremento no conteúdo de proteína bruta de sementes de baixo e alto vigor, mas para a gordura bruta a resposta foi dependente do vigor da semente e genótipo testado. As mudanças nos padrões espectrais das sementes irradiadas nas diferentes doses de radiação gama ocorreram particularmente em sementes de alto vigor, e revelaram maior resposta para as sementes do cultivar NS7505 IPRO. Entretanto, na classe de sementes de baixo vigor do cultivar NS7505 IPRO, todas as doses de raios gama induziram uma maior síntese de clorofila *a* nas plântulas resultantes, o que não ocorreu no cultivar M5705 IPRO. No cultivar M5705 IPRO, os efeitos foram mais marcantes em relação à capacidade de conversão de energia química pelas plântulas na dose de 16 Gy. Portanto, os sensores multiespectrais empregados na presente pesquisa permitiram melhor compreensão da relação entre os padrões espectrais e os efeitos dos tratamentos de raios gama em sementes de soja, podendo ser utilizados como novos marcadores para a identificação rápida das melhores doses de raios gama para estimular parâmetros de crescimento das plantas.

Palavras-chave: cobalto⁶⁰, SeedReporter, Videometerlab, Desempenho de plântulas

ABSTRACT

Multispectral sensors for detecting the effects of gamma radiation on the quality of soybean seeds

The use of physical methods for seed treatment, such as gamma radiation technology, has contributed to improve the performance of agricultural crops. Low doses of gamma radiation can promote a stimulating effect on biological systems, known as hormesis, with improvements in adaptive response to more severe challenges. Therefore, there is an increasing search for accurate methods for real time diagnosis of the effect of ionizing radiation in seeds. The present study aimed to investigate the use of multispectral optical sensors for rapid detection of the effects of different doses of gamma radiation on soybean seed performance. The research was conducted with two soybean cultivars (M5705 IPRO and NS7505 IPRO) represented by classes with low and high seed vigor, which were irradiated at 0, 12, 16 and 20 Gy. Reflectance images were captured using 19 wavelengths (365 to 970 nm), and autofluorescence images were obtained using 11 excitation/emission combinations (365/400 to 660/700 nm). In addition, the protein and crude fat content of the seeds were determined. Seedlings grown from irradiated seeds were evaluated for chlorophyll *a* fluorescence, quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_M), and the anthocyanin and chlorophyll *a* index. Increasing the dose of gamma radiation promoted an increase in the crude protein content in classes of low and high vigor seeds, but for crude fat content the response was dependent on the seed vigor and genotype. Changes in the spectral patterns of seeds irradiated at different doses of gamma radiation occurred particularly in high vigor seeds, with greater response for NS7505 IPRO cultivar. However, in the seed class of low vigor from NS7505 IPRO cultivar, all doses of gamma rays induced a greater synthesis of chlorophyll *a* in the resulting seedlings, which did not occur in M5705 IPRO cultivar. For M5705 IPRO cultivar, the effects were more evident in relation to the efficiency of chemical energy conversion of seedlings at a dose of 16 Gy. Therefore, the multispectral sensors used in this research allowed a better understanding of the relationship between the spectral patterns and the effects of gamma ray treatments on soybean seeds, which can be used as new markers for rapid identification of the best gamma ray doses to stimulate plant growth parameters.

Keywords: Cobalt⁶⁰, SeedReporter, Videometerlab, Seedling performance

1. INTRODUÇÃO

No contexto da Tecnologia de sementes, o uso de métodos físicos para o tratamento de sementes, particularmente envolvendo radiação gama, tem contribuído para a melhoria do desempenho de sementes, com vantagens sobre procedimentos convencionais que requerem o uso de substâncias químicas. Os benefícios alcançados podem incluir maior acúmulo de proteínas, compostos antioxidantes, resistência a estresses, dentre outros. Os raios gama são ondas eletromagnéticas de alta energia, extremamente penetrantes, e para o tratamento das sementes, o método mais utilizado consiste na utilização de irradiadores que produzem irradiação pelo decaimento natural de radioisótopos, como o cobalto-60 (Co^{60}).

Diante de tamanha importância da soja no Brasil e no mundo, trabalhos com foco em melhorar o desempenho de plantas por meio da aplicação de métodos físicos como a aplicação de radiação gama nas sementes, podem contribuir com o avanço na cadeia produtiva não só da soja, como também de outras espécies cultivadas. Além disso, os avanços tecnológicos na agricultura alcançados nas últimas décadas em computação, robótica, eletrônica, óptica e processamento digital de imagens permitem explorar diversas tecnologias que abordam métodos não invasivos, com aferição simultânea de múltiplos componentes envolvidos na qualidade de amostras de sementes, possibilitando o diagnóstico rápido e eficaz dos efeitos de doses de tratamentos.

Os sensores multiespectrais permitem a captura de um conjunto de imagens de um mesmo objeto, cada imagem representada por um comprimento de onda específico do espectro eletromagnético, tendo como princípio a integração de informações espaciais e espectrais. A principal vantagem desta técnica é a obtenção de dados em uma ampla faixa do espectro eletromagnético, desde o ultravioleta até o infravermelho, permitindo a extração de uma série de informações relacionadas à composição química, integridade de tecidos, coloração, textura, dentre outros, sem destruir a amostra.

Considerando que a energia ionizante produzida pelos raios gama penetra tecidos das sementes e interage com átomos e moléculas, e que esses componentes celulares são capazes de absorver luz devido às suas características únicas, este trabalho teve como objetivo investigar a potencialidade de sensores ópticos robustos baseados em imagens multiespectrais para detectar os efeitos de doses de raios gama na qualidade de sementes de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da cultura da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a leguminosa de maior expressão econômica do mundo, com produção mundial de aproximadamente 360 milhões de toneladas de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2020), exercendo grande importância política, econômica, social e cultural, por participar efetivamente da balança comercial dos principais países produtores como Brasil, Estados Unidos e Argentina e importadores como China, União Europeia e México.

No Brasil, representa um dos principais produtos agrícolas em extensão territorial e volume de produção, com aproximadamente 134,4 milhões de toneladas de grãos produzidos na safra 2020/2021, o que representa mais de 57% de toda área cultivada com grãos no Brasil (CONAB, 2020). Por ser um produto com forte liquidez, ou seja, produto rapidamente comercializado com alto valor agregado, os sojicultores têm buscado avançar para novas áreas, o que resultou em um aumento de 7,7% de produção na safra 2020/2021 em relação à safra 2019/2020 e acréscimo de aproximadamente 4,2% na produtividade (CONAB, 2020).

A soja gera empregos ao longo de toda cadeia de produção, além de possuir alto valor nutricional voltado aos índices proteicos e calóricos, capaz de abastecer toda a população mundial diante dos inúmeros produtos que são produzidos a partir do grão, óleo e farelo. A soja ainda, é a principal base da composição da maior parte das formulações de ração animal, além de ser matéria prima para produção de cosméticos, produtos de limpeza, colas, medicamentos e produção de biodiesel.

As sementes de soja são consideradas o melhor método natural para obtenção da variabilidade genética. O rendimento da cultura depende do uso de sementes de alto vigor, pois garantem o estabelecimento rápido e uniforme das plantas sob uma variedade de condições ambientais (Caverzan et al, 2018; Hao et al., 2020; Ebone et al., 2020).

2.2. Tratamentos físicos baseados em radiação gama

A técnica de tratamento de sementes com radiação gama consiste na exposição de amostras a ondas eletromagnéticas de alta energia, emitida por radioisótopos em decomposição como o cobalto-60 (Co^{60}). Nas últimas décadas, vários métodos baseados em radiação ionizante levaram a avanços significativos em diversas áreas da ciência da vida, incluindo medicina com estimulação da imunidade antitumoral (Liu, 2007) e indústria madeireira com melhorias nas propriedades mecânicas da madeira (Severiano et al., 2010). No contexto agrícola, esta técnica

tem contribuído para a melhoria do desempenho de sementes, aumento da produtividade das culturas, conservação de alimentos, dentre outros. Por exemplo, o uso de baixas doses de radiação gama é capaz de melhorar a atividade antioxidante de enzimas (Okasaki, 1995), a velocidade e uniformidade de germinação de sementes (Beyaz et al., 2016) e tolerância das plantas a estresses abióticos, como altas temperaturas (Zhang et al., 2016) e metais pesados (Wang et al., 2017). Esses benefícios estão relacionados ao fenômeno da hormese, caracterizado por um efeito estimulante em baixas doses (Agathokleous et al., 2020).

Ainda, dentre as vantagens dos métodos físicos destaca-se a maior síntese de pigmentos fotossintéticos nas plantas produzidas (Kim et al., 2004). Jan et al. (2013) ao estudarem os efeitos da radiação gama em plantas de *Cullen corylifolium* obtidas de sementes irradiadas, verificaram um aumento de 66% no conteúdo de clorofila total, culminando com um aumento na atividade fotossintética das plantas. Em trigo, plântulas provenientes de sementes irradiadas tiveram um incremento de 65% no teor de clorofila total (Borzouei et al., 2010).

Singh et al. (2013) utilizando baixas doses de radiação gama, também verificaram aumento de trocas gasosas em plântulas de trigo originadas de sementes irradiadas, e houve maior captação e absorção de nutrientes minerais, como potássio, fósforo e magnésio. Ainda, esses autores verificaram que os tratamentos com radiação gama tiveram um aumento de aproximadamente 22% na produtividade final. A irradiação de sementes com ^{60}Co reduziu fungos patogênicos em sementes de arroz (Maity et al., 2004), e Machi e Arthur (2012) observaram estímulos no crescimento de plantas de feijão de porco originadas de sementes irradiadas.

O desenvolvimento de plantas de *Brachiaria brizantha* foi favorecido quando as sementes receberam doses de radiação gama (Respati et al. 2018), com melhoria em atributos de qualidade da forrageira a partir da segunda rebrota. Além disso, a aplicação desta técnica também resultou em maiores teores de globulina e albumina em sementes de *Sesamum indicum*, contribuindo para a maior digestibilidade e solubilidade de proteínas (Hassan et al., 2018). As plantas de *Curcuma longa* apresentaram maior altura, número de folhas, raízes, massa seca de rizomas, além de aumento no rendimento de óleos essenciais após a irradiação dos rizomas das plantas com ^{60}Co (Ilyaz e Naz, 2014). Sementes de algodão irradiadas produziram plantas de maior altura e aumento de aproximadamente 25% na produtividade final (Araújo et al., 2018). Aumentos na produtividade também ocorreu para *Vigna unguiculata* (Fontes et al., 2013).

O fenômeno da radiação iniciou-se com a descoberta dos raios X por Wilhelm Röntgen em 1895, depois Henri Becquerel em 1896 desvendou a radioatividade (Watson, 1945). No ano de 1898, Marie e Pierre Curie descobriram dois elementos que emitiam a radiação: o Rádio

(Ra⁸⁸) e o Polônio (Po⁸⁴), consagrando a radioatividade e seus benefícios para a humanidade (Attix, 1986).

Para entender sobre os princípios da radiação e suas aplicabilidades, torna-se necessário abordar sobre a unidade formadora das moléculas, o átomo. O átomo é composto por três estruturas básicas: os nêutrons que não possuem carga, os prótons positivamente carregados e os elétrons que são carregados negativamente (Fano, 1951). As cargas negativas dos elétrons localizados na periferia do átomo, anulam as cargas positivas dos prótons localizados no núcleo, tornando-o neutro. As interações realizadas entre dois ou mais átomos permitem a formação de novas moléculas em razão da perda ou ganho de elétrons. Quando um átomo é atingido por partículas ou ondas eletromagnéticas, a probabilidade de atingir o núcleo e os elétrons na periferia do átomo é grande. Essa colisão pode tornar o átomo instável e liberar vários tipos de radiação, a depender da energia gerada nesse processo (Fano, 1951).

A radiação consiste na propagação de energia liberada na forma de ondas eletromagnéticas ou partículas emitidas pela instabilidade atômica por meios naturais ou artificiais. As radiações eletromagnéticas possuem vibrações simultâneas dos campos magnéticos e elétricos que se propagam e dissipam em todas as direções do espaço a uma velocidade de 300.000 km/s independente da energia emitida, já a radiação na forma de partículas possui massa, carga elétrica e magnética e a velocidade depende do valor da energia emitida (Meredith e Massey, 1968).

Basicamente, existem dois tipos de radiação: as não-ionizantes e as ionizantes. Se a energia liberada no processo de colisão com o átomo foi menor que a energia de ligação do átomo, esse processo pode ser considerado radiação não-ionizante, pois não possui energia suficiente para arrancar os elétrons do átomo atingido (Attix, 1989). Os exemplos mais comuns são as ondas de rádio, transmissões de TV, redes de Wi-Fi, luz visível, radiação ultravioleta e forno micro-ondas. Por outro lado, se a colisão for altamente energizada e capaz de alterar o estado físico de um átomo, trata-se de radiação ionizante (Nouailhetas, 2005).

O fenômeno da radioatividade se baseia na existência de núcleo atômico instável, conhecido como radionuclídeo, que emite partículas como alfa (α) e beta (β) ou ondas como os raios X ou gama (γ) em busca da estabilidade. A emissão de dois prótons e dois nêutrons, é chamado de decaimento alfa e o decaimento beta é quando são emitidos elétrons. Quando o átomo não consegue se estabilizar mesmo com a emissão de partículas alfa e beta, este libera uma alta carga de energia do núcleo denominado radiação gama (Turner, 2007). Embora tenham origem no núcleo do átomo, a grande diferença entre essas radiações é o poder de penetração em superfícies físicas, por exemplo, os raios alfa são bloqueados facilmente por uma

folha de papel, os raios beta atravessam placas de chumbo em até 2 mm, já os raios gama são mais agressivos, sendo barrados apenas por estruturas de aço ou concreto de aproximadamente 15 cm de espessura (Tauhata et al., 2003). A radiação gama pode ser produzida pelo decaimento natural de radioisótopos como o Césio 137, (Cs^{137}), Co^{60} , dentre outros elementos.

A radiação ionizante pode ser benéfica ou maléfica, a depender da dose, por causar alterações em sistemas biológicos, no entanto, há diversas aplicabilidades benéficas em prol da humanidade e da agricultura, onde as doses administradas dependem do objetivo de irradiar determinada superfície. Na medicina por exemplo, a radiação gama em baixas doses pode estimular o sistema imune a promover a morte de células cancerígenas e inibir doenças relacionadas à instabilidade genômica (Liu, 2003; Scott, 2005; Liu, 2007). Os raios gama também são empregados em situações em que se busca alto nível de esterilização de materiais farmacêuticos e cirúrgicos como seringas, bisturis, bolsas de sangue, luvas, curativos, máscaras articulações artificiais e enxertos de tecido humano (Martin, Duncan, 2013; Singh et al., 2016; Kumar et al., 2020). A engenharia civil utiliza a radiação gama como método de inspeção para cabos de aços de pontes suspensas, visando evitar acidentes por ruptura de cabos (Peng, Wang, 2015).

Largamente utilizada nas áreas biológicas, a técnica de radiação gama também é considerada um eficiente método em procedimentos de desinfestação de artefatos de madeira, visando eliminar agentes que degradam a madeira como insetos, fungos e bactérias (Katušin-Ražem et al., 2009; Fairand, Ražem, 2010; Severiano et al., 2010). Na entomologia, é utilizada para produzir insetos estéreis visando reduzir a multiplicação de pragas urbanas e agrícolas transmissoras de doenças (Lanouette et al., 2017; Mastrangelo et al., 2017; Bond et al., 2019; Machi et al., 2019; Costa et al., 2020; De Beer et al., 2020; Ramadhani et al., 2020). Na indústria alimentícia é aplicada para aumentar a segurança alimentar e vida útil dos produtos vegetais, impedindo a proliferação de fungos e bactérias, além de atrasar a brotação de bulbos e tubérculos, e retardar o amadurecimento de frutas e legumes (Andrews et al., 1998; Lacroix e Ouattara, 2005; Perozzi, 2007).

As formas de quantificação das radiações emitidas e recebidas variam, por exemplo, quando se trata da atividade da fonte irradiadora, a unidade utilizada pelo sistema internacional é becquerel (Bq) que corresponde a uma transformação nuclear por segundo (1/s), e outra unidade pouco utilizada é o curie (Ci) equivalente a $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq. Grandezas relacionadas ao núcleo atômico e ao átomo em geral é expressa em elétron-Volt (eV) e as doses absorvidas pela superfície irradiada é o Gray (Gy) (Tauhata et al., 2003).

2.3. Sensores multiespectrais para detecção dos efeitos da radiação gama em sementes

A compreensão sobre os reais efeitos de tratamentos de radiação gama tem sido o foco de pesquisadores (Huang e Chen, 2018). Neste sentido, sensores ópticos robustos integrados com técnicas avançadas de processamento de imagens e inteligência artificial são de grande interesse na indústria agrícola, fornecendo informações úteis que não são visíveis a olho nu e possibilitando melhor entendimento da dinâmica de interação das culturas com as radiações ionizantes.

As técnicas baseadas em sensores multiespectrais permitem a avaliação simultânea de vários componentes presentes nas sementes, combinando dados de reflectância e/ou autofluorescência, com redução no tempo de análises (Li et al., 2019; Shi et al., 2020). A reflectância é a energia que não foi absorvida pelas sementes após as amostras serem iluminadas, e dependerá da composição química, textura e cor das sementes. Enquanto isso, a autofluorescência das sementes é resultante de uma excitação e os dados fornecem informações valiosas sobre o vigor das sementes com base em compostos químicos fluorescentes – denominados de fluoróforos - com papéis importantes no potencial fisiológico das sementes, como por exemplo as clorofilas e os carotenoides (Sullivan e Deng , 2003; Howitt e Pogson, 2006; Smolikova et al., 2011; Goggin e Steadman, 2012; Smolikova e Medvedev, 2015; Zaghdoudi et al., 2017; Grulichová et al., 2018; Jones, 2018; Donaldson, 2020). Esses compostos fluorescentes são excitados pela luz ultravioleta e visível, e à medida em que a luz é reemitida na forma de fluorescência, os fluoróforos relaxam para níveis de energia mais baixos, e um chip de dispositivo de carga acoplada (chip CCD) combinado com diferentes filtros em comprimentos de onda mais longos detectam a fluorescência.

Os sensores multiespectrais são capazes de capturar um conjunto de imagens de um mesmo objeto, cada imagem representada por um comprimento de onda específico, tendo como princípio a integração de informações espaciais e espectrais (Silva et al., 2021). A principal vantagem desta técnica é a obtenção de dados em uma ampla faixa do espectro eletromagnético, desde o ultravioleta até o infravermelho, permitindo análises de caráter físico, químico e fisiológico das sementes. Enquanto a espectroscopia convencional permite apenas a análise de uma pequena porção do objeto ("análise pontual"), não fornecendo informações espaciais que são essenciais em processos de análise de sementes, as imagens multiespectrais combinam informações espaciais e espectrais em um único protocolo de medição, fornecendo dados de toda a amostra e gerando resultados precisos até mesmo de amostras heterogêneas.

Vale destacar, ainda, que ao contrário dos sistemas de imagens tradicionais, os sensores mais recentes contam com sistemas de iluminação baseados em diodos emissores de luz (LEDs) com maior estabilidade, capazes de produzir várias imagens de reflectância e autofluorescência de alta resolução de toda a amostra em alta velocidade. Esses sistemas possuem tecnologia de calibração avançada, fornecendo alta homogeneidade e reprodutibilidade para discriminação de padrões de um objeto. Além disso, os modernos recursos de processamento de imagens permitem a extração automática de multiparâmetros de uma única imagem ou de um conjunto de imagens monocromáticas, proporcionando uma determinação rápida e precisa de alterações químicas das sementes (Galletti et al., 2020).

O desempenho de análises multiespectrais pode ser ainda otimizado utilizando os recentes modelos de transformação estatística, como o algoritmo de análise de discriminação canônica normalizada (nCDA) que transforma imagens de tons de cinza em mapas de cores variando entre vermelho-verde-azul (Bianchini et al., 2021), dependendo da intensidade de reflectância ou de autofluorescência. Portanto, essas ferramentas podem efetivamente fornecer um melhor entendimento da dinâmica de interação das culturas com as radiações ionizantes, que são impossíveis de serem detectadas pelos métodos visuais tradicionais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Sementes utilizadas

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq) e no Laboratório de Radiobiologia e Ambiente da Divisão de Produtividade Agroindustrial e Alimentos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Cena), ambos da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP. Foram utilizadas sementes de soja dos cultivares M5705 IPRO e NS7505 IPRO. As sementes do cultivar M5705 IPRO foram colhidas em março de 2019 em Arapotí, PR, Brasil, enquanto as sementes do cultivar NS7505 IPRO foram colhidas em abril de 2019 em Araguari, MG, Brasil.

Durante todo o período experimental, as sementes foram mantidas acondicionadas em embalagens de papel Kraft e mantidas a 10 °C e 40% de umidade relativa do ar (UR). O teor de água inicial das sementes foi determinado antes de cada teste, o qual variou entre 7,8 e 8,2% para as sementes do cultivar M5705 IPRO, e entre 7,7 e 8,1% para as sementes do cultivar NS7505 IPRO. Para a determinação do teor de água, foi utilizado o método da estufa a 105 °C \pm 3 °C, por 24 h (Brasil, 2009), com duas subamostras de 50 sementes.

Para obtenção de classes de sementes de baixo e alto vigor, as sementes de cada cultivar foram artificialmente envelhecidas por 0, 12, 24 e 48 h. Para o envelhecimento, as sementes foram distribuídas em camada única sobre tela de aço inox suspensa no interior de uma caixa de plástico transparente (11,0 cm \times 11,0 cm \times 3,5 cm) contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram cobertas com tampa e mantidas a 42 °C e 98 \pm 2% de UR. Posteriormente, as sementes foram submetidas à secagem a 20 °C por 24 h, para que alcançassem o teor de água inicial.

3.2. Caracterização inicial das sementes

3.2.1. Testes de germinação

Previamente ao teste de germinação, as sementes foram condicionadas para evitar danos por embebição, uma vez que as sementes de soja no estado seco são altamente suscetíveis, particularmente com teores de água abaixo de 11% (Simon e Harum, 1972). Para isto, as sementes foram distribuídas sobre tela de aço inox suspensa no interior de uma caixa de plástico transparente (11,0 cm \times 11,0 cm \times 3,5 cm) contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram cobertas com tampa e mantidas a 25 °C por 16 h. Posteriormente, quatro repetições de 50

sementes foram distribuídas em folhas de papel umedecidas com água destilada (proporção de 1: 2,5, g: mL), enroladas e mantidas a 25 °C com fotoperíodo de 8 h. A porcentagem de sementes germinadas foi baseada no número de plântulas normais no 5º (primeira contagem) e 8º dia após a semeadura (Brasil, 2009).

3.2.2. Testes de vigor

Os testes de vigor foram conduzidos com quatro repetições de 50 sementes com base na (i) germinação das sementes após o envelhecimento acelerado com solução saturada de sal (EASS), (ii) germinação após o envelhecimento acelerado tradicional (EA), (iii) condutividade elétrica, (iv) emergência de plântulas e (v) índice de velocidade de emergência (IVE). Nos testes de envelhecimento, as sementes foram distribuídas em camada única sobre tela de aço inox suspensa no interior de uma caixa de plástico transparente (11,0 cm × 11,0 cm × 3,5 cm) contendo 40 mL de água destilada (EA) (Dutra e Vieira, 2004) ou 40 mL de solução saturada de NaCl (40 g de NaCl em 100 mL de água destilada) (EASS) (Jianhua e McDonald, 1996). As caixas com tampa foram mantidas a 42 °C e 76 ± 2% UR de umidade relativa (EA) ou 98 ± 2% UR (EASS) por 72 h. Em seguida, foi conduzido o teste de germinação, e aos cinco dias após a semeadura, foi determinada a porcentagem de plântulas normais.

No teste de condutividade elétrica, cada repetição contendo 50 sementes foi pesada (0,001 g) e colocada em copo de plástico (200 mL) contendo 75 mL de água destilada (Hampton e Tekrony, 1995). Os recipientes foram cobertos com papel celofane e mantidos a 25 °C por 24 h. A condutividade elétrica da solução foi determinada utilizando um condutivímetro Tecnal Tec-4MP, e os resultados foram expressos em relação à massa das sementes ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$).

A emergência de plântulas foi conduzida em caixas de plástico (32,0 cm x 28,0 cm x 10,0 cm) contendo areia umedecida com 60% da capacidade de retenção de água (Brasil, 2009), em condições não controladas e a avaliação da porcentagem de plântulas emergidas foi realizada aos oito dias após a semeadura. O IVE foi calculado a partir da contagem diária do número de plântulas emergidas (Maguire, 1962).

3.2.3. Conteúdo de proteína e gordura bruta

A determinação do conteúdo de proteína (AOAC n^o.4.2.11) e gordura bruta (AOAC n^o.4.5.01) seguiu conforme metodologia empregada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC,1995). O conteúdo de proteína bruta foi determinado utilizando cinco repetições de 0,1 g de sementes trituradas. As amostras foram colocadas em tubos de Kjeldahl

e levadas para capela para a digestão completa das amostras. Foram adicionados 5 mL de solução digestora em bloco digestor, aumentando a temperatura lentamente de 50 °C até 350 °C, totalizando aproximadamente 4 h. Em seguida, foram adicionados 10 mL de água destilada em cada tubo, com posterior destilação em destilador de nitrogênio (marca: Marconi; modelo MA-036). As amostras digeridas na etapa anterior foram neutralizadas em uma dosagem de 15 mL de hidróxido de sódio, e em seguida, passaram pelo sistema de vapor da caldeira do destilador, com liberação de hidróxido de amônio. A etapa de destilação é finalizada quando o ácido bórico na quantidade de 5 mL adquire a coloração verde. Após esse procedimento, realizou-se a titulação com ácido sulfúrico 0,02 N até a coloração rosa, anotando o volume gasto. Os cálculos para obter a quantidade de proteína bruta total em cada amostra foi obtida da seguinte forma:

$$\text{Proteína bruta total} = \text{mL da titulação} \times 0,02 \times 14 \times 5,46 \text{ (fator de correção conforme Mossé,1990)}$$

Para determinação da gordura bruta, foram utilizadas quatro repetições de 1,0 g de sementes trituradas colocadas em papel de filtro dobrado, semelhante a um cartucho, de modo que encaixasse no recipiente de alumínio, componente do equipamento extrator de óleos e graxas (MARCA: Marconi; modelo MA 044/8/50). No fundo de cada cartucho de papel de filtro, sobre cada amostra, foi colocada uma pequena porção de algodão para não haver extravasamento da amostra. Em seguida, os tubos onde a gordura é depositada, foram previamente secos em estufa a 105 °C por aproximadamente 1 h, pesados e identificados. Com os tubos encaixados no extrator e a amostra imersa no solvente, a temperatura foi ajustada para 100 °C para realização de refluxo por 4 h. Após esse tempo, as amostras foram suspensas para iniciar o processo de secagem. Neste momento, a temperatura foi aumentada para 120 °C para acelerar a evaporação do solvente da amostra. Após evaporação, os tubos foram desencaixados e levados para estufa à 105 °C por 12 h até completa secagem. Após esse período, os tubos contendo o óleo extraído de cada amostra foram pesados e procedeu-se com os cálculos:

$$\text{Extrato etéreo} = ([\text{tubo} + \text{gordura}] - \text{tara do tubo}) \times 100.$$

Os resultados foram expressos em porcentagem de proteína e gordura bruta por amostra.

3.2.4. Pigmentos em plântulas, fluorescência de clorofila e eficiência quântica do fotossistema II

Quatro repetições de 40 sementes por tratamento foram semeadas em vasos de poliestireno de 500 mL de volume (32 vasos por tratamento), preenchidos com uma mistura de casca de pinus, turfa e vermiculita; para cada vaso foram semeadas cinco sementes. As plântulas foram cultivadas em condições controladas de temperatura (25 °C), UR (50-70%) e luz (LEDs de luz branca de 13 W) (County Ilum., São Paulo, Brasil) com fotoperíodo de 8/16 h (luz/escuro). A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) foi calculada utilizando um medidor Quantum PAR (Spectrum Technologies, 3415FSE, Illinois, EUA), que foi de 200 $\mu\text{mol s}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os vasos foram irrigados a cada dois dias. Quando as plântulas estavam bem estabelecidas (oito dias após a semeadura), foi realizado o desbaste mantendo somente duas plântulas por vaso, a fim de reduzir a sobreposição das folhas.

Aos 16 dias após a semeadura, foram capturadas imagens multiespectrais de 64 plântulas por tratamento com o equipamento SeedReporter™ (PhenoVation B.V., Wageningen, Holanda). Antes da aquisição das imagens, a intensidade de luz do equipamento foi ajustada para evitar sobrecarga. LEDs de luz branca de 3000 K (faixa de 450 a 780 nm) foram utilizados para iluminar as folhas, e dados de reflectância foram capturados através de quatro filtros ópticos de 540, 640, 710 e 770 nm, gerando imagens de resolução de 2.448 x 2.448 pixels (3,69 $\mu\text{m}/\text{pixel}$). O índice de clorofila *a* foi calculado a partir da reflectância de 710 e 770 nm (Gitelson et al., 2003), e o índice de antocianinas da reflectância a 540, 710 e 770 nm (Gitelson et al., 2001). Os índices de clorofila *a* e de antocianinas foram calculados no *software* SeedReporter™ versão 5.4.7, utilizando as fórmulas a seguir (em que ρ representa a reflectância obtida para cada comprimento de onda):

$$\text{Índice de clorofila } a = \left(\frac{\rho_{770}}{\rho_{710}} \right) - 1$$

$$\text{Índice de Antocianinas} = \rho_{770} * \left(\frac{1}{\rho_{540}} \right) - \left(\frac{1}{\rho_{710}} \right)$$

Utilizando tecnologia de imagens de fluorescência de clorofila, foram obtidos dados de fluorescência mínima (F_0), fluorescência máxima (F_M) e fluorescência média da clorofila *a*, seguida da determinação da eficiência quântica do fotossistema II com base na relação F_v/F_M (Murchie e Lawson, 2013). Previamente, as plântulas foram adaptadas no escuro por 30 minutos. No estado adaptado (quando todos os centros de reação do fotossistema II estavam

abertos), aplicou-se uma iluminação actínica sobre as folhas, e cerca de 20-50 μs após a iluminação a F_0 foi calculada. A aplicação de saturação de luz nas folhas adaptadas ao escuro induz uma fluorescência máxima (F_M) ao fechar os centros de reação. A diferença entre F_0 e F_M representa a fluorescência variável (F_V) calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{F_V}{F_M} = \frac{F_M - F_0}{F_M}$$

Os sinais de fluorescência de clorofila foram determinados com base na curva de indução de Kautsky (Kautsky e Hirsch, 1931). O equipamento SeedReporter™ (PhenoVation B.V., Wageningen, Holanda) foi utilizado para excitação das moléculas de clorofila *a* utilizando 36 LEDs âmbar de alta intensidade (pico de 620 nm), com intensidade de luz saturante de 6.320 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O sensor do SeedReporter™ permite a extração de informações das plântulas inteiras, em curto intervalo de tempo (≈ 800 ms), ao passo que um filtro de interferência (730 nm) transmite os sinais de fluorescência das folhas para um chip CCD. Cada pixel da imagem de fluorescência foi calculado no *software* SeedReporter™ versão 5.4.6.

3.3. Tratamentos de sementes com raios gama

3.3.1. Doses

Para os tratamentos de radiação gama, as sementes de cada cultivar foram separadas em dois grupos: 1- sementes de baixo vigor (envelhecidas artificialmente por 48 h); 2- sementes de alto vigor (não envelhecidas artificialmente). As sementes foram submetidas a doses de raios gama de 0, 12, 16 e 20 Gy, utilizando uma fonte de Co^{60} tipo Gamma beam-650® (MDS Nordion International Inc., Canadá) a uma taxa de dosagem de 1,4 Gy/min a temperatura ambiente (~ 25 °C).

3.3.2. Conteúdo de proteína e gordura bruta de sementes irradiadas

Foram adotados os mesmos procedimentos descritos no tópico 3.2.3.

3.3.3. Análise de imagens multiespectrais de sementes irradiadas

As classes de sementes irradiadas e não irradiadas (quatro repetições de 50 sementes por tratamento), provenientes de sementes de baixo e alto vigor, foram posicionadas em placas de Petri de vidro de 9,0 cm com auxílio de fita dupla face. Em seguida, foram capturadas imagens multiespectrais com o equipamento VideometerLab4™ (Videometer A/S, Herlev, Dinamarca) que permite a extração simultânea de dados de reflectância e autofluorescência das imagens das sementes. O VideometerLab4™ consiste em uma esfera com revestimento de titânio fosco para garantir que a luz seja espalhada uniformemente ao redor das sementes, utilizando 19 LEDs monocromáticos (365, 405, 430, 450, 470, 490, 515, 540, 570, 590, 630, 645, 660, 690, 780, 850, 880, 940 e 970 nm). As amostras foram colocadas sob a esfera integradora e as imagens de reflectância foram adquiridas após iluminação sucessiva das amostras com os 19 LEDs.

As imagens de autofluorescência foram obtidas utilizando LEDs com comprimentos de onda de excitação nas regiões do ultravioleta (UVA) e visível. A opção de troca de filtro do VideometerLab4™ foi selecionada para medir a autofluorescência das amostras utilizando 10 comprimentos de onda de excitação combinados com quatro filtros Long-Pass (LP), fornecendo diferentes combinações de excitação/emissão: 365/400 nm, 430/500 nm, 450/500 nm, 470/500 nm, 515/600 nm, 540/600 nm, 570/600 nm, 630/700 nm, 645/700 nm, 660/700 nm. Um chip CCD foi utilizado para detecção dos sinais de reflectância e autofluorescência das sementes.

Para melhoria na relação sinal-ruído, a intensidade de luz de cada LED foi calibrada com base em uma amostra representativa contendo sementes de soja de todos os tratamentos. O tempo estroboscópico de cada LED foi otimizado para a amostra representativa e salvo para todas as imagens subsequentes. Além disso, uma calibração radiométrica e geométrica foi realizada utilizando discos alvos padrões. As imagens multiespectrais de reflectância e autofluorescência foram adquiridas em sequência durante 1 min por meio do *software* VideometerLab4™ versão 3.14.9 (Videometer A/S, Herlev, Dinamarca), não necessitando de pré-preparação das amostras, gerando imagens de resolução de 2.192 x 2.192 pixels (40 µm/pixel). Imagens RGB também foram capturadas com o mesmo sensor, as quais estão representadas por três canais de cores (*Red-Green-Blue*) para gerar um valor de cor única em cada pixel da imagem.

A técnica de segmentação *Thresholding* foi aplicada para separar as sementes do fundo da imagem. Em seguida, as sementes (região de interesse - ROI) foram extraídas em um *Binary Large Object* (BLOB); cada BLOB consistiu na representação de uma semente. Um algoritmo

de processamento de imagem denominado de nCDA foi aplicado para discriminar as diferentes classes de sementes, o qual calcula as médias após remoção dos *outliers*.

3.3.4. Pigmentos, fluorescência de clorofila e eficiência quântica do fotossistema II de plântulas provenientes de sementes irradiadas

Foram adotados os mesmos procedimentos descritos no tópico 3.2.4

3.4. Procedimento estatístico

Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA). As análises estatísticas foram realizadas com o *software* R 4.0.0 (R Core Team, 2019), por meio do delineamento inteiramente casualizado, e a comparação de médias foi obtida utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de classes de sementes de baixo e alto vigor

4.1.1. Germinação e vigor

Para as sementes do cultivar M5705 IPRO (Figura 1), a germinação das sementes diminuiu com o aumento do tempo de envelhecimento, principalmente aos 5 dias após a semeadura. O EASS classificou as sementes em dois grupos, 0 e 12h vs 24 e 48 h, enquanto o EA separou as sementes não envelhecidas das envelhecidas. A condutividade elétrica aumentou com o aumento dos tempos de envelhecimento, separando o vigor das sementes em três classes distintas. Os demais testes de vigor (ou seja, emergência de plântulas e IVE) não foram capazes de detectar diferenças significativas entre as classes de sementes.

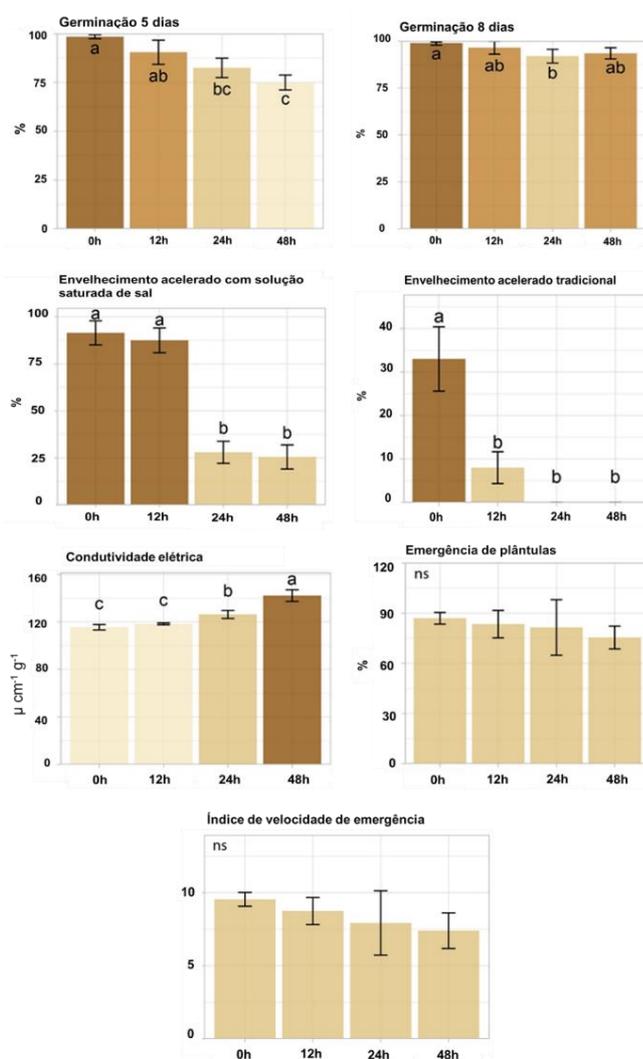


Figura 1. Testes de germinação e vigor em sementes de soja (*Glycine max* cv. M5705 IPRO) envelhecidas por 0, 12, 24 e 48 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Já na análise das sementes do cultivar NS7505 IPRO (Figura 2), verificou-se uma redução significativa na germinação das sementes envelhecidas por 48 h no 5º e 8º dia após a semeadura. Similarmente ao cultivar M5705 IPRO, no EASS a germinação reduziu apenas a partir de 24 h, enquanto no EA houve queda acentuada a partir de 12 h. Além disso, de forma semelhante ao cultivar M5705 IPRO, a integridade da membrana celular das sementes avaliada pelo teste de condutividade elétrica, foi reduzida apenas em sementes envelhecidas por 24 e 48 h. Entretanto, a emergência e o índice de velocidade de emergência de plântulas foram afetados significativamente somente com 48 h de envelhecimento.

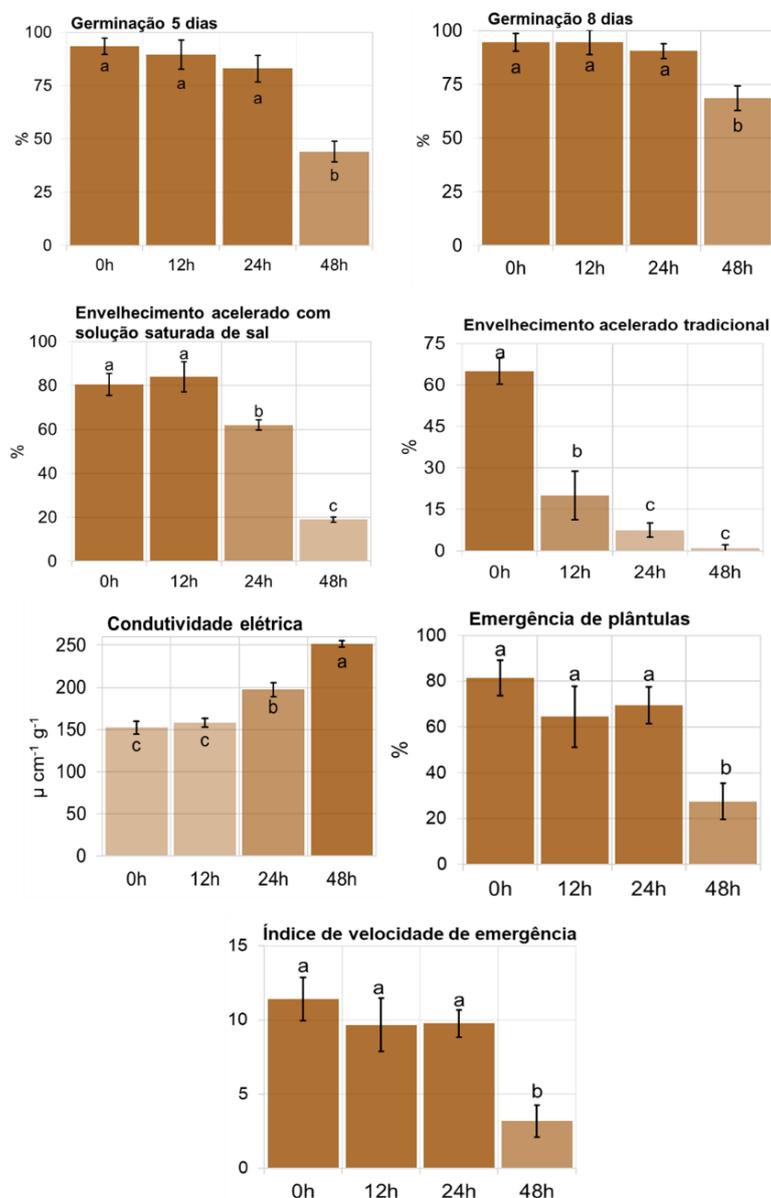


Figura 2. Testes de germinação e vigor em sementes de soja (*Glycine max* cv. NS7505 IPRO) envelhecidas por 0, 12, 24 e 48 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.1.2. Proteína e gordura bruta

As diferenças de proteína bruta não foram significativas para o cultivar M5705 IPRO (Figura 3). Entretanto, para a gordura bruta, as sementes envelhecidas por 24 e 48 h apresentaram os maiores (10,95%) e menores (8,13%) valores, respectivamente (Figura 3).

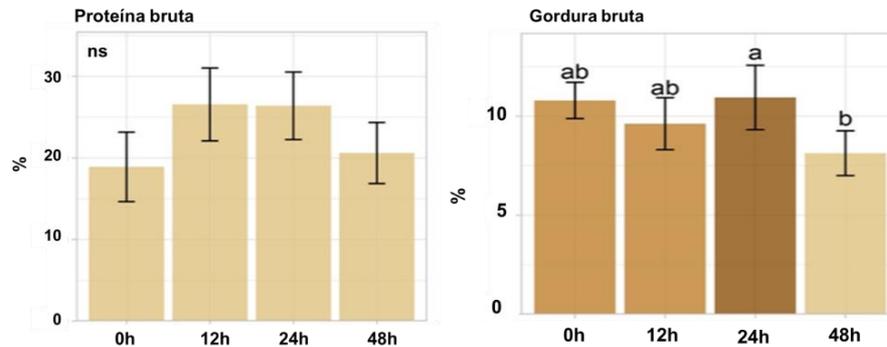


Figura 3. Teores de proteína e gordura bruta em sementes de soja (*Glycine max* cv. M5705 IPRO) envelhecidas por 0, 12, 24 e 48 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Semelhante ao que aconteceu com o cultivar M5705 IPRO, o cultivar NS7505 IPRO também não apresentou diferença estatística no teor de proteína bruta das sementes (Figura 4). Os maiores teores de gordura bruta do cultivar NS7505 IPRO foram nos tempos de envelhecimento de 12 e 48 h com 17,0 e 16,4%, respectivamente.

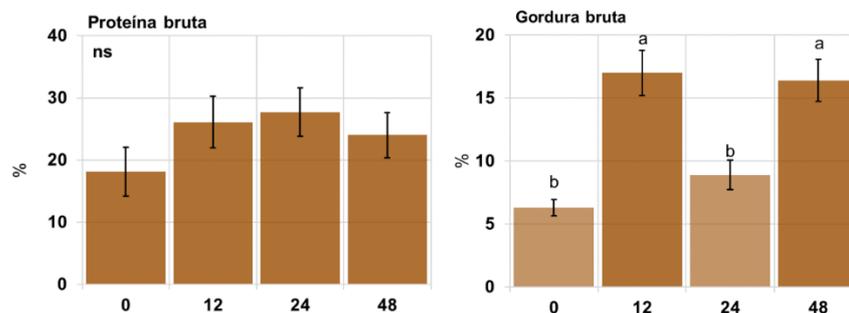


Figura 4. Teores de proteína e gordura bruta em sementes de soja (*Glycine max* cv. NS7505 IPRO) envelhecidas por 0, 12, 24 e 48 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.1.3. Pigmentos e eficiência quântica máxima do fotossistema II em plântulas

Para o cultivar M5705 IPRO, o índice de clorofila *a* apresentou um aumento significativo em sementes envelhecidas por 48 h, mas não houve diferença significativa no

índice de antocianina (Figura 5). O comportamento do F_0 e F_M foi semelhante, com valores superiores em plântulas originadas de sementes envelhecidas por 12 e 48 h. Além disso, embora as sementes envelhecidas por 48 h tenham alcançado germinação semelhante às sementes não envelhecidas no 8º dia após a semeadura em condições ótimas (Figura 1), as plântulas tiveram seu aparato fotoquímico prejudicado, conforme destacado pelos valores inferiores de F_v/F_M . A fluorescência de clorofila *a* das plântulas foi aumentada no tempo de envelhecimento de 12 h, e menores valores foram constatados em plântulas provenientes de sementes não envelhecidas.

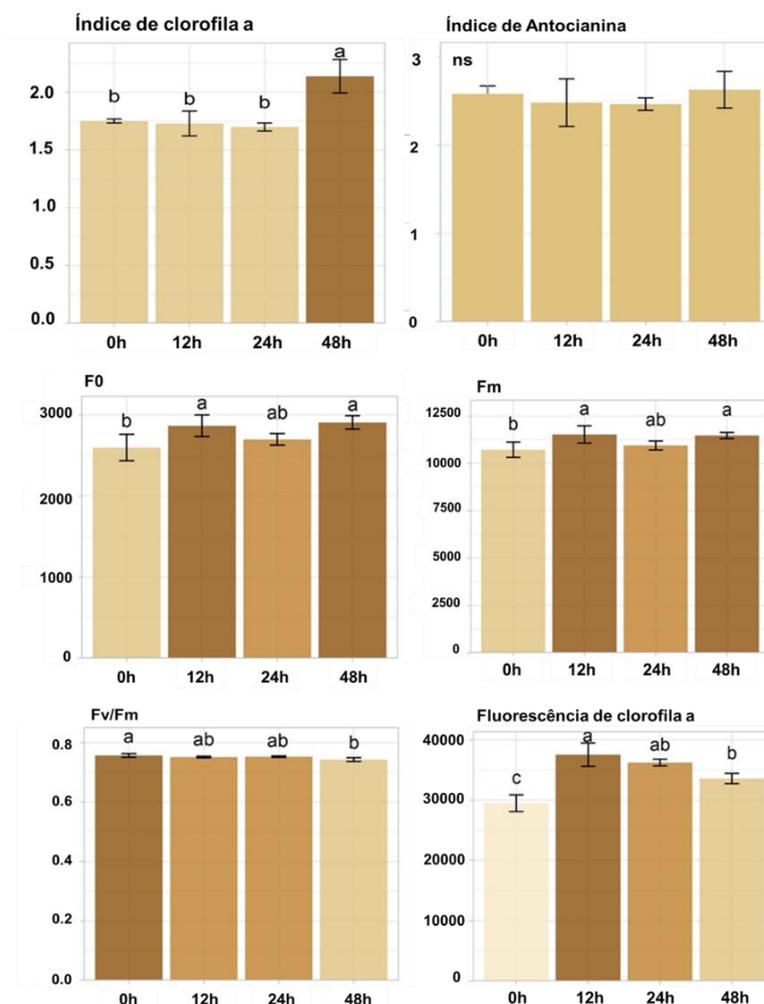


Figura 5. Índice de clorofila *a*, índice de antocianina, fluorescência inicial - F_0 , fluorescência máxima - F_M , rendimento quântico do fotossistema II - F_v/F_M e fluorescência média de clorofila *a* de plântulas de soja (*Glycine max* cv. MS5705 IPRO) originadas de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 12, 24 e 48 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

O comportamento das sementes do cultivar NS7505 IPRO foi semelhante em relação aos parâmetros de índice de clorofila *a*, índice de antocianina, F_0 , F_M e fluorescência média de

clorofila *a*, com maiores valores para as sementes envelhecidas por curto período de envelhecimento – 12 h (Figura 6). Para o índice de antocianina e F_v/F_m , inclusive, esses valores foram superiores às sementes não envelhecidas, indicando efeito hormético no curto tempo de envelhecimento. Com relação ao F_m , se destacou também o tempo de 24 h.

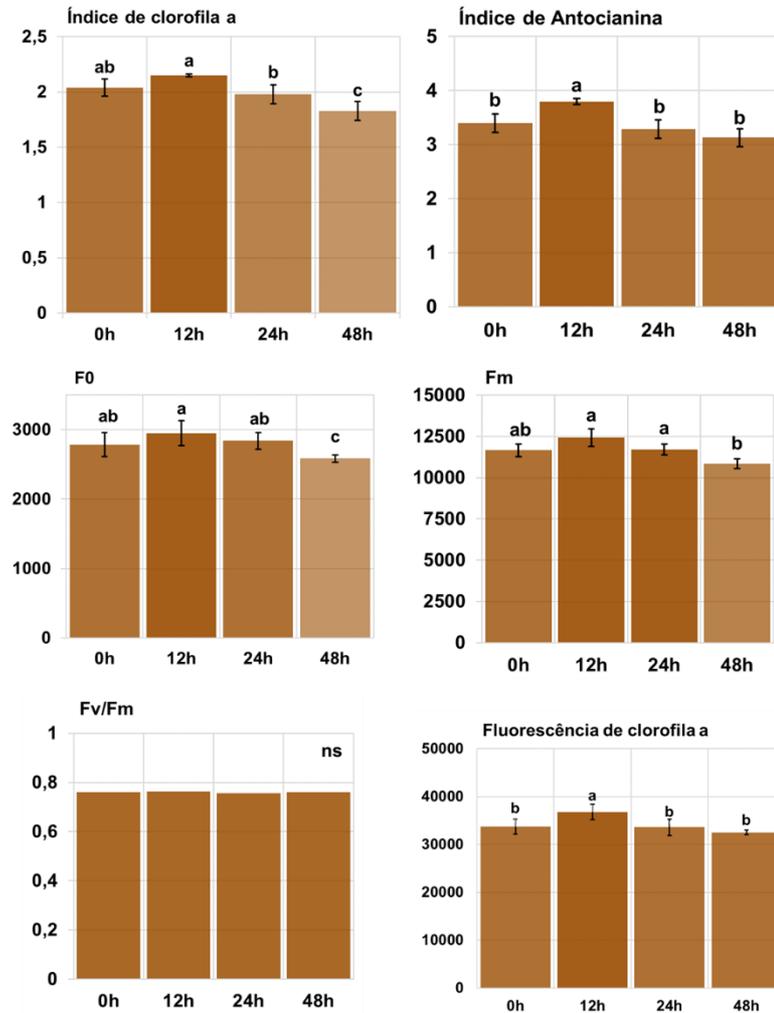


Figura 6. Índice de clorofila *a*, índice de antocianina, fluorescência inicial - F_0 , fluorescência máxima - F_m , rendimento quântico do fotossistema II - F_v/F_m e fluorescência média de clorofila *a* de plântulas de soja (*Glycine max* cv. NS75025 IPRO) originadas de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 12, 24 e 48 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.2. Efeito da radiação gama no conteúdo de proteína e gordura bruta de sementes de baixo e alto vigor

Considerando os resultados dos testes fisiológicos e bioquímicos, sementes não envelhecidas (0 h) e sementes envelhecidas por 48 h foram selecionadas para representar classes de sementes de alto e baixo vigor, respectivamente, e assim, verificar a resposta de sementes

de potenciais fisiológicos iniciais distintos aos efeitos de diferentes doses de raios gama. No cultivar M5705 IPRO, para a classe de sementes de baixo vigor (Figura 7 a), os teores de proteína bruta permaneceram semelhantes independentemente da dose de raios gama utilizada, porém, a gordura bruta foi reduzida na dose de 12 Gy, mas manteve-se similar às sementes não irradiadas à medida em que houve aumento na dose de radiação. Para a classe de sementes de alto vigor (Figura 7 b) houve um incremento no conteúdo de proteína bruta na dose de 20 Gy comparadas às sementes não envelhecidas, mas sem influência significativa sobre o teor de gordura bruta.

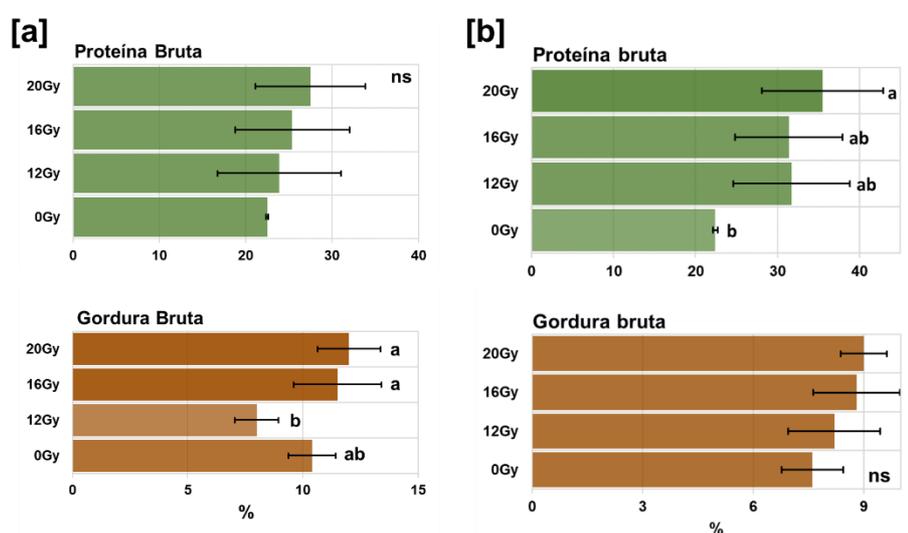


Figura 7. Resposta de sementes de soja (*Glycine max* cv. M5705 IPRO) de baixo [a] e alto [b] vigor a diferentes doses de radiação gama (0, 12, 16 e 20 Gy) para teores de proteína e gordura bruta. Médias (\pm desvio padrão) seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para o cultivar NS7505 IPRO, na classe de baixo vigor (Figura 8 a), houve incremento no teor de proteína bruta de sementes expostas à radiação já nas doses de 16 e 20 Gy, em relação às sementes não irradiadas (0 Gy). Semelhante ao cultivar M5705 IPRO, a dose de 12 Gy reduziu o conteúdo de gordura bruta das sementes de baixo vigor, mas este componente não foi afetado significativamente com o aumento da dose de radiação (Figura 8 a). Na classe de alto vigor (Figura 8 b), houve incremento no teor de proteína bruta apenas na dose de 20 Gy, com paralela redução no conteúdo de gordura bruta.

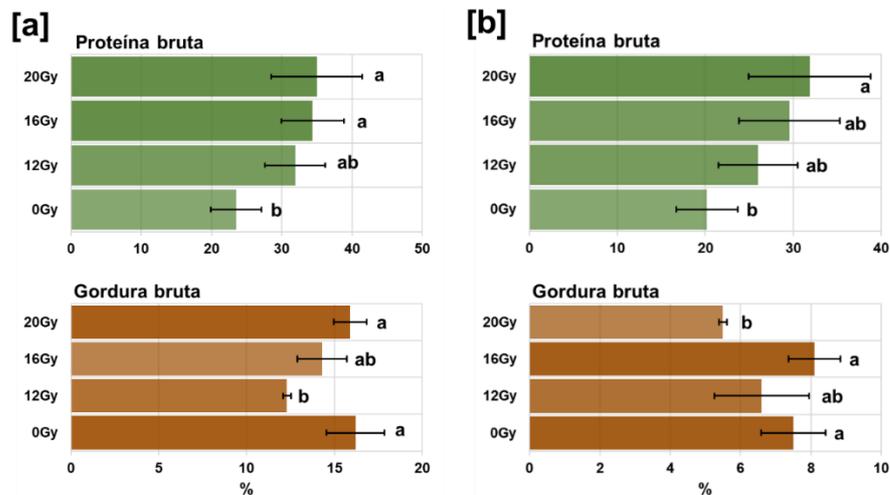


Figura 8. Resposta de sementes de soja (*Glycine max* cv. NS7505 IPRO) de baixo [a] e alto [b] vigor a diferentes doses de radiação gama (0, 12, 16 e 20 Gy) para teores de proteína e gordura bruta. Médias (\pm desvio padrão) seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.3. Efeito da radiação gama sobre os padrões de refletância e autofluorescência em imagens multiespectrais de sementes de baixo e alto vigor

O espectro de refletância das sementes de baixo vigor do cultivar M5705 IPRO (Figura 9 a) apresentou um padrão distinto apenas para a dose de 12 Gy, particularmente nos comprimentos de onda de 570 a 880 nm. Já as sementes de alto vigor foram mais responsivas às diferentes doses de radiação gama. Por exemplo, no espectro visível (570-690 nm) as sementes irradiadas na dose de 20 Gy apresentaram redução substancial nos valores de refletância, mas com valores superiores aos demais tratamentos na região do NIR (850-970 nm) (Figura 9 b).

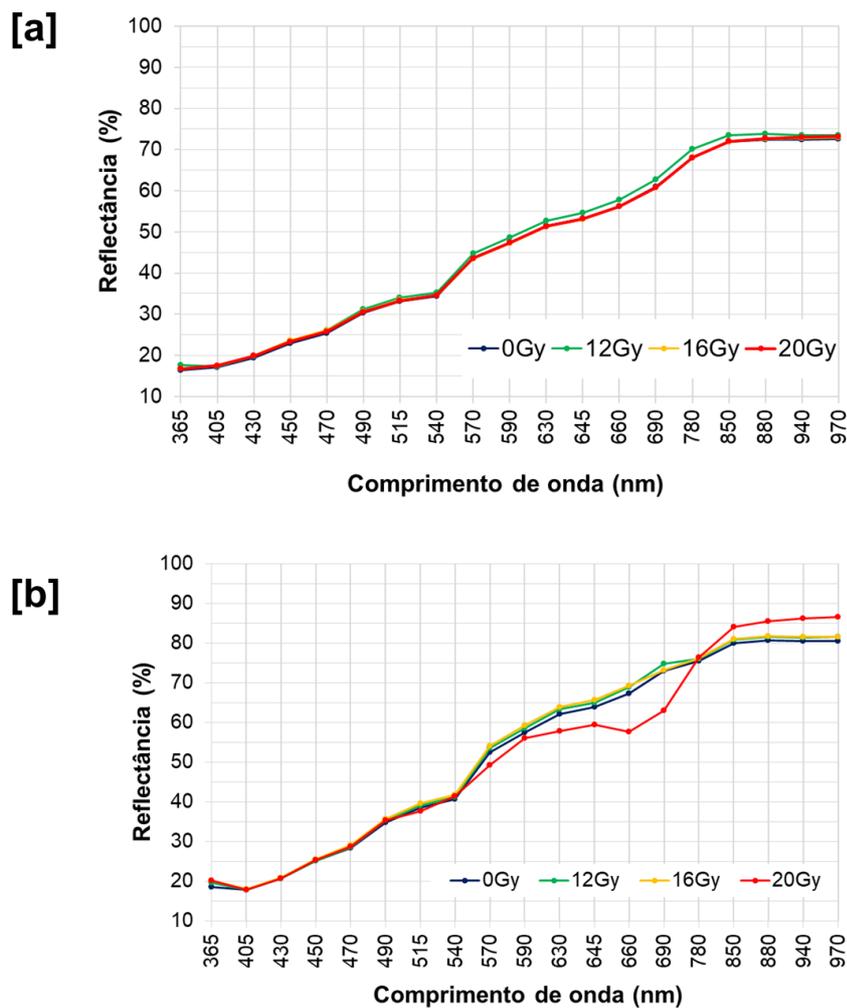


Figura 9. Médias de reflectância de sementes de soja (*Glycine max* cv. M5705 IPRO) de baixo [a] e alto [b] vigor em 19 comprimentos de onda (365 a 970 nm). $n=200$ sementes

Na avaliação da autofluorescência espectral das sementes de baixo vigor (Figura 10 a), verificou-se considerável aumento na fluorescência das sementes expostas à radiação na dose de 12 Gy, principalmente na combinação de excitação e emissão de 365/400 nm. Em contrapartida, para as sementes de alto vigor (Figura 10 b) o aumento nos sinais de autofluorescência a 365/400 nm, em especial, ocorreu tanto na dose de 12 Gy como de 20 Gy.

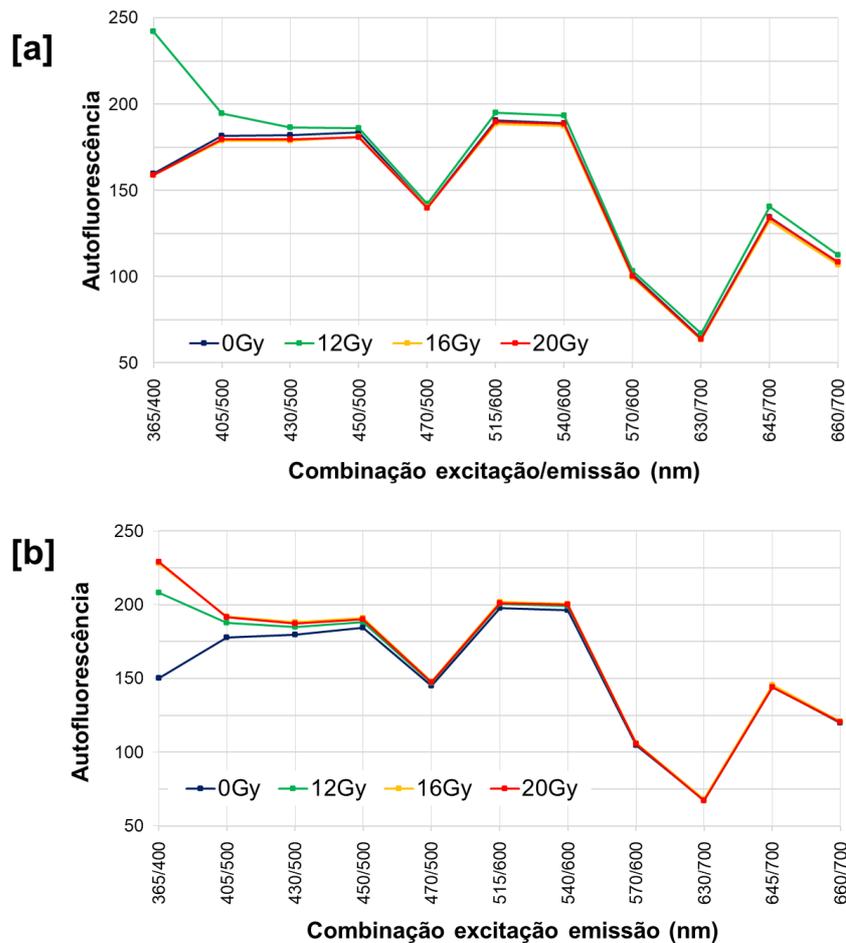


Figura 10. Médias de autofluorescência de sementes de soja (*Glycine max* cv. M5705 IPRO) de baixo [a] e alto [b] vigor para diferentes combinações de excitação/emissão (LED/filtro). $n=200$ sementes.

Para a comparação estatística das médias de reflectância e de autofluorescência das sementes submetidas às diferentes doses de raios gama, foram selecionadas as bandas de 690 nm e 365/400 nm, respectivamente. No cultivar M5705 IPRO, para as sementes de baixo vigor (Figura 11), os valores mais elevados de reflectância e autofluorescência foram obtidos para sementes expostas à radiação gama a 12 Gy (Figura 11 a,b). Na comparação dos padrões espectrais das imagens de reflectância e autofluorescência (Figura 11 c,d), observou-se que essas diferenças foram mais evidentes nas imagens de autofluorescência (Figura 11 d), embora todos os tratamentos tenham apresentado imagens RGB semelhantes. Para as imagens de autofluorescência, tanto em escalas de cinza como transformadas pelo algoritmo nCDA, detectou-se um padrão diferente em sementes expostas à irradiação gama a 12 Gy (Fig. 11 d), ou seja, essas sementes apresentaram valores de pixel maiores, que estão associados com maiores sinais de autofluorescência.

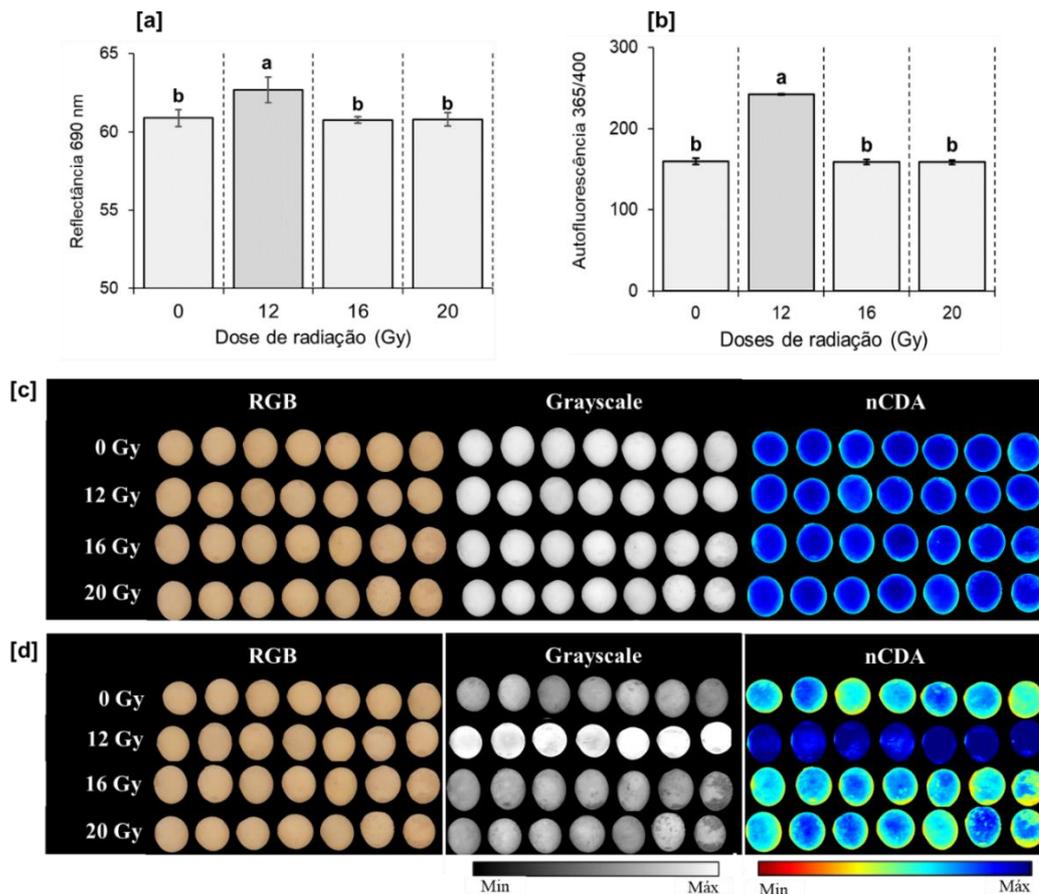


Figura 11. Resposta de sementes de soja de baixo vigor (*Glycine max* cv. M5705 IPRO) a diferentes doses de raios gama (0, 12, 16 e 20 Gy) para dados de refletância a 690 nm [a] e autofluorescência na combinação de excitação/emissão de 365/400 nm [b]; médias (\pm desvio padrão) seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Imagens RGB e de refletância a 690 nm [c] e autofluorescência a 365/400 nm [d] em níveis de cinza e transformadas pelo algoritmo nCDA, com padrões espectrais para classes de sementes não irradiadas (0 Gy) e irradiadas nas doses de 12, 16 e 20 Gy. Para imagens em níveis de cinza e transformadas pelo algoritmo nCDA, cada pixel é representado por um único valor que corresponde à intensidade de refletância ou autofluorescência. Valores de pixel mais altos indicam tecidos com maior refletância ou autofluorescência.

Com relação às sementes de alto vigor do cultivar M5705 IPRO (Figura 12), menores valores de refletância no comprimento de onda de 690 nm foi obtido na dose de 20 Gy (Figura 12 a). Com exceção da classe de sementes não irradiadas (0 Gy), as sementes apresentaram incremento nos sinais de autofluorescência para todas as doses de radiação empregadas (Figura 12 b). Na análise das imagens, não foram constatadas mudanças nos padrões espectrais das imagens de refletância (Figura 12 c), entretanto, o incremento da autofluorescência das sementes irradiadas, particularmente nas doses de 16 e 20 Gy, foram mais marcantes tanto para as imagens em níveis de cinza, quanto para as imagens transformadas pelo algoritmo nCDA (Figura 12 d).

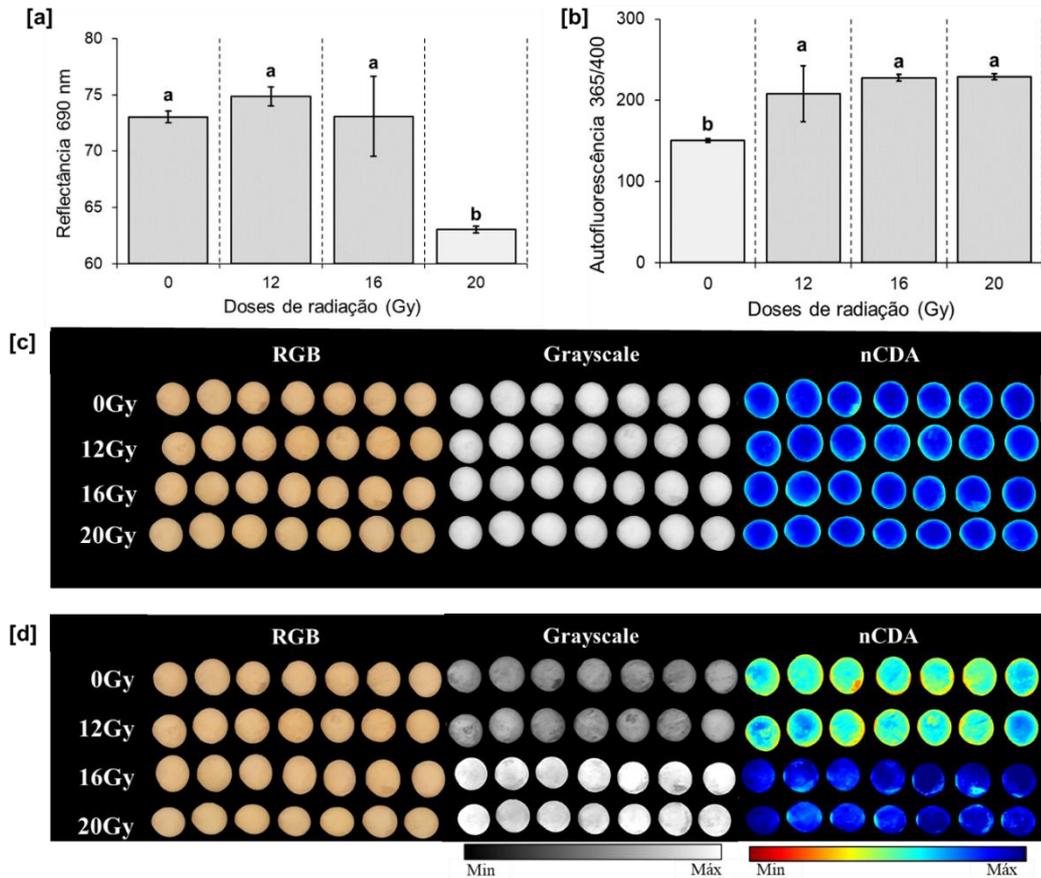


Figura 12. Resposta de sementes de soja de alto vigor (*Glycine max* cv. M5705 IPRO) a diferentes doses de raios gama (0, 12, 16 e 20 Gy) para dados de refletância a 690 nm [a] e autofluorescência na combinação de excitação/emissão de 365/400 nm [b]; médias (\pm desvio padrão) seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Imagens RGB e de refletância a 690 nm [c] e autofluorescência a 365/400 nm [d] em níveis de cinza e transformadas pelo algoritmo nCDA, com padrões espectrais para as classes de sementes não irradiadas (0 Gy) e irradiadas nas doses de 12, 16, e 20 Gy [c]. Para imagens em níveis de cinza e transformadas pelo algoritmo nCDA, cada pixel é representado por um único valor que corresponde à intensidade de refletância ou autofluorescência. Valores de pixel mais altos indicam tecidos com maior refletância ou autofluorescência.

Na análise da refletância espectral das sementes do cultivar NS7505 IPRO para a classe de baixo vigor (Figura 13 a), os resultados revelaram leve incremento para as sementes submetidas à dose 16 Gy, constatados na faixa de 570 a 690 nm. Entretanto, semelhantemente aos resultados obtidos para o cultivar M5705 IPRO (Figura 9), as sementes de alto vigor do cultivar NS7505 IPRO também apresentaram maiores mudanças nos padrões de refletância comparadas às sementes de baixo vigor (Figura 13), particularmente na faixa de 515-660 nm, e em geral, com maior redução nos sinais de refletância para a dose de 16 Gy (Figura 13 b).

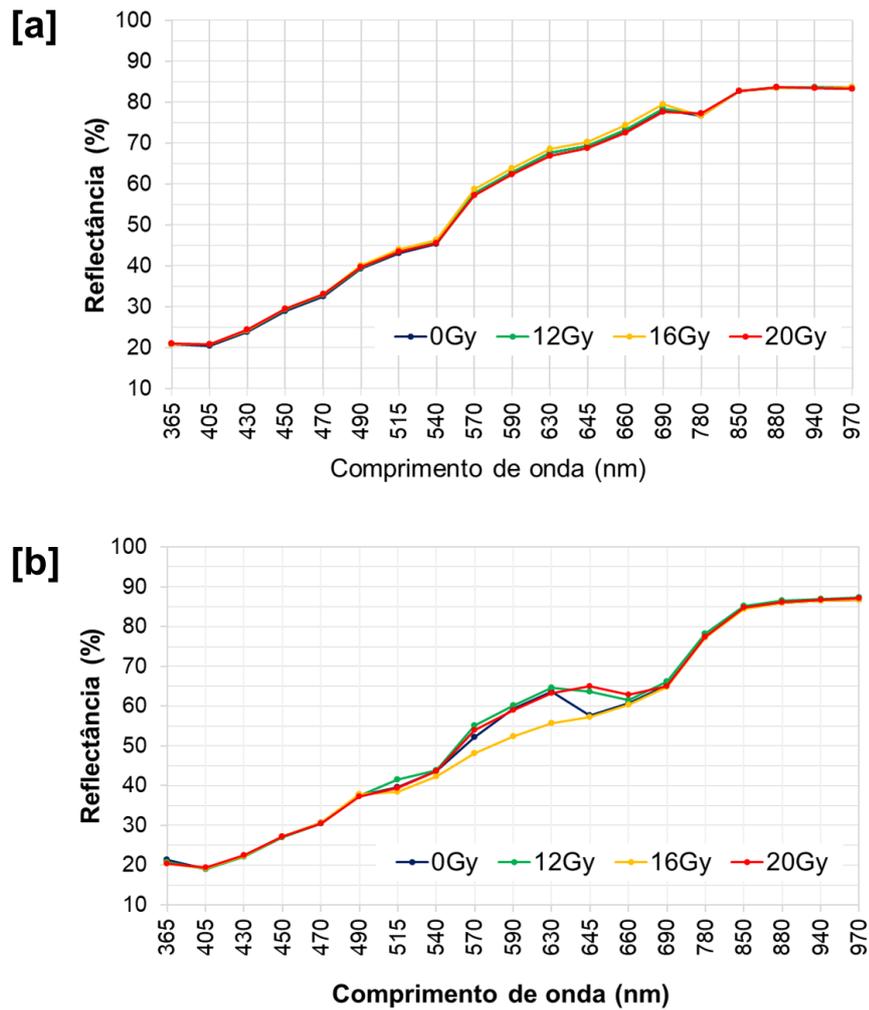


Figura 13. Médias de reflectância de sementes de soja (*Glycine max* cv. NS7505 IPRO) de baixo [a] e alto [b] vigor em 19 comprimentos de onda (365 a 970 nm). $n=200$ sementes

Para a autofluorescência espectral das sementes de baixo vigor do cultivar NS7505 IPRO (Figura 14 a), observou-se que na combinação de 365/400 nm os valores foram levemente menores nas sementes não irradiadas. Por outro lado, para as sementes de alto vigor (Figura 14 b), as classes de sementes não irradiadas e submetidas à menor dose de raios gama (12 Gy) apresentaram maior autofluorescência, com diferenças mais contrastantes empregando-se a combinação de 365/400nm.

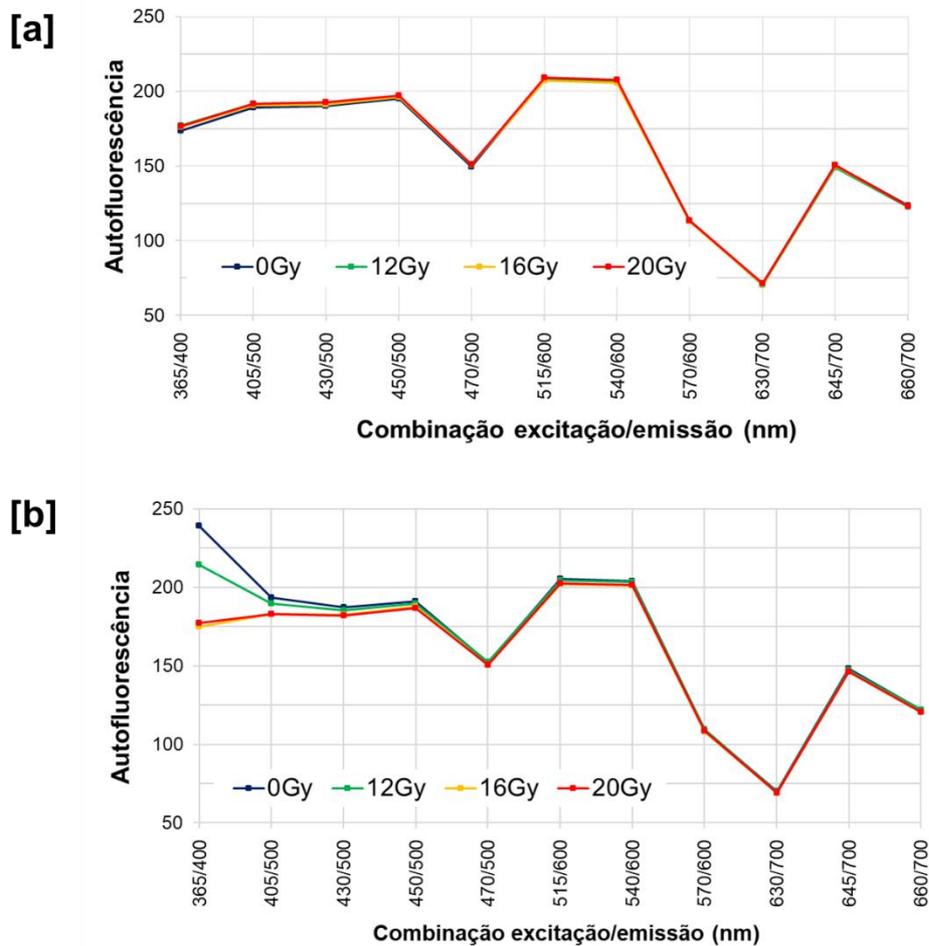


Figura 14. Médias de autofluorescência de sementes de soja (*Glycine max* cv. NS7505 IPRO) de baixo [a] e alto [b] vigor para diferentes combinações de excitação/emissão (LED/filtro). $n=200$ sementes.

As médias de reflectância e autofluorescência das sementes do cultivar NS7505 IPRO para as bandas de 690 nm e 365/400 nm, respectivamente, não foram estatisticamente diferentes entre as doses de radiação estudadas, tanto para sementes de baixo vigor (Figura 15 a,b) quanto para as sementes de alto vigor (Figura 16 a,b). Também não foram observadas diferenças nos padrões de reflectância e autofluorescência nas imagens em escalas de cinza e transformadas pelo algoritmo nCDA para as sementes de baixo vigor (Figura 15 c,d). Já os padrões espectrais das imagens das sementes de alto vigor revelaram menores sinais de autofluorescência para a dose de 16 Gy (Figura 16 d).

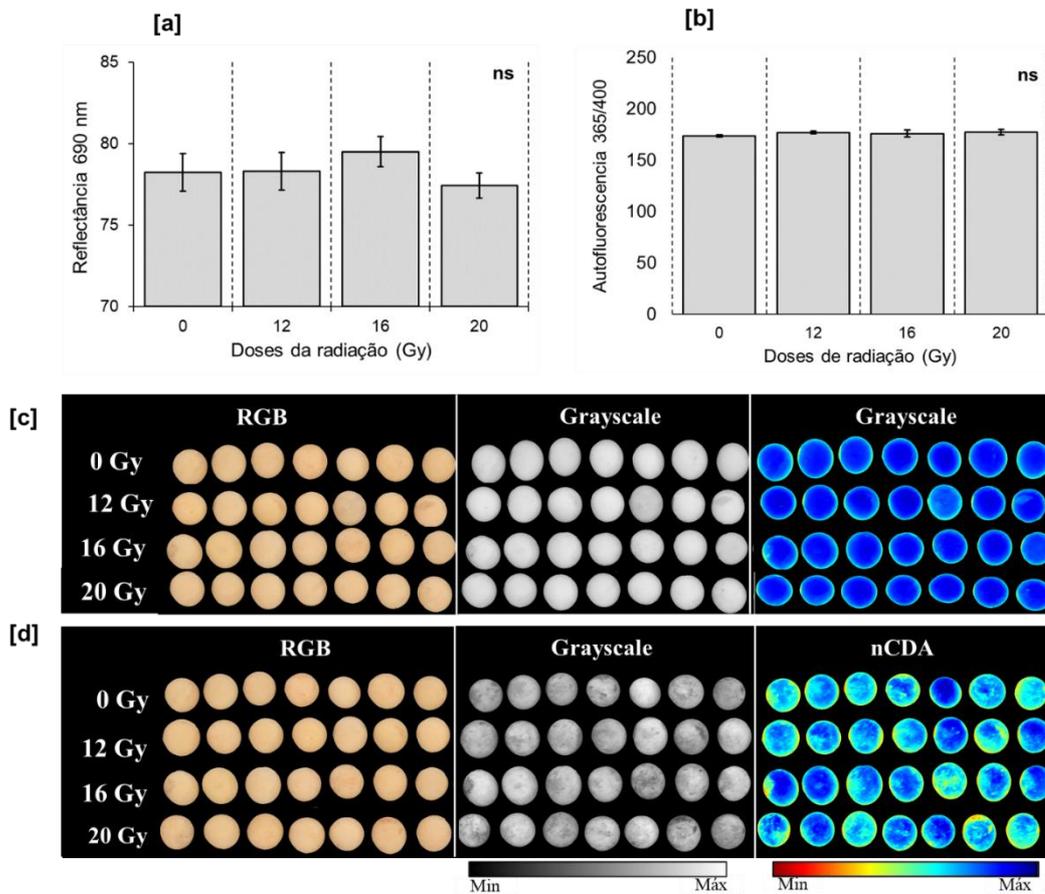


Figura 15. Resposta de sementes de soja de baixo vigor (*Glycine max* cv. NS7505 IPRO) a diferentes doses de raios gama (0, 12, 16 e 20 Gy) para dados de refletância a 690 nm [a] e autofluorescência na combinação de excitação/emissão de 365/400 nm [b]; médias (\pm desvio padrão) seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Imagens RGB e de refletância a 690 nm [c] e autofluorescência a 365/400 nm [d] em níveis de cinza e transformadas pelo algoritmo nCDA, com padrões espectrais para as classes de sementes não irradiadas (0 Gy) e irradiadas nas doses de 12, 16, e 20 Gy [c]. Para imagens em níveis de cinza e transformadas pelo algoritmo nCDA, cada pixel é representado por um único valor que corresponde à intensidade de refletância ou autofluorescência. Valores de pixel mais altos indicam tecidos com maior refletância ou autofluorescência.

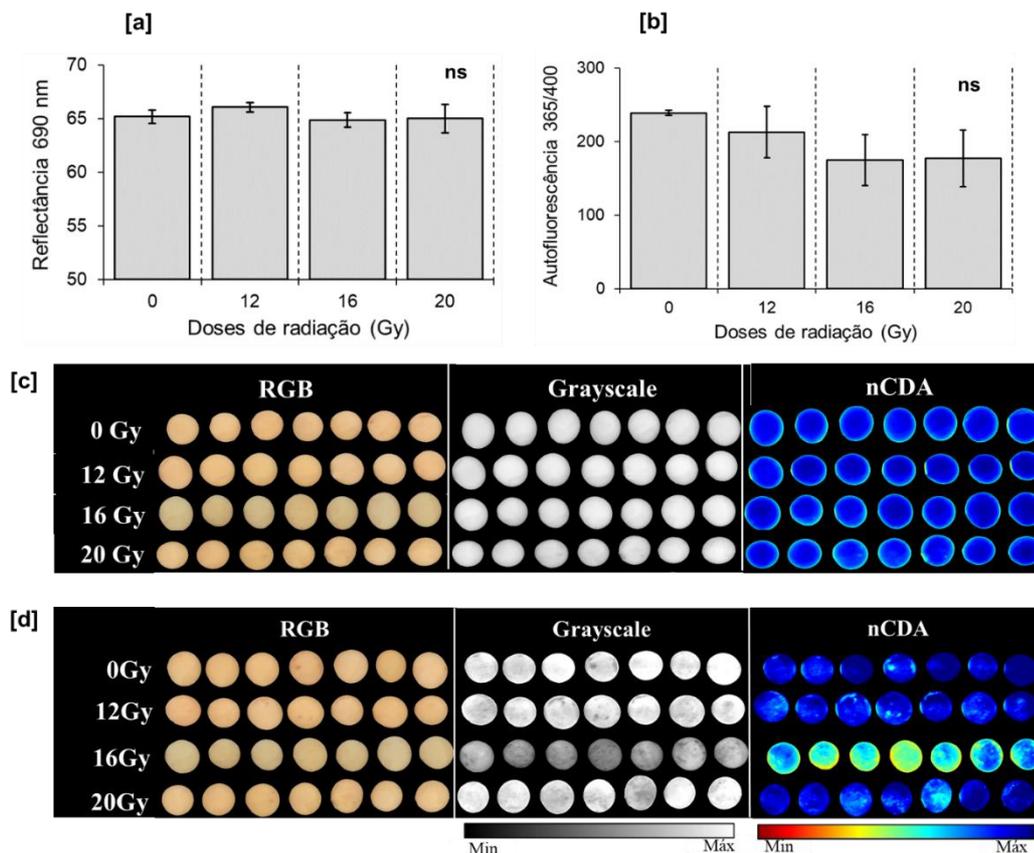


Figura 16. Resposta de sementes de soja de alto vigor (*Glycine max* cv. NS7505 IPRO) a diferentes doses de raios gama (0, 12, 16 e 20 Gy) para dados de refletância a 690 nm [a] e autofluorescência na combinação de excitação/emissão de 365/400 nm [b]; médias (\pm desvio padrão) seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Imagens RGB e de refletância a 690 nm [c] e autofluorescência a 365/400 nm [d] em níveis de cinza e transformadas pelo algoritmo nCDA, com padrões espectrais para as classes de sementes não irradiadas (0 Gy) e irradiadas nas doses de 12, 16, e 20 Gy [c]. Para imagens em níveis de cinza e transformadas pelo algoritmo nCDA, cada pixel é representado por um único valor que corresponde à intensidade de refletância ou autofluorescência. Valores de pixel mais altos indicam tecidos com maior refletância ou autofluorescência.

4.4. Tratamentos de sementes com raios gama e influência na síntese e atividade de pigmentos de plântulas detectada por tecnologias de imagens multiespectrais

Para o cultivar M5705 IPRO, quando se utilizou sementes de baixo vigor (Figura 17), as variáveis F_0 e F_M tiveram menor sinal em plântulas produzidas a partir de sementes irradiadas, particularmente a 16 Gy (F_0 e F_M) e 20 Gy (F_M) (Figura 17a). No entanto, a relação F_V/F_M não diferiu entre as plântulas geradas a partir de sementes não irradiadas e irradiadas (Figura 17a). Além disso, não houve diferenças significativas para os índices de antocianinas e de clorofila *a* (Figura 17b).

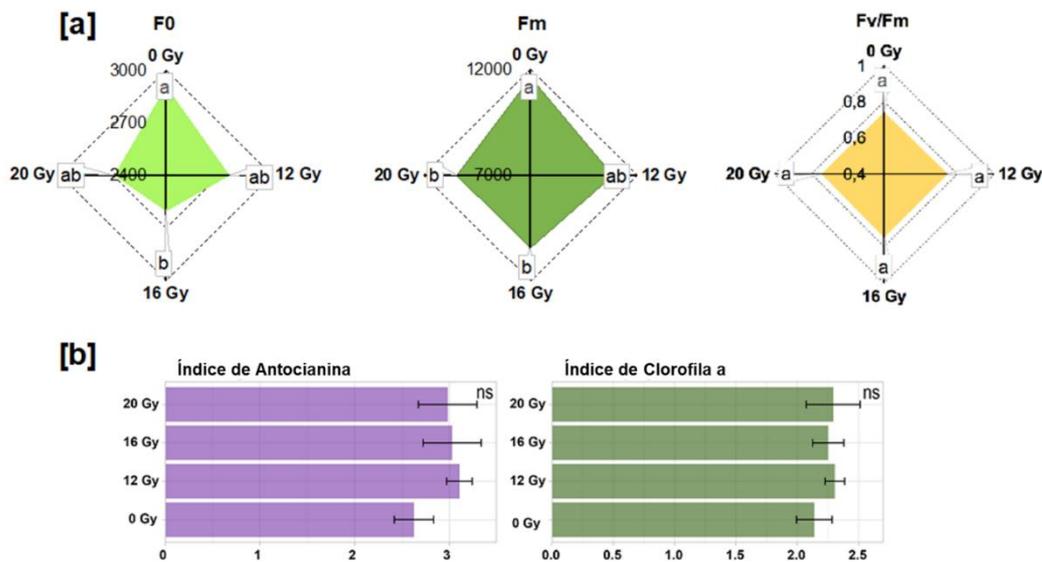


Figura 17. Fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_M) e rendimento quântico máximo do fotossistema II com base no F_v/F_M [a], índice de antocianinas e de clorofila a [b] em plântulas de soja (*Glycine max* cv. M5705 IPRO) aos 16 dias após a semeadura, provenientes de sementes de baixo vigor para classes não irradiadas (0 Gy) e tratadas com raios gama nas doses de 12, 16 e 20 Gy. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

As sementes de alto vigor do cultivar M5705 IPRO (Figura 18), também apresentaram maiores sinais de F_0 na dose de 16 Gy (Figura 18 a) e F_M nas doses de 16 e 20 Gy. As plântulas obtidas de sementes não irradiadas obtiveram os menores sinais de F_0 e F_M (Figura 18 a). Não houve diferença significativa para as plântulas produzidas de sementes não irradiadas e irradiadas em relação ao parâmetro F_v/F_M , bem como para o índice de antocianina e de clorofila a (Figura 18 b).

Utilizando sementes de baixo vigor do cultivar NS7505 IPRO (Figura 19), observou-se um aumento significativo nos sinais de F_0 das plântulas após aplicação das diferentes doses de radiação, mas nenhuma dose se destacou (Figura 19 a). Por outro lado, para o parâmetro F_M , as plântulas produzidas a partir de sementes tratadas na dose de 20 Gy apresentaram os maiores valores, enquanto os menores valores foram constatados para as plântulas obtidas de sementes não irradiadas (Figura 19 a). Não houve diferença significativa para a relação F_v/F_M e índice de antocianina entre os tratamentos, no entanto, as plântulas provenientes de sementes irradiadas, independente da dose, apresentaram os maiores índices de clorofila a (Figura 19 b).

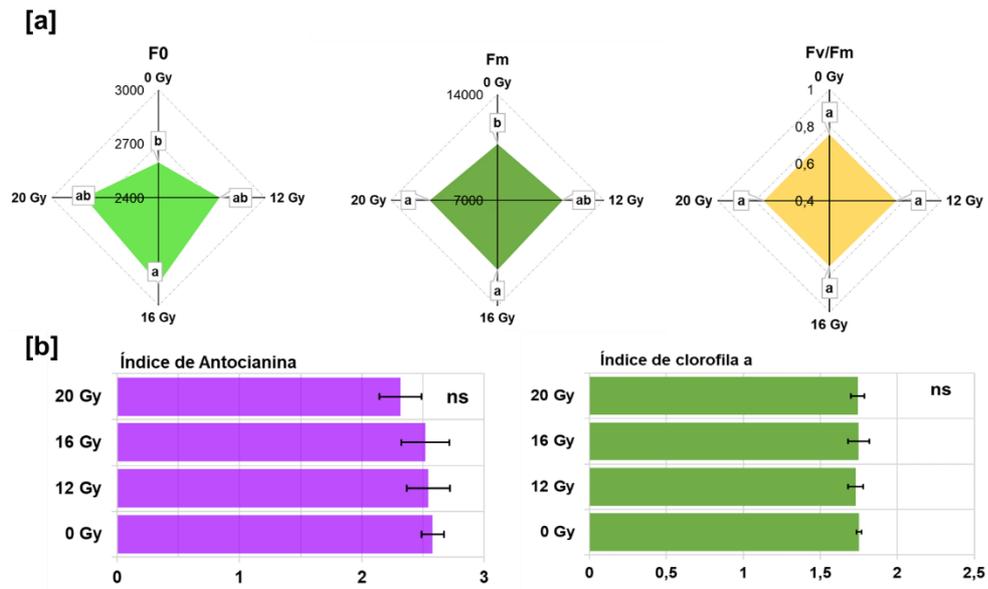


Figura 18. Fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_M) e rendimento quântico máximo do fotossistema II com base no F_V/F_M [a], índice de antocianinas e de clorofila a [b] em plântulas de soja (*Glycine max* cv. M5705 IPRO) aos 16 dias após a semeadura, provenientes de sementes de alto vigor para classes não irradiadas (0 Gy) e tratadas com raios gama nas doses de 12, 16 e 20 Gy. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

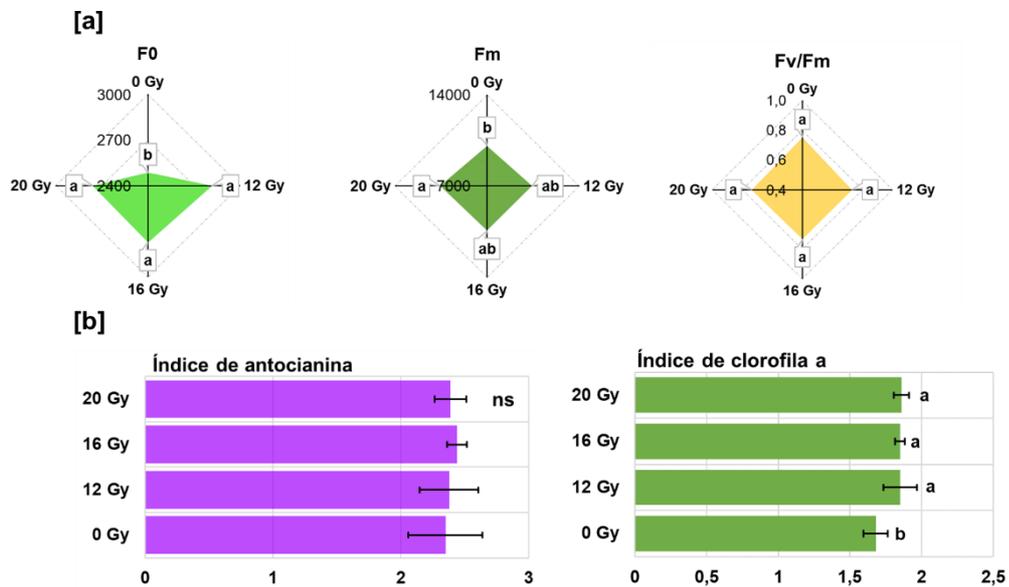


Figura 19. Fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_M) e rendimento quântico máximo do fotossistema II com base no F_V/F_M [a], índice de antocianinas e de clorofila a [b] em plântulas de soja (*Glycine max* cv. NS7505 IPRO) aos 16 dias após a semeadura, provenientes de sementes de baixo vigor para classes não irradiadas (0 Gy) e tratadas com raios gama nas doses de 12, 16 e 20 Gy. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

As plântulas produzidas de sementes de alto vigor do cultivar NS755 IPRO (Figura 20) não apresentaram alteração nos sinais de F_0 , F_M e F_v/F_M nas diferentes doses de raios gama (Figura 20 a). O menor índice de antocianina foi obtido para as plântulas provenientes de sementes irradiadas na dose de 16 Gy (Figura 20 b), e não foram observadas diferenças significativas no índice de clorofila a .

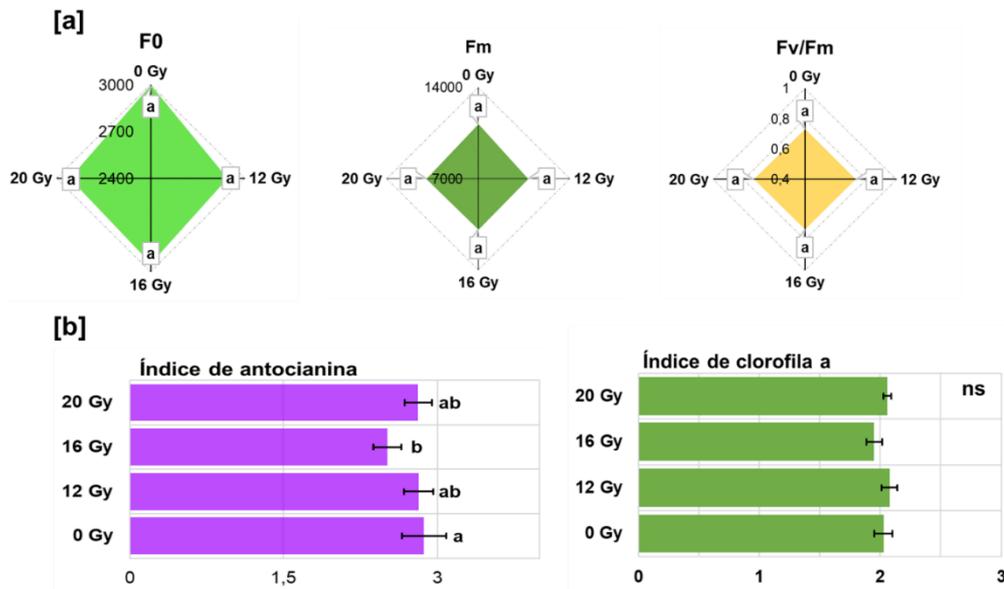


Figura 20. Fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_M) e rendimento quântico máximo do fotossistema II com base no F_v/F_M [a], índice de antocianinas e de clorofila a [b] em plântulas de soja (*Glycine max* cv. NS7505 IPRO) aos 16 dias após a semeadura, provenientes de sementes de alto vigor para classes não irradiadas (0 Gy) e tratadas com raios gama nas doses de 12, 16 e 20 Gy. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os valores de fluorescência média da clorofila a de plântulas do cultivar M5705 IPRO, utilizando sementes de baixo vigor, foram significativamente reduzidos com o aumento da dose de radiação gama (Figura 21 a), o que também pode ser verificado nas imagens de fluorescência de clorofila a em cores falsas (Figura 21 b), em que as cores verdes e brancas indicam tecidos com maior e menor fluorescência, respectivamente, e a cor amarela representa níveis intermediários.

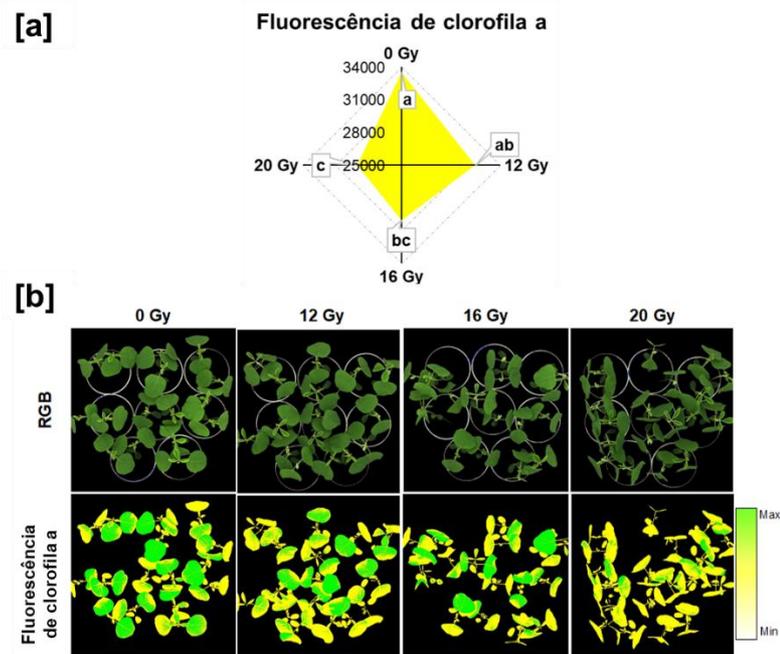


Figura 21. Fluorescência de clorofila *a* em plântulas de soja (*Glycine max* cv. M5705 IPRO) aos 16 dias após a sementeira, provenientes de sementes de baixo vigor para classes não irradiadas (0 Gy) e irradiadas com diferentes doses de raios gama (12, 16 e 20 Gy) [a]; médias seguidas de mesma letra não diferentes significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Imagens RGB e imagens de fluorescência da clorofila *a* [b].

Quando foram utilizadas sementes de alto vigor do cultivar M5705 IPRO, as plântulas apresentaram incremento na fluorescência de clorofila *a* em todas as doses de radiação (Figura 22 a). Do mesmo modo, as imagens de fluorescência também evidenciam os maiores sinais de fluorescência de clorofila *a* (pixels de cor verde) nas plântulas originadas de sementes irradiadas (Figura 22 b).

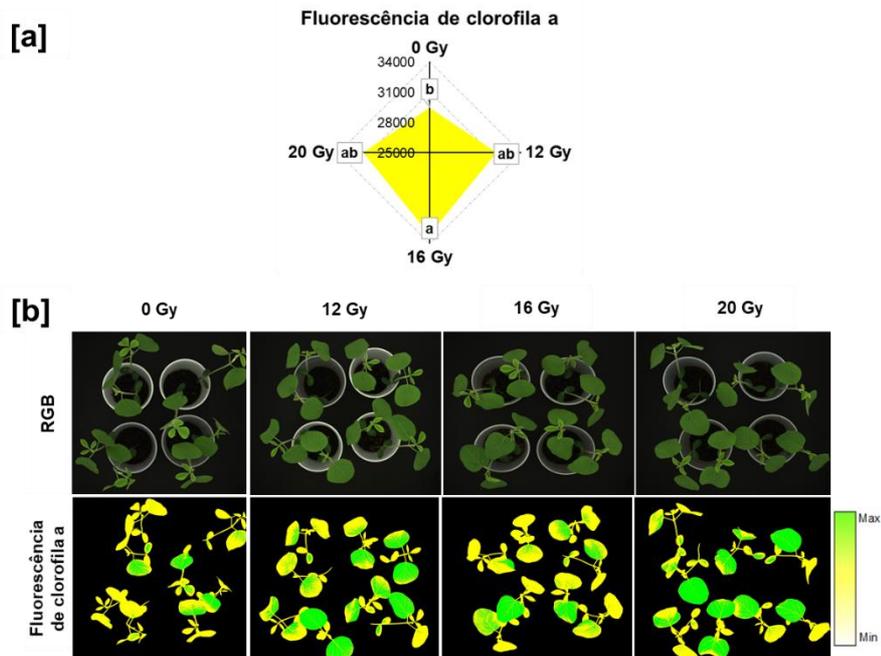


Figura 22. Fluorescência de clorofila *a* em plântulas de soja (*Glycine max* cv. M5705 IPRO) aos 16 dias após a semeadura, provenientes de sementes de alto vigor para classes não irradiadas (0 Gy) e irradiadas com diferentes doses de raios gama (12, 16 e 20 Gy) [a]; médias seguidas de mesma letra não diferentes significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Imagens RGB e imagens de fluorescência da clorofila *a* obtidas para cada tratamento [b].

Na análise das plântulas do cultivar NS7505 IPRO, similarmente, verificou-se que as médias de fluorescência de clorofila *a* de plântulas obtidas de sementes irradiadas foram significativamente maiores (Figura 23 a). A Figura 23 b mostra o padrão das imagens de fluorescência de clorofila *a* dos diferentes tratamentos, em que os pixels de cores verdes (maior sinal) foram predominantes em plântulas de sementes irradiadas.

Por fim, diferentemente das sementes de baixo vigor, quando se utilizou sementes de alto vigor do cultivar NS7505 IPRO na dose de 16 Gy, as plântulas obtiveram menores sinais de fluorescência de clorofila *a* (Figura 24 a), conforme também verificado nas imagens (Figura 24 b), e os maiores sinais de fluorescência foram observados para a categoria não irradiada.

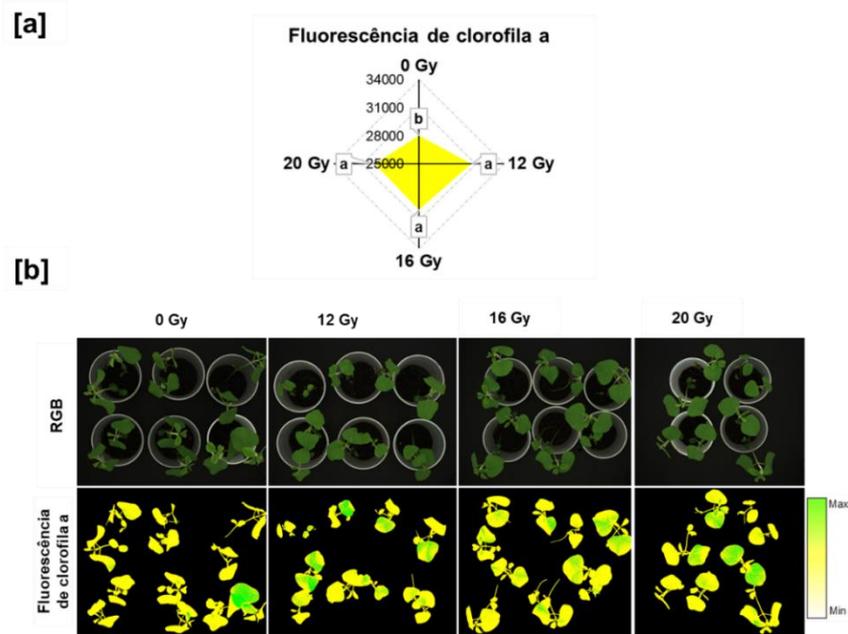


Figura 23. Fluorescência de clorofila *a* em plântulas de soja (*Glycine max* cv. NS7505 IPRO) aos 16 dias após a semeadura, provenientes de sementes de baixo vigor para classes não irradiadas (0 Gy) e irradiadas com diferentes doses de raios gama (12, 16 e 20 Gy) [a]; médias seguidas de mesma letra não diferentes significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Imagens RGB e imagens de fluorescência da clorofila *a* obtidas para cada tratamento [b].

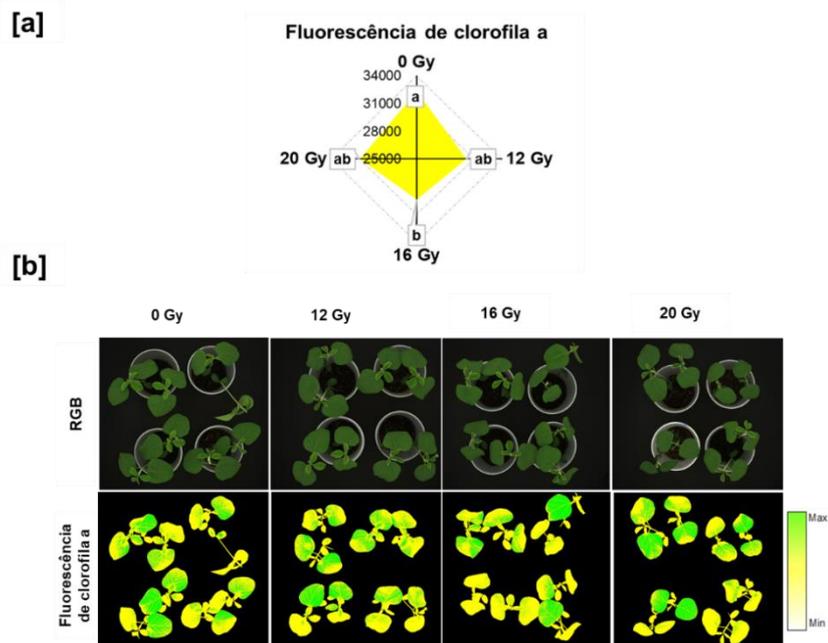


FIGURA 24. Fluorescência de clorofila *a* em plântulas de soja (*Glycine max* cv. NS7505 IPRO) aos 16 dias após a semeadura, provenientes de sementes de alto vigor para classes não irradiadas (0 Gy) e irradiadas com diferentes doses de raios gama (12, 16 e 20 Gy) [a]; médias seguidas de mesma letra não diferentes significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Imagens RGB e imagens de fluorescência da clorofila *a* obtidas para cada tratamento [b].

5. DISCUSSÃO

5.1. Vigor inicial e efeito do tratamento de sementes com radiação gama

A radiação ionizante em baixas doses pode ter efeitos benéficos sobre componentes físicos e bioquímicos de sementes, estimular fatores de crescimento nas plantas resultantes, além de desencadear estratégias de sobrevivência visando neutralizar os danos por meio de sistemas de defesa (Oliveira et al., 2021). Para que fosse possível avaliar essas respostas utilizando sensores multiespectrais, e como sementes menos e mais vigorosas podem responder aos estímulos da radiação ionizante utilizando o Co^{60} de formas distintas, os efeitos foram comparados em sementes de baixo e alto vigor de diferentes cultivares de soja. A princípio, as classes de sementes envelhecidas nos diferentes tempos (0, 12, 24 e 48 h) foram comparadas quanto ao potencial fisiológico empregando testes de germinação e vigor, além da determinação do conteúdo de proteínas e gordura bruta, pigmentos e F_v/F_M das plântulas resultantes.

Em geral, as sementes envelhecidas por 48 h apresentaram maior distinção das sementes não envelhecidas (0 h). Por exemplo, no cultivar M5705 IPRO a germinação aos 5 dias caiu de 99% nas sementes não envelhecidas para 75% nas sementes envelhecidas artificialmente por 48 h (Figura 1). Enquanto isso, a condutividade elétrica aumentou de 115,52 para 142,13 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ (Figura 1). Por ser inversamente proporcional ao vigor, quanto maior o valor da condutividade, menor a integridade da membrana celular e maior a quantidade de açúcares, proteínas, íons como K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} entre outros, liberadas do interior das sementes para a água (ISTA, 2020). Aos 16 dias após a semeadura, apesar das plântulas resultantes de sementes envelhecidas por 48 h terem apresentado incremento no índice de clorofila *a* como resposta ao estresse térmico do envelhecimento artificial, o F_v/F_M foi reduzido, indicando prejuízos ao fotossistema II pois parte da energia luminosa estava sendo perdida por fluorescência, conforme revelado pelos valores superiores de F_0 , F_M e fluorescência média da clorofila *a* (Figura 5). Portanto para o cultivar M5705 IPRO, ficou evidenciado por meio dos testes empregados que as sementes envelhecidas artificialmente por 48 h e as sementes não envelhecidas apresentavam níveis de vigor mais contrastantes.

As diferenças de vigor entre as classes de sementes envelhecidas por 48 h e não envelhecidas foram ainda mais marcantes no cultivar NS7505 IPRO. Isto foi constatado no teste de germinação aos 5 e 8 dias, EASS, condutividade elétrica, emergência de plântulas e IVE (Figura 2), além do índice de clorofila *a*, F_0 e F_M (Figura 6). Entretanto, enquanto o envelhecimento provocou estímulo no índice de clorofila *a* do cultivar M5705 IPRO (Figura 5), houve redução substancial para este pigmento nas plântulas do cultivar NS7505 IPRO

(Figura 6), revelando que as sementes do cultivar NS7505 IPRO possuem mecanismos de defesa menos eficientes.

Dessa maneira, determinar o vigor das sementes por meio de testes confiáveis e bem estabelecidos é essencial para obtenção de dados precisos. Portanto, as sementes menos vigorosas (sementes envelhecidas por 48 h) e as sementes mais vigorosas, ou seja, sementes não envelhecidas artificialmente, foram estudadas utilizando raios gama nas doses de 0,12,16 e 20 Gy.

Os efeitos da radiação gama nas classes de sementes de baixo e alto vigor foram inicialmente avaliados a partir da composição química de proteínas e gordura bruta pelo fato dos padrões espectrais das sementes serem altamente dependentes dos componentes químicos predominantes nas sementes, e pela possível influência da radiação ionizante nesses componentes. Como previsto, as sementes de alto vigor de ambos os cultivares, apresentaram aumento progressivo na porcentagem de proteína bruta com o aumento da dose de radiação (Figuras 7 e 8). Além disso, o aumento no teor de proteína bruta também foi constatado nas sementes de baixo vigor do cultivar NS7505 IPRO (Figura 8). De acordo com Cho e Song (2000), a radiação gama pode causar a quebra de moléculas de proteínas com posterior agregação, causando o acúmulo dessas moléculas. Ainda, Byun et al. (1996) verificaram que o aumento da dose de radiação gama promove maior acúmulo de nitrogênio em sementes de soja, com conseqüente incremento no teor de proteína nas sementes irradiadas. Em grão-de-bico, o aumento da dose de raios gama em sementes resultou na maior síntese de proteínas das folhas resultantes (Hameed et al., 2008).

Em relação ao conteúdo de gordura bruta, a classe de sementes de baixo vigor de ambos os cultivares revelaram um efeito deletério da menor dose de raios gama (12 Gy), evidenciando, portanto, um efeito hormético (Figuras 7 e 8). De acordo com Kara et al. (2016), a resposta na redução do conteúdo de lipídios sob doses baixas de raios gama é dependente do cultivar, e em trabalhos prévios com soja, isto também foi constatado para os cultivares Ataem-7 e Mitchell. Segundo esses mesmos autores, isto ocorre devido ao aumento na oxidação dos lipídios, com conseqüente liberação de radicais livres. Por outro lado, as sementes de alto vigor do cultivar NS7505 IPRO tiveram um comportamento diferente, com redução no teor de gordura bruta apenas na dose de 20 Gy (Figura 8).

O uso dos sensores ópticos avançados abordados no presente trabalho permitiu melhor detecção dos efeitos da radiação gama nas classes de sementes de baixo e alto vigor. Na natureza, toda superfície de um objeto absorve e reflete luz em comprimentos de ondas específicos na região do ultravioleta, visível ou infravermelho do espectro eletromagnético. A

intensidade final de reflectância é variável em função da composição química, textura e cor. Sendo assim, as mudanças de reflectância de forma mais pronunciada em sementes de alto vigor (Figuras 9, 12 e 13) indicam que essas sementes são mais responsivas às alterações de componentes químicos, textura e cor.

As mudanças nos padrões espectrais de reflectância das sementes na região do visível (405-780 nm) são atribuídas principalmente à pigmentos e compostos fenólicos. Os raios gama, por serem altamente penetrantes, induzem a formação de radicais livres e podem ter modificado componentes celulares e conseqüentemente acumulado compostos com funções protetoras, como clorofilas (absorção entre 690-710 nm), antocianinas (absorção entre 540-560 nm), carotenoides (absorção entre 510-520 nm) e compostos fenólicos, como por exemplo as isoflavonas e os flavonoides (Dixit et al., 2010; Variyar et al., 2004) que possuem ampla faixa de absorção de luz (Gitelson et al., 2006). Portanto, possivelmente, as sementes de baixo vigor não foram capazes de ativar mecanismos de proteção eficientes que pudessem ativar a síntese desses compostos, já que apresentaram pouca resposta na faixa visível do espectro eletromagnético.

Ademais, para a reflectância a 690 nm, a resposta espectral das sementes pode estar relacionada com a atividade de enzimas de defesa, como a polifenol oxidase (PPO), que é induzida em tecidos expostos à radiação gama (Aly et al., 2019). A PPO catalisa a oxidação de compostos fenólicos que causam o escurecimento dos tecidos da semente, e sua atividade pode ser estimada utilizando comprimentos de onda do vermelho distante (por exemplo, 690 nm) (Gaston et al., 2010). Na presente pesquisa, o escurecimento dos tecidos foi constatado nas imagens RGB das sementes de alto vigor do cultivar NS7505 IPRO para a dose de 16 Gy (Figura 16), que, por conseguinte, obteve menor assinatura espectral de reflectância no comprimento de onda de 690 nm (Figura 13). Já nas sementes de alto vigor do cultivar M5705 IPRO, a maior influência na atividade da PPO pode ter ocorrido na dose de 20 Gy, já que houve redução na reflectância das sementes principalmente deste tratamento (Figura 9 e 12).

Por outro lado, os dados espectrais distintos na região do NIR (850-970 nm) correspondem à absorção de energia de grupos funcionais contendo átomos de hidrogênio (combinações de C-H, N-H e O-H), que referem-se às moléculas de água, lipídios, dentre outras (Bianchini et al., 2021). Assim, na faixa do NIR, a maior reflectância em sementes de baixo e alto vigor do cultivar M5705 IPRO nas doses de 12 e 20 Gy, respectivamente (Figura 9), pode estar associado à uma possível desidratação e maior oxidação de moléculas de lipídios nas camadas superficiais das sementes.

A indução de autofluorescência detectada na região do UVA utilizando a combinação de excitação e emissão de 365/400 nm (Figuras 10, 11, 12 e 14), ocorreu provavelmente devido ao aumento de fenóis, terpenóides e alcaloides, que são excitados nessa região do espectro (García-Plazoala et al., 2015). García-Plazoala et al. (2015) destacaram que muitos compostos autofluorescentes, em especial metabólitos secundários se acumulam em camadas mais externas da derme para agirem como verdadeiros protetores contra fatores estressantes externos, como por exemplo, a radiação ionizante. Assim, técnicas de identificação de compostos com características fluorescentes constituem em ferramenta valiosa para detecção de alterações bioquímicas em sementes provocadas por tratamentos físicos.

5.2. Efeito hormético de raios gama em sementes e plântulas

Ao longo da vida, as sementes podem desenvolver diversos mecanismos de adaptação para sobreviver a diferentes condições de estresse. Por exemplo, a exposição prévia das sementes a baixas doses de radiação gama é capaz de preparar as sementes para situações de doses mais elevadas, que normalmente poderiam ser letais. Essa resposta está relacionada ao fenômeno da hormese, que consiste na estimulação em baixas doses, mas inibição com o aumento da dose, assumindo uma resposta em forma de U ou U invertido dependendo da variável sob avaliação (Agathokleous et al., 2020). Por exemplo, no presente estudo, o teor de gordura bruta das sementes de baixo vigor do cultivar M5705 IPRO embora tenha apresentado uma tendência de curva no formato de U devido aos maiores danos na dose de 12 Gy (Figura 7a), a fluorescência de componentes das sementes teve uma tendência de curva de U invertido na dose de 12 Gy, possivelmente pelo incremento de pigmentos com papel importante na tolerância das sementes ao estresse (Figura 11a).

Os resultados obtidos para as diferentes variáveis extraídas das imagens das plântulas provenientes de sementes irradiadas e não irradiadas, revelaram que na classe de sementes de baixo vigor do cultivar M5705 IPRO, o efeito hormético da dose de 12 Gy nas sementes (Figuras 7a e 11a) resultou na redução dos valores de F_0 e F_M nas plântulas com o aumento da dose para 16 Gy (Figura 17), portanto, menor quantidade de luz estava sendo perdida por fluorescência nesses tratamentos, indicando que a irradiação de sementes influenciou a capacidade das plântulas de usar a energia luminosa. Os resultados obtidos no presente trabalho para o cultivar M5705 IPRO estão de acordo com Gudkov et al. (2019) que relataram que os parâmetros de crescimento de plantas podem ser estimulados após exposição das sementes a doses de radiação de até 20 Gy (consideradas doses baixas). Diversos outros trabalhos também têm reportado melhorias no desempenho de plantas devido ao efeito hormético de baixas doses

de raios gama. Em *Arabidopsis thaliana*, houve um efeito marcante em parâmetros de desenvolvimento das plantas (Qi et al., 2015). Em soja, Franco et al. (2018) observaram aceleração na germinação das sementes e maior produtividade das plantas, e Moussa (2011) constatou maior atividade da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase das plantas, além de aumento na concentração de açúcares solúveis, proteína e prolina. Por outro lado, não foram constatados efeitos horméticos dos tratamentos de radiação nas sementes ou plântulas do cultivar NS7505 IPRO.

As plântulas de soja do cultivar NS7505 IPRO provenientes de sementes de alto vigor e irradiadas na dose de 16 Gy apresentaram menor índice de antocianinas, caracterizando um efeito hormético também na produção deste pigmento (Figura 20). As antocianinas são um grupo de flavonoides que atuam na defesa das moléculas de clorofila contra danos oxidativos provocados pelo excesso de luz ultravioleta, além de atuarem na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Pourcel et al., 2007; Liang e He, 2018) e na conferência da tolerâncias das plantas diante de fatores estressantes (Li et al., 2017).

Atualmente, o conhecimento de como os sistemas biológicos respondem às mudanças ambientais tem sido o foco de pesquisadores, gerando informações sobre os mecanismos de adaptação de sementes e plantas a condições adversas de estresse. As plântulas desempenham um papel importante no ciclo de vida dos vegetais, pois formam a ponte entre o embrião heterotrófico e a planta autotrófica estabelecida (Réthoré et al., 2019). Portanto, o sucesso no seu estabelecimento é fundamental para a produção agrícola. Neste contexto, os sensores ópticos empregados no presente estudo possibilitaram avaliar a resposta de sementes de soja ao fenômeno da hormese, e seus efeitos sobre as plântulas resultantes de forma rápida e não destrutiva. Tais achados podem ser relevantes para as áreas de biotecnologia agrícola, fornecendo indicadores para o desenvolvimento e seleção de novos cultivares.

5.3. Respostas de diferentes cultivares aos efeitos da radiação gama

A influência do genótipo atua fortemente na resposta de sementes e plantas a métodos físicos (Araújo, 2016). Sendo assim, vários autores utilizando genótipos distintos da mesma espécie têm verificado respostas diferentes para uma mesma dose de radiação aplicada (Borzouei et al., 2010; Ahmed et al., 2017; Di Pane et al., 2018; Kusmiyati et al., 2018). Por exemplo, Dixit et al. (2010) verificaram que genótipos de soja apresentando sementes com alto teor de antocianinas e polifenóis apresentavam maior atividade antioxidante total após aplicação de doses de radiação gama.

Na presente pesquisa, antes do envelhecimento, as taxas de lixiviados no teste de condutividade elétrica partiram de aproximadamente $120 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ nas sementes do cultivar M5705 IPRO (Figura 1), e no cultivar NS7505 IPRO partiram de aproximadamente $150 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ (Figura 2), indicando que o segundo cultivar tinha menor vigor inicial mesmo antes do envelhecimento artificial. Deste modo, o menor vigor inicial do cultivar NS7505 IPRO pode explicar por que a variação na assinatura espectral de reflectância no espectro visível das sementes de alto vigor já ocorreu na dose de 16 Gy (Figura 9b), enquanto no cultivar M5705 IPRO as alterações foram mais evidentes na dose mais alta (20 Gy) (Figura 13b). Além disso, enquanto as doses mais elevadas estimulavam a síntese de compostos de fluorescência azul (combinação de 365/400 nm) nas sementes de alto vigor do cultivar M5705 IPRO (Figuras 10b), as mesmas doses provocaram efeito inibidor nesses compostos fluorescentes nas sementes de alto vigor do cultivar NS7505 IPRO (Figuras 14b).

5.4. Relação da dose de radiação gama aplicada nas sementes com a síntese e atividade de pigmentos em plântulas

As moléculas de clorofila e pigmentos acessórios absorvem a energia luminosa na forma de fótons e alteram temporariamente as suas configurações eletrônicas, se tornando excitadas. Para dissipar energia e retornar ao estado fundamental da clorofila, parte da energia é direcionada para produção de carboidratos a partir da fotossíntese, e outra parte é dissipada na forma de fluorescência e calor (Hanelt, 2018). Portanto, o valor obtido na medição de fluorescência de clorofila está diretamente ligado à fotossíntese, já que alterações nas taxas fotossintéticas causará alterações na emissão da fluorescência, isto é, toda dissipação de energia na forma de fluorescência significa que não está sendo direcionada para a produção de carboidratos.

A aplicação da técnica de fluorescência de clorofila tem sido empregada principalmente em trabalhos com plantas para detecção da suscetibilidade à estresses (Baker, 2008; Badger et al., 2009; Stepien e Johnson, 2009). O aumento da intensidade de fluorescência de clorofila em um tecido vegetal pode estar associado ao aumento no conteúdo de clorofilas, ou devido à redução das reações fotoquímicas. Por exemplo, no cultivar NS7505 IPRO, verificou-se um aumento gradual no índice de clorofilas das plântulas provenientes de sementes de baixo vigor em todas as doses de raios gama estudadas (Figura 19b), e como consequência, houve também aumento na intensidade de fluorescência de clorofila (Figura 23). Por outro lado, na classe de baixo vigor do cultivar M5705 IPRO, considerando que não houve alteração nos índices de clorofila (Figura 17b), a menor fluorescência de clorofila constatada nas doses de 16

e 20 Gy (Figura 21) indica que a maior parte de energia estava sendo utilizada nas reações de fotossíntese. Neste contexto, marcadores baseados em fluorescência são fortes candidatos para estudos sobre a relação de doses de radiação gama com a síntese e atividade de clorofila de plântulas. Apesar disto, as respostas aos efeitos da radiação gama em sementes de soja com posterior avaliação das plântulas requerem estudos aprofundados e detalhados visando melhor entendimento da influência de fatores como vigor e genótipo, utilizando um maior número de materiais biológicos.

6. CONCLUSÕES

O vigor da semente de soja pode influenciar substancialmente na resposta fisiológica das plântulas em relação a tratamentos de radiação gama. Entretanto, independente do vigor ou cultivar, os raios gama promovem incremento no conteúdo de proteína bruta das sementes, enquanto a influência no conteúdo de gordura bruta é dependente do vigor e genótipo, podendo haver efeito hormético ou redução deste componente a depender da dose utilizada.

As alterações nos padrões espectrais das sementes provocadas pelas doses de raios gama são mais pronunciadas em sementes de maior vigor, com melhor resposta para as sementes do cultivar NS7505 IPRO em relação ao cultivar M5705 IPRO.

A irradiação de sementes de soja nas doses de 12, 16 e 20 Gy utilizando sementes de menor vigor induz uma maior síntese de clorofila *a* nas plântulas resultantes do cultivar NS7505 IPRO, enquanto no cultivar M5705 IPRO as respostas são mais marcantes em relação à capacidade de conversão de energia química, particularmente na dose de 16 Gy.

Os sensores ópticos baseados em análise multiespectral de imagens possuem potencial para detectar os efeitos de baixas doses de radiação gama em sementes de soja, podendo constituir em ferramenta promissora para análise rápida, não destrutiva e sustentável da resposta de sementes a tratamentos físicos envolvendo radiações ionizantes. A abordagem proposta também pode ser empregada para identificar curvas de dose-resposta, fornecendo marcadores em programas de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- Agathokleous, E., Kitao, M., Calabrese, E. J., 2020. Hormesis: Highly Generalizable and Beyond Laboratory. *Trends in Plant Sci.*, 25, 1076-1086. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.006>.
- Ahmed, S., Khan, W. M., Khan, M. S., Akhtar, N., Umar, N., Ali, S., Hussain, S., Shah, S. S. 2017. Impact of gamma radiations on wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties (Batoor and Janbaz). *Pure appl. Biol*, 6, 218-225. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2017.60017>
- Andrews, L. S., Ahmedna, M., Grodner, R. M., Liuzzo, J. A., Murano, P. S., Murano, E. A., Wilson, P. W., 1998. Food preservation using ionizing radiation. *Rev Environ Contam Toxicol*, 154, 1-53. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4612-2208-8_1
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16 ed. Washington: AOAC, 1995. 2v.
- Attix, F. E. Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry. New York: John Wiley and Sons, 1986.
- Aly, A. A., Eliwa, N. E., Abdel-Megid, M. H., 2019. Stimulating effect of gamma radiation on some active compounds in eggplant fruits. *Egypt. J. Rad. Sci. Applic.* 1, 61–73. <https://doi.org/10.21608/ejrsa.2019.10024.1066>
- Araújo, S. D. S., Paparella, S., Dondi, D., Bentivoglio, A., Carbonera, D., Balestrazzi, A., 2016. Physical methods for seed invigoration: advantages and challenges in seed technology. *Front. Plant. Sci*, 7, 646. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00646>
- Araújo, A. L.; Artur, P. B.; Rossi, R. S.; Franco, C. F. O.; Artur, V., 2018. Eficiência da radiação gama em semente de algodão. *Tec. e Ciênc Agrop.*,12,51-55.
- Badger, M. R., Fallahi, H., Kaines, S., Takahashi, S, 2009. Chlorophyll fluorescence screening of *Arabidopsis thaliana* for CO₂ sensitive photorespiration and photoinhibition mutants. *Funct. Plant Biol*, 36, 867–873. <http://dx.doi.org/10.1071/FP09199>

- Baker, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo, 2008. Annu. Rev. Plant Biol, 59, 89-113. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Beyaz, R., Kahramanogullari, C. T., Yildiz, C., Darcin, E. S., Yildiz, M., 2016. The effects of gamma radiation on seed germination and seedlings growth of *Lathyrus chrysanthus* Boiss. Under in vitro conditions. J. Environ. Radioact, 162, 129-133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.05.006>
- Bianchini, V. D. J. M., Mascarin, G. M., Silva, L. C. A. S., Arthur, V., Carstensen, J. M., Boelt, B., Silva, C. B., 2021. Multispectral and X-ray images for characterization of *Jatropha curcas* L. seed quality. Plant Methods, 17, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00709-6>
- Bond, J. G., Osorio, A. R., Avila, N., Gómez-Simuta, Y., Marina, C. F., Fernández-Salas, I., Liedo, P., Dor, A., Cavalho, D. O., Bourtzis, K., Williams, T., 2019. Optimization of irradiation dose to *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* in a sterile insect technique program. PloS one, 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212520>
- Borzouei, A., Kafi, M., Khazaei, H., Naseriyan, B., Majdabadi, A., 2010. Effects of gamma radiation on germination and physiological aspects of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. Pak. J. Bot, 42, 2281-2290.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes. Brasília: Mapa/ACS, 399p.
- Byun, M., Kang, I., Mori, T., 1996. Effect of γ -irradiation on the water soluble components of soybeans. Radiat. Phys. Chem., 47, 155-160. [https://doi.org/10.1016/0969-806X\(94\)00148-D](https://doi.org/10.1016/0969-806X(94)00148-D)
- Caverzan, A., Giacomini, R., Müller, M., Biazus, C., Lângaro, N.C., Chavarria, G.L., 2018. How does seed vigor affect soybean yield components? Agron. J., 110, 1318–1327. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.11.0670>

- Cho, Y., Song, K. B., 2000. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of BSA and β - lactoglobulin.. J. Biochem. Mol. Bio., 33, 133-137.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento, 2020. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2020/21. Brasília: Conab, 08, 1-86.
- Costa, K. Z., Costa, M. L. Z., Botteon, V. W., Faggioni, K. M., Costa, N., Mastrangelo, T., 2020. Quality control and characterization of the testicles and ovaries of irradiated *Anastrepha obliqua* from Brazil. Sci. Agric, 77. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2017-0253>
- De Beer, C. J., Moyaba, P., Boikanyo, S. N., Majatladi, D., Venter, G. J., Vreysen, M. J., 2020. Gamma irradiation and male *Glossina austeni* mating performance. Insects, 11, 1-17. <http://dx.doi.org/10.3390/insects11080522>
- Di Pane, F. J., Concepcion Lopez, S., Cantamutto, M. A., Domenech, M. B., Castro-Franco, M., 2018. Effect of different gamma radiation doses on the germination and seedling growth of wheat and triticale cultivars. Aust. J. Crop Sci, 12, 1921-1926. <https://doi.org/10.21475/ajcs.18.12.12.p1251>
- Dixit, A. K., Bhatnagar, D., Kumar, V., Rani, A., Manjaya, J. G., Bhatnagar, D., 2010. Gamma irradiation induced enhancement in isoflavones, total phenol, anthocyanin and antioxidant properties of varying seed coat colored soybean. J. Agric. Food Chem, 58, 4298-4302. <https://doi.org/10.1021/jf904228e>
- Donaldson, L., 2020. Autofluorescence in Plants. Molecules, 25,1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>
- Dutra, A. S., Vieira, R. D., 2004. Envelhecimento acelerado como teste de vigor para sementes de milho e soja. Ciência Rural, 34, 715-721. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000300010>

- Ebone, L.A., Caverzan, A., Tagliari, A., Chiomento, J. L. T., Silveira, D.C., Chavarria, G., 2020. Soybean Seed Vigor: Uniformity and Growth as Key Factors to Improve Yield. *Agronomy*, 10, 545. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040545>
- Fairand, B., Ražem, D. Radiation sterilization, 2010. Chapter in the book: *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*. Third Edition, v.2, n.3: Facility Design, Sterilization and Processing. Ed. Nema, S., Ludwig, J.D. Informa Healthcare USA, Inc. New York, N.Y. 268-296.
- Fano, U. 1951. "Principles of radiological physics". In *Radiation Biology*, Edited by: Hollaender, A. 1–144. New York: MacGraw-Hill.
- Fontes, L. S., Arthur, P. B., Artur, V., 2013. Effects of the gamma radiations in seeds of bean (*Vigna unguiculata* L.) for increase the production. *Rev Verde*, 8, 11-14.
- Franco, J. G., Franco, S. S., Franco, C. H., Franco, L. H., Franco, M. A., Arthur, P. B., Arthur, V., 2018. Low doses of gamma radiation in soybean. *Austr. J. of Basic and App. Sci.*, 12, 78-80. <https://doi.org/10.22587/ajbas.2018.12.9.13>
- Galletti, P. A., Carvalho, M. E., Hirai, W. Y., Brancaglioni, V. A., Arthur, V., da Silva, C. B., 2020. Integrating optical imaging tools for rapid and non-invasive characterization of seed quality: tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and carrot (*Daucus carota* L.) as study cases. *Front. Plant Sci*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.577851>
- Gaston, E., Frias, J.M., Cullen, P.J., O'Donnell, C.P., Gowen, A.A., 2010. Prediction of polyphenol oxidase activity using visible near-infrared hyperspectral imaging on mushroom (*Agaricus bisporus*) caps. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6226–6233. <https://doi.org/10.1021/jf100501q>
- García-Plazaola, J. I., Fernández-Marín, B., Duke, S. O., Hernández, A., López-Arbeloa, F., Becerril, J. M., 2015. Autofluorescence: Biological functions and technical applications. *Plant Sci.*, 236, 136–145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.03.010>

- Gitelson, A. A., Merzlyak, M. N., Chivkunova, O. B., 2001. Optical properties and nondestructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. *Photochem. and Photob.* 74, 38–45. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0038:OPANEO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0038:OPANEO>2.0.CO;2)
- Gitelson, A.A., Gritz, Y., Merzlyak, M.N., 2003. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *J. Plant Physiol.* 160, 271–282. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00887>
- Gitelson, A. A., Keydan, G. P., Merzlyak, M. N., 2006. Three-band model for noninvasive estimation of chlorophyll, carotenoids, and anthocyanin contents in higher plant leaves. *Geophysical research letters*, 33, 1-5. <https://doi.org/10.1029/2006GL026457>
- Gudkov, S.V., Grinberg, M. A., Sukhov, V., Vodeneev, V., 2019. Effect of ionizing radiation on physiological and molecular processes in plants, *J. Environ. Radioact.* 2019, 202, 8–24., <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.02.001>.
- Goggin, D. E., Steadman, K. J., 2012. Blue and green are frequently seen: responses of seeds to short-and mid-wavelength light. *Seed Sci. Res.* 22, 27-35. <https://doi.org/10.1017/S0960258511000444>
- Grulichová, M., Mendel, P., Trojan, V., Vyhnánek, T., 2018. Determination of chlorophyll and carotenoids present in the seeds of the plant family Apiaceae and the impact on seed quality. *Acta Univ Agric Silvic Mendel Brun*, 66, 859-869. <https://doi.org/10.11118/actaun201866040859>
- Hameed, A., Shah, T. M., Atta, B. M., Haq, M. A., Sayed, H. I. N. A., 2008. Gamma irradiation effects on seed germination and growth, protein content, peroxidase and protease activity, lipid peroxidation in desi and kabuli chickpea. *Pak. J. Bot.* 40, 1033-1041.
- Hampton, J.G., Tekrony, D.M. *Handbook of vigour test methods*. 3.ed. Zürich: ISTA, 1995. 117p.

- Hanelt, D., 2018. Photosynthesis assessed by chlorophyll fluorescence. *Bioassays*, 169-198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811861-0.00009-7>
- Hao, Q., Yang, Y., Guo, C., Liu, X., Chen, H., Yang, Z., Zhang, C., Chen, L., Yuan, S., Chen, S., Cao, D., Guo, W., Qiu, D., Zhang, X., Shan, Z., Zhou, X., 2020. Evaluation of seed vigor in soybean germplasms from different eco-regions. *Oil Crop Sci.* 5, 22-25. <https://doi.org/10.1016/j.ocsci.2020.03.006>
- Huang, R., Chen, Y.C., 2018. The hormesis effects of low-dose Co⁶⁰ gamma irradiation on high-temperature tolerance in cultivated *Sargassum horneri* (Fucales, Phaeophyceae). *J. Appl. Phycol.* 30, 3395–3404. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1521-3>
- Howitt, C.A., Pogson, B. J. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell & Environment*, 29, 435-445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01492.x>
- Ilyaz, S., Naz S., 2014. Effect of gamma irradiation on morphological characteristics and isolation of curcuminoids and oleoresins of *Curcuma longa* L. *J. Anim. Plant Sci.*, 24, 1396-1404.
- International Seed Testing Association [ISTA]., 2020. Seed Vigour Testing. International Rules for Seed Testing, Zurich, Switzerland.
- Jan, S.; Parween, T.; Hameed, R.; Siddiqi, T. O.; Mahmooduzzafar., 2013. Effects of presowing gamma irradiation on the photosynthetic pigments, sugar content and carbon gain of *Cullen corylifolium* (L.) Medik. *Chil. J. Agric. Res.*, 73, 345-350. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392013000400003>
- Jones, M. A., 2018. Using light to improve commercial value. *Hortic. Res.* 5, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0049-7>
- Jianhua, Z., McDonald, M.B. 1996. The saturated salt accelerated aging test for small seeds. *Seed Science and Technology*, 25, 123-131.

- Kara, Y., Vaizoğullar, H. E., Kuru, A., 2016. Gamma radiation effects on crude oil yield of some soybean seeds: Functional properties and chemical composition of glycine max-ataem-7 seeds. Trop J Pharm Res, 15, 2579-2585. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v15i12.7>
- Katuščin-Ražem, B., Ražem, D., Braun, M., 2009. Irradiation treatment for the protection and conservation of cultural heritage artefacts in Croatia. Radiat. Phys. Chem, 78, 729-731. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.03.048>
- Kautsky, H., Hirsch, A. 1931. Neue Versuche zur Kohlensaureassimilation. Naturwissenschaften, 19, 964. <https://doi.org/10.1007/BF01516164> (1931).
- Kim, J. H., Baek, M. H., Chung, B.Y., Wi, S.G., J. S. Kim., 2004. Alterations in the photosynthesis pigments and antioxidante machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds. J. Plant Biotechnol.,47, 314-321.
- Kumar, A., Saneetha, D. N., Yuvaraj, R., Menaka, M., Subramanian, V., Venkatraman, B., 2020. Effect of gamma sterilization on filtering efficiency of various respiratory face-masks. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.06.04.20121830>
- Kusmiyati, F., Sas, M. G. A., Herwibawa, B., 2018. Mutagenic effects of gamma rays on soybean (*Glycine max* L.) germination and seedlings. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 102. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/102/1/012059>
- Lacroix, M., Ouattara, B., 2000. Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products—a review. Food Res Into, 33, 719-724. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00085-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00085-5)
- Lanouette, G., Brodeur, J., Fournier, F., Martel, V., Vreysen, M., Cáceres, C., Firlej, A. 2017. The sterile insect technique for the management of the spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*: Establishing the optimum irradiation dose. PLoS ONE, 12, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180821>

- Li, P., Li, Y. J., Zhang, F. J., Zhang, G. Z., Jiang, X. Y., Yu, H. M., Hou, B. K., 2017. The Arabidopsis UDP-glycosyltransferases UGT79B2 and UGT79B3, contribute to cold, salt and drought stress tolerance via modulating anthocyanin accumulation. *The Plant Journal*, 89, 85-103. <https://doi.org/10.1111/tpj.13324>
- Li, Y., Sun, J., Wu, X., Chen, Q., Lu, B., Dai, C., 2019. Detection of viability of soybean seed based on fluorescence hyperspectra and CARS-SVM-AdaBoost model. *J. Food Process. Preserv*, 43, 1-9. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14238>
- Liang, J., He, J., 2018. Protective role of anthocyanins in plants under low nitrogen stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 498, 946-953. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.087>
- Liu, S. Z., 2003. Nonlinear Dose-Response Relationship in the Immune System Following Exposure to Ionizing Radiation: Mechanisms and Implications. *Nonlinearity Biol Toxicol Med*, 1, 71-92.
- Liu, S. Z., 2007. Cancer control related to stimulation of immunity by low-dose radiation. *Dose-response*, 5, 39-47. <https://doi.org/10.2203/dose-response.06-108.Liu>
- Machi, A. R., Mayne, R.R., Gava, M. A., Arthur, P. B., Arthur, V., 2019. Gamma radiation sterilization dose of adult males in asian tiger mosquito pupae. *Insects*, 10, 101. <https://doi.org/10.3390/insects10040101>
- Machi, A. R.; Arthur, V., 2012. Efeitos da radiação gama em sementes de feijão de porco cultivadas em diferentes substratos. *Revista Verde*, 7, 155-161.
- Maguire, J. D., 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2, 176-177.
- Maity, J.P., Chakraborty, A., Saha, A., Santra, S.C., Chanda, S., 2004. Radiation induced effects on some common storage edible seeds in India infested with surface microflora. *Radiat. Phys. Chem.*, 71, 1065–1072.

- Mastrangelo, T., Botteon, V., Scopel, W., 2017. Effects of gamma radiation on the ovarian development of the south american fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830). International Nuclear Atlantic Conference, 22-27.
- Martin, S., Duncan, E., 2013. Sterilisation considerations for implantable sensor systems. Woodhead Pub. Lim. 253-278. <https://doi.org/10.1533/9780857096289.2.253>
- Meredith, W. J., Massey, J. B., 1968. Fundamental physics of radiology. John Wright & Sons Ltd.
- Moussa, H. 2011. Low dose of gamma irradiation enhanced drought tolerance in soybean. Acta Agron. Hung, 59, 1-12. <https://doi.org/10.1556/AAgr.59.2011.1.1>
- Mossé, J., 1990. Nitrogen-to-protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. J. Agric. Food Chem, 38, 18-24. <https://doi.org/10.1021/jf00091a004>
- Murchie, E. H., Lawson, T., 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. J. Exp. Bot., 64, 3983-3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Nouailhetas, Y., 2005. Radiações Ionizantes e a vida. CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear. Apostilas educativas. Disponível em: < <https://www.gov.br/cnen/pt-br/material-divulgacao-videos-imagens-publicacoes/publicacoes-1/radiacoesionizantes.pdf>>
- Okasaki, K., 1995. Efeito das radiações ionizantes em células: Noções básicas. IPEN, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 399, 20p.
- Oliveira, N.M., de Medeiros, A.D., Nogueira, M. L, Arthur, V., Mastrangelo, T.A., da Silva, C.B., 2021. Hormetic effects of low-dose gamma rays in soybean seeds and seedlings: A detection technique using optical sensors. Comput. Electron. Agric, 187,1-9. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2021.106251>

- Perozzi, M., 2007. Irradiação: tecnologia boa para aumentar exportações de frutas. *Inovação Uniemp*, 3, 42-44.
- Peng, P. C., Wang, C. Y., 2015. Use of gamma rays in the inspection of steel wire ropes in suspension bridges. *NDT & E International*, 75, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.ndteint.2015.06.006>
- Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I., 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in plant science*, 12, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.006>
- Hassan, A. B., Mahmoud, N. S., Elmamoun, K., Adiamo, O.Q., Ahmed, I.A.M., 2018. Effects of gamma irradiation on the protein characteristics and functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. *Radiat. Phys. Chem.*, 144, 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2017.11.020>
- Respati, A.N., Umani, N., Hanim, C., 2018. Growth and production of *Brachiaria brizantha* cv. MG5 in three difference regrowth phase treated by gamma radiation dose. *Trop. J. Anim. Sci.*, 41,179-184.
- Qi, W., Zhang, L., Wang, L., Xu, H., Jin, Q., Jiao, Z., 2015. Pretreatment with low-dose gamma irradiation enhances tolerance to the stress of cadmium and lead in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Ecotoxic. and Envi Saf.*, 115, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.026>
- R Core Team, 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online: [http:// www.r-project.org/index.html](http://www.r-project.org/index.html) (accessed on 05 fev 2021).
- Ramadhani, T., Hadi, U. K., Soviana, S., Irawati, Z., 2020. Effect of Gamma Irradiation on the Sterility and Other Quality Parameters of Sterile Male *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). In International Conference and the 10th Congress of the Entomological Society of Indonesia, 242-251. <https://dx.doi.org/10.2991/absr.k.200513.042>

- Réthoré, E., D'andrea, S., Benamar, A., Cukier, C., Tolleter, D., Limami, A.M., Macherel, D., 2019. Arabidopsis seedlings display a remarkable resilience under severe mineral starvation using their metabolic plasticity to remain self-sufficient for weeks. *Plant J.*, 99, 302-315. <https://doi.org/10.1111/tpj.14325>
- Scott, B. R., 2005. Stochastic thresholds: a novel explanation of nonlinear dose-response relationships for stochastic radiobiological effects. *Dose-Resp*, 3, 547–567. <https://doi.org/10.2203/dose-response.003.04.009>
- Severiano, L.C., Lahr, F.A., Bardi, M.A., Santos, A.C., Machado, L.D., 2010. Influência da radiação gama nas propriedades de espécies comuns de madeiras brasileiras utilizadas em obras de arte. *Prog. Nucl. Energy*, 52, 730-734. <https://doi.org/10.1016/j.pnucene.2010.04.008>
- Shi, W., Koo, D. E. S., Kitano, M., Chiang, H. J., Trinh, L. A., Turcatel, G., Steventon, B., Arnesano, C., Warburton, D., Fraser, S. E., Cutrale, F. Cutrale., 2020. Pre-processing visualization of hyperspectral fluorescent data with Spectrally Encoded Enhanced Representations. *Nature Communications*, 11, 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41467020-14486-8>
- Silva, C.B., Oliveira, N. M., de Carvalho, M. E. A., de Medeiros, A. D., de Lima Nogueira, M., Dos Reis, A. R., 2021. Autofluorescence-spectral imaging as an innovative method for rapid, non-destructive and reliable assessing of soybean seed quality. *Sci. Rep.*, 11, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97223-5>
- Singh, B., Ahuja S., Singhal, R.K., Venu Babu, P., 2013. Effect of gamma radiation on wheat plant growth due to impact on gas exchange characteristics and mineral nutrient uptake and utilization. *J. Radioanal. Nucl. Chem*, 298, 249–257.
- Singh, R., Singh, D., Singh, A., 2016. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. *World J. Radiol.*, 8, 355-369. <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i4.355>

- Smolikova, G. N., Laman, N. A., Boriskevich, O. V., 2011. Role of chlorophylls and carotenoids in seed tolerance to abiotic stressors. *Russ. J. Plant Physiol*, 58, 965-973. <https://doi.org/10.1134/S1021443711060161>
- Smolikova, G. N., Medvedev, S. S., 2015. Seed carotenoids: synthesis, diversity, and functions. *Russ. J. Plant Physiol*, 62, 1-13. <https://doi.org/10.1134/S1021443715010136>
- Simon, E.W., Harun, R.R., 1972. Leakage during Seed Imbibition. *J. Exp. Bot*, 23, 1076-1085.
- Stepien, P., Johnson, G. N., 2009. Contrasting Responses of Photosynthesis to Salt Stress in the Glycophyte *Arabidopsis* and the Halophyte; *The Ilungiella*: Role of the Plastid Terminal Oxidase as an Alternative Electron Sink1. *Plant physiol*, 149,1154-1165. <https://doi.org/10.1104/pp.108.132407>
- Sullivan, J.A., Deng, X.W., 2003. From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Dev. Biol*, 260, 289–297. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00212-4](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00212-4)
- USDA. Department of Agriculture – United States. World Agricultural Production. Department of Agriculture, Circular series, september 2020. Disponível em: <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/5q47rn72z?locale=em>. Acesso em: 12 fev de 2021.
- Tauhata, L., Salati, I., Di Prinzio, R., Di Prinzio, A. R. 2003. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos, - Rio de Janeiro - IRD/CNEN. 345p.
- Turner, J. E., 2007. Atoms, radiation, and radiation protection. John Wiley & Sons.
- Variyar, P.S., Limaye, A., Sharma, A., 2004. Radiation-Induced Enhancement of Antioxidant Contents of Soybean (*Glycine max* Merrill). *J. Agric. Food Chem*, 52, 3385-3388. <https://doi.org/10.1021/jf030793j>

- Wang, X., Ma, R., Cui, D., Cao, Q., Shan, Z., Jiao, Z., 2017. Physio-biochemical and molecular mechanism underlying the enhanced heavy metal tolerance in highland barley seedlings pre-treated with low-dose gamma irradiation. *Sci. Rep.*, 7, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14601-8>
- Watson, E. C. 1945. The discovery of X-rays. *Am. J. Phys.*, 13, 281-291, 1945.
- Zaghdoudi, K., Ngomo, O., Vanderesse, R., Arnoux, P., Myrzakhmetov, B., Frochot, C., Guiavarc'h, Y., 2017. Extraction, identification and photo-physical characterization of persimmon (*Diospyros kaki* L.) carotenoids. *Foods*, 6, 1-15. <https://doi.org/10.3390/foods6010004>
- Zhang, L., Zheng, F., Qi, W., Wang, T., Ma, L., Qiu, Z., Li, J., 2016. Irradiation with low-dose gamma ray enhances tolerance to heat stress in *Arabidopsis* seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf*, 128, 181-188, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.025>