

**ATIVIDADE DE GLUTAMINA SINTETASE (E.C. 6.3.1.2) E
NÍVEIS DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS EM TECIDOS
DE VIOLETA AFRICANA (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.)
CULTIVADOS *IN VITRO***

VASCO LUIZ ALTAFIN

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **LUIZ ANTONIO GALLO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1998

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Altafin, Vasco Luiz

Atividade de glutamina sintetase (E.C. 6.3.1.2) e níveis de proteínas solúveis totais em tecidos de violeta africana (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.) cultivados *in vitro* / Vasco Luiz Altafin. - - Piracicaba, 1998.

43 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Cultivo "in vitro" 2. Cultura de tecido vegetal 3. Glutamina 4. Melhoramento genético vegetal 5. Planta ornamental 6. Violeta I. Título

CDD 635.933135

**ATIVIDADE DE GLUTAMINA SINTETASE (E.C. 6.3.1.2) E
NÍVEIS DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS EM TECIDOS
DE VIOLETA AFRICANA (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.)
CULTIVADOS *IN VITRO***

VASCO LUIZ ALTAFIN

Aprovada em: 07.04.1998

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

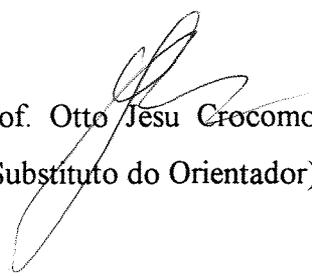
ESALQ/USP

Prof. Dr. Luiz Augusto Lucchesi

ESALQ/USP

Prof. Dr. Celso Rossi

FCA/UNESP


Prof. Otto Jesu Crocomo
(Substituto do Orientador)

À toda minha Família.

em especial

aos meus pais Alaor Altafin e Virgínia Leonora Jannuzzi Altafin

e irmãos Roberto e Claudio.

com amor e afeto

pela minha formação acadêmica e pessoal.

DEDICO

À Patricia Dário Vitti

com muito amor

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gallo pela orientação científica e amizade.

Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo pela colaboração na orientação e apoio nos momentos difíceis.

Aos Professores Dr^a Helaine Carrer e Dr. Murilo Melo pela amizade.

Ao Departamento de Botânica, especialmente aos Professores Dr. Antonio Augusto Lucchesi e Dr. Paulo Roberto de Camargo e Castro, Coordenadores do curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Aos técnicos, funcionários e colegas do CEBTEC, pelo grande apoio e amizade que se formou, além do companherismo.

À Bióloga Raquel Lordello pela ajuda no preparo dos extratos e análises bioquímicas, além da amizade.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Galli pelo grande auxílio nas análises estatísticas e estímulo no decorrer do trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste.

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 - Efeito de reguladores vegetais e concentração de sais no meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962)	4
2.2 - Características da glutamina sintetase (GS)	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 - Desinfecção do material vegetal	11
3.2 - Preparo dos meios de cultura	12
3.3 - Preparo e inoculação dos explantes	12
3.4 - Condições de cultivo dos explantes	13
3.5 - Metodologia de avaliação	13
3.6 - Preparo dos meios de cultura para desenvolvimento de plântulas	14
3.7 - Preparo dos extratos	14
3.8 - Determinação da massa de matéria fresca e massa de matéria seca	14
3.9 - Determinação do teor de proteínas solúveis totais.....	15
3.10 - Determinação da atividade da glutamina sintetase	15

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	17
Experimento 1	
4.1 - Avaliação dos métodos de desinfecção	17
4.2 - Desenvolvimento da cultura	19
4.3 - Efeito de concentrações de sais e de doses crescentes de BAP	19
Experimento 2	
4.4 - Análise do teor de proteínas totais solúveis e da enzima glutamina sintetase	22
4.4.1 - Teores de proteínas totais solúveis.....	22
4.4.2 - Atividade específica da glutamina sintetase.....	23
5. CONCLUSÕES	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
APÊNDICE	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
BAP	Benzil-amino-purina
GDH	Desidrogenase de glutamato
GOGAT	Sintase de glutamato
GS	Sintetase de glutamina
MS	Murashige & Skoog, 1962
NAA	Ácido naftalenacético
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
TRIS	Tri (hidróxi) amino metano
% MS	Porcentagem de massa de matéria seca

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Representação gráfica da análise da atividade de glutamina sintetase em extratos de <i>Saintpaulia ionantha</i> em meio de cultura MS normal (T1) e meio de cultura MS com 50% na concentração dos sais (T2)	25
2 Representação gráfica da análise da atividade de glutamina sintetase em extratos de <i>Saintpaulia ionantha</i> em meio de cultura MS acrescido de 1,7g NaNO ₃ (T3); 3,4g NaNO ₃ (T4) e 5,1g NaNO ₃ (T5)	26
3 Representação gráfica da análise da atividade de glutamina sintetase em extratos de <i>Saintpaulia ionantha</i> em meio de cultura MS acrescido de 1,07g NH ₄ Cl (T6); 2,14g NH ₄ Cl (T7) e 3,21g NH ₄ Cl (T8)	27
4 Representação gráfica da análise do teor de proteína total solúvel em extratos de <i>Saintpaulia ionantha</i> para os tratamentos T1 (MS normal) e T2 (50% da concentração dos sais MS)	28
5 Representação gráfica da análise do teor de proteína total solúvel em extratos de <i>Saintpaulia ionantha</i> em meio de cultura MS acrescido de 1,7g NaNO ₃ (T3); 3,4g NaNO ₃ (T4) e 5,1g NaNO ₃ (T5)	29
6 Representação gráfica da análise do teor de proteína total solúvel em extratos de <i>Saintpaulia ionantha</i> em meio de cultura MS acrescido de 1,07g NH ₄ Cl (T6); 2,14g NH ₄ Cl (T7) e 3,21g NH ₄ Cl (T8)	30

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Número de explantes de violeta africana (<i>Saintpaulia ionantha</i>) apresentando contaminações por fungos e/ou bactérias expostos a quatro métodos de desinfecção, após um período de uma semana de incubação em meio MS	18
2 Efeito da concentração de sais no meio MS e de níveis crescentes de BAP, na massa de matéria fresca (mg), de explantes foliares de violeta africana (<i>Saintpaulia ionantha</i>), após quatro semanas de incubação em câmara de crescimento	20
3 Efeito da concentração de sais no meio MS e de níveis crescentes de BAP, na massa de matéria seca (mg), de explantes foliares de violeta africana (<i>Saintpaulia ionantha</i>), após quatro semanas de incubação em câmara de crescimento	21
4 Análise da atividade de glutamina sintetase em extratos de <i>Saintpaulia ionantha</i> em meio de cultura MS normal (T1) e meio de cultura MS com 50% na concentração dos sais (T2)	25
5 Análise da atividade de glutamina sintetase em extratos de <i>Saintpaulia ionantha</i> em meio de cultura MS acrescido de 1,7g NaNO ₃ (T3); 3,4g NaNO ₃ (T4) e 5,1g NaNO ₃ (T5)	26
6 Análise da atividade de glutamina sintetase em extratos de <i>Saintpaulia ionantha</i> em meio MS acrescido de 1,07g NH ₄ Cl (T6); 2,14g NH ₄ Cl (T7) e 3,21g NH ₄ Cl (T8)	27

- 7 Análise do teor de proteína total solúvel em extratos de *Saintpaulia ionantha* entre os tratamentos T1 (MS normal) e T2 (50% da concentração dos sais MS) 28
- 8 Análise do teor de proteína total solúvel em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS acrescido de 1,7g NaNO₃ (T3); 3,4g NaNO₃ (T4) e 5,1g NaNO₃ (T5) 29
- 9 Análise do teor de proteína total solúvel em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS acrescido de 1,07g NH₄Cl (T6); 2,14g NH₄Cl (T7) e 3,21g NH₄Cl (T8) 30

**ATIVIDADE DE GLUTAMINA SINTETASE (E.C. 6.3.1.2) E
NÍVEIS DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS EM TECIDOS
DE VIOLETA AFRICANA (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.)
CULTIVADOS *IN VITRO***

Autor: Vasco Luiz Altafin

Orientador: Luiz Antonio Gallo

RESUMO

No presente trabalho, foram realizados dois experimentos. O experimento 1 foi desenvolvido com o objetivo de testar dois produtos para desinfecção de explantes foliares de violeta africana (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.) e uma melhor composição mineral e de regulador vegetal (benzil-amino-purina - BAP) do meio de cultura para organogênese desta espécie. Os produtos utilizados para desinfecção dos explantes foliares e suas concentrações em porcentagem foram: hipoclorito de sódio (0,4% v/v) e etanol (75% v/v). Foi utilizado como meio básico, os sais minerais e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), nas concentrações de 25, 50, 75 e 100% acrescido de concentrações crescentes de BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0m.L⁻¹). Os resultados obtidos no presente trabalho, permitem concluir que a desinfecção dos explantes com hipoclorito de sódio por um período de 20 minutos apresentou os melhores resultados, reduzindo

significativamente a contaminação das culturas. A melhor combinação foi a de 75% de sais e vitaminas em presença de 0,5 ou 1,0 mg.L⁻¹ de BAP.

O experimento também teve como objetivo testar dois sais em diferentes concentrações no meio de cultura, nitrato de sódio (1,7g ; 3,4g e 5,1g) e cloreto de amônio (1,07g ; 2,14g e 3,21g), tendo como avaliação do desenvolvimento das plântulas análises de peso da matéria fresca, peso da matéria seca, teor de proteína total e a enzima assimilatória do nitrogênio, glutamina sintetase (GS).

O experimento 2 foi realizado com o objetivo de testar fontes de nitrogênio no meio de cultura, e sua influência na síntese da enzima glutamina sintetase e proteínas solúveis totais. Os resultados obtidos permitem concluir que utilizando-se meio de cultura MS na concentração de 50% dos sais, a produção de proteínas solúveis totais e síntese de glutamina sintetase, foram superiores ao tratamento realizado com MS original.

Utilizando-se Nitrato de sódio como fonte de nitrogênio no meio de cultura, concluiu-se que nas doses intermediárias, utilizadas nos tratamentos T3 (1,7g) e T4 (3,4g), a síntese de proteínas e glutamina sintetase foram maiores.

Conclui-se que na utilização de cloreto de amônio, no meio de cultura, como fonte de nitrogênio para *S. ionantha*, a produção de proteínas solúveis totais foi maior no tratamento com maior dose desse sal (3,21g), já a síntese de glutamina sintetase foi superior no tratamento com menor concentração (1,07g).

**ACTIVITY OF GLUTAMINE SYNTHETASE (E.C.6.3.1.2) AND
LEVELS OF TOTAL SOLUBLE PROTEIN IN TISSUE OF
AFRICAN VIOLET (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.)
CULTIVATED *IN VITRO***

Author: Vasco Luiz Altafin

Adviser: Luiz Antonio Gallo

SUMMARY

Two experiments were made in this work. The experiment 1 was developed with the purpose of testing two products for sterilization of the leaf explants of african violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.) and a better mineral composition and of a vegetable regulator (benzil-amino-purina BAP) of the culture medium for organogenesis of this type. The products used for sterilizing of the leaf explants and their concentrations in percents were: Sodium hypochlorite (0,4% v/v) and ethanol (75% v/v). It was used as basic medium, the salts and medium MS (Murashige & Skoog, 1962) vitamins, with different concentrations (25, 50, 75 e 100%) plus resing concentrations of BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0m.L⁻¹). The results obtained in this work let us conclude that the sterilizing of explants as sodium hypochlorite for a period of 20 minuts showed the best results,

decreasing highly the culture contamination. The best combination was 75% of salts and vitamins with 0,5 or 1,0mg.L⁻¹ of BAP.

The experiment also aimed to test two mineral salts different concentration in the culture medium, sodium nitrate (1,7g; 3,4g e 5,1g) and ammonium chloride (1,07g; 2,14g e 3,21g) having as evaluation the plantule development. The analysis of freser weight, dry weight, total protein concentration and the nitrogen assimilatory enzyme, glutamine synthetase (GS).

The experiment two was done with the purpose of testing nitrogens sources in the medium culture and its influence on the glutamine synthetase and total soluble protein. The result obtained make us conclud that using culture medium MS in 50% concentration on the salts, the total soluble protein and glutamine synthetase synthesis, were higher than with the MS treatment.

When using sodium nitrate as nitrogen resource in the medium culture, we conclud that intermediate dosis, used in the treatments T3 (1,7g) and T4 (3,4g) the protein synthesis and glutamine synthetase were higher.

We conclud that in the ammonium chloride utilization, in the culture medium as nitrogen source for *S. ionantha*, the production of total soluble proteins was higher in the treatment with the highest dose of this mineral salt (3,21g), while the glutamine synthetase synthesis was higher in the lowest concentration treatment (1,07g).

1. INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos de plantas teve início no começo deste século, por volta de 1902, quando Haberlandt, citado por KRIKORIAN & BERQUAM (1969), cultivaram células e tecidos somáticos de várias espécies em solução nutritiva.

Dependendo da finalidade da propagação, conforme proposto por MURASHIGE (1974), a cultura de tecidos de plantas pode ser feita através de tecidos meristemáticos (gemas axilares, regiões apicais e o meristema propriamente dito), e/ou explantes não meristemáticos (pecíolos, pedúnculos e limbo foliar).

Segundo GALLO & CROCOMO (1995), a multiplicação de espécies vegetais *in vitro* apresenta as seguintes vantagens em relação aos métodos convencionais: a) propagação de clones em qualquer época do ano; b) propagação de espécies difíceis de serem propagadas pelos métodos convencionais; c) rápida multiplicação clonal de espécies vegetais valiosas; d) eliminação de vírus e outras doenças em plantas infectadas.

O valor comercial de determinadas espécies vegetais, tem estimulado pesquisas visando aumentar a produtividade e reduzir o tempo de propagação. A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por MOREL (1960) ao multiplicar orquídeas através da cultura de ápices caulinares e regeneração de

protocormos, diminutas estruturas que se diferenciavam e davam origem a embriões. A sucessiva divisão destes protocormos possibilitou acelerar o processo de propagação de orquídeas. Trabalhos nessa linha de pesquisa incentivam a utilização desta técnica para outras espécies vegetais como por exemplo a propagação de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*), uma espécie ornamental muito utilizada atualmente. A produção desta espécie *in vitro* ainda é um método pouco utilizado comercialmente pelos produtores, fato este que pode ser explicado pela facilidade de propagação convencional, e principalmente pela falta de protocolos bem definidos e economicamente viáveis.

Deve-se enfatizar que a violeta africana é uma das culturas micropropagadas por mais de 250 laboratórios comerciais de plantas e institutos de pesquisa que trabalham com culturas que variam desde fibras e espécies florestais, até hortaliças e plantas ornamentais (JONES, 1987). Uma revisão com discussão sobre produção de plantas ornamentais na França (BOUZIGUES, 1987), destacou os gêneros *Saintpaulia* e a *Gerbera* como as mais importantes espécies micropropagadas e produzidas em todo o mundo.

Para a otimização da propagação *in vitro* dessa espécie ornamental os meios de cultura devem conter determinados compostos químicos, entre eles os nitrogenados sejam minerais ou orgânicos, os quais tem grande influência no metabolismo das células, comprometidos que estão na síntese de proteínas e outras macromoléculas. Um dos componentes nitrogenados presente no meio de cultura é o N amoniacal, o qual influencia o nível de ação de glutamina sintetase, uma das enzimas

comprometidas na assimilação do N pelas células vegetais, levando posteriormente à síntese de proteínas.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a adequação do meio de cultura com vistas a contribuir para o melhor controle da diferenciação celular de violeta africana, bem como o de acompanhar ao longo de um tempo a atividade de glutamina sintetase e a formação de proteínas solúveis nas células dessa espécie ornamental mantida *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Efeito de reguladores vegetais no meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962)

Os substratos convencionais para formação de mudas de violeta africana segundo TOMBOLATO *et alii* (1987 a) , apresentam variações quantitativas e qualitativas, referentes ao pegamento e a qualidade fitossanitária das mesmas. Dentre os fatores envolvidos, estão a drenagem ineficiente e a presença de fitopatógenos veiculados por substratos orgânicos. Além da natureza do substrato, o tipo de material vegetativo influencia diretamente na formação de novas mudas. TOMBOLATO *et alii* (1987 b), trabalhando com sete tipos diferentes de explantes vegetais de violeta africana, mostraram que o tamanho do limbo foliar utilizado influencia diretamente a formação de novas plantas, sendo este muitas vezes, o fator limitante no processo de propagação.

Técnicas de cultura de tecidos na propagação de violeta africana, já foram utilizadas experimentalmente por TAKEBAYASHI *et alii* (1987). Os resultados obtidos, embora não conclusivos, mostraram evidências de que a utilização de tecidos de folhas desinfestados previamente com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% e Tween 80 a 0,1% por cinco minutos inoculados em meio MS acrescido de cinetina (0,2

mg.L⁻¹) e ácido naftalenacético (0,2 mg.L⁻¹), apresentaram organogênese dos explantes, concluindo que, a partir de apenas cinco folhas de violeta africana, podem ser obtidos após cinco meses de cultivo, aproximadamente 1.000 mudas. Entretanto, estes autores sugerem a necessidade de protocolos mais precisos e definidos para propagação desta espécie.

CASSELLS *et alii* (1986) propuseram uma triagem para diferenciar a resposta de folhas jovens de cultivares de violeta africana em meio de cultura desenvolvido para cultivares de rosa, contendo desde meio sem reguladores vegetais até várias combinações de NAA e BAP. Os resultados obtidos com este cultivo axênico de folhas mostraram grande variação tanto qualitativa quanto quantitativa no potencial morfogenético dos cultivares. Estes autores discutem, no contexto do desenvolvimento de um protocolo para violeta africana, a necessidade de meios de cultura específicos para a propagação desta espécie.

CHANG (1985) utilizou, para micropropagação rápida de violeta africana, segmentos de folhas com 1cm² cultivados em meio MS acrescido de BAP, NAA, sacarose (3%) e ágar (0,7%) em pH 6,0. Quando as brotações apresentaram 2 cm de altura, elas foram transplantadas para um meio de enraizamento (contendo 50% da concentração de sais MS, 0,005-0,5 mg.L⁻¹ de NAA, 2% de sacarose, 0,6 % de ágar em pH 6,0), e cultivados a 25-28°C, sob fotoperíodo de 8 a 10 horas/dia. Este trabalho, embora tenha descrito uma metodologia para micropropagação de violeta africana, não discute a eficiência do meio de cultura na produção dessa espécie.

CHEN *et alii* (1987) verificando o efeito de alguns reguladores de crescimento na morfogênese de cultura somática de *S. ionantha*, utilizaram plântulas provenientes de pecíolos de folhas obtidas através de calos desenvolvidos em meio MS, contendo 0,5-2,0 mg.L⁻¹ de cinetina e 0,1 a 0,5 mg.L⁻¹ de NAA. Posteriormente, estas plântulas foram inoculadas em meio MS contendo 0,5 a 2,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 a 0,5 mg.L⁻¹ de NAA, o qual induziu o desenvolvimento de pequenos brotos. Estes brotos obtidos foram novamente transferidos para meio MS contendo 0,05 a 0,2 mg.L⁻¹ de cinetina e 0,05 a 0,2 mg.L⁻¹ de NAA. Esta sequência de meios utilizada, segundo estes autores, produziu mudas com raízes mais fortes que os demais tratamentos.

IOANNOV (1987) trabalhando com micropropagação de violeta africana testou algumas modificações do meio MS, utilizando como explantes pecíolos e limbo foliar. A melhor indução de brotos em ambos os tipos de explantes foi no meio MS acrescido com 30,0 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina, 0,4 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de NAA, e a fase de multiplicação foi melhor no mesmo meio, porém na ausência de NAA. Após incubação em câmara de crescimento, foi obtido uma média de mais de 500 plantas produzidas a partir de um explante retirado do pecíolo ou limbo foliar em sete meses de cultivo.

ZHANG *et alii* (1986) trabalhando com *S. in vitro*, testaram variações nas concentrações de BAP e NAA para embriogênese somática e crescimento de calos, usando BAP entre 0 e 10,0 mg.L⁻¹ e NAA entre 0 e 5,0 mg.L⁻¹. Os resultados obtidos por estes autores demonstraram melhor embriogênese somática em meio de cultura com 5,0 mg.L⁻¹ de BAP e melhor desenvolvimento de calos com 0,2 mg.L⁻¹ de NAA.

SANDERSON & McGUIRE (1988) utilizaram reguladores vegetais pulverizados durante a propagação de violeta africana. Dos vários reguladores testados exogenamente, os que apresentaram melhores resultados na emergência de gemas (maiores que 12,5 mm de comprimento), foram ácido giberélico na concentração de 50 mg.L⁻¹ com piranil-benzil-adenina na concentração de 100 mg.L⁻¹. Este trabalho mostra a possibilidade de se utilizar giberelinas e citocininas como alternativas na propagação de violeta africana.

REIST & LE (1987) avaliaram a viabilidade econômica e a rapidez na propagação *in vitro* em vários lotes de violeta africana, e discutiram os custos e o tempo de produção para esta espécie. Estes autores utilizaram um protocolo para micropropagação desta cultura, com o qual obtiveram 3 a 15 plântulas a partir de cada tufo após 3 a 4 semanas de incubação. Os custos de produção se tornaram inviáveis em 2 lotes de plântulas que apresentaram clorose, a qual foi atribuída a má qualidade da turfa utilizada como substrato.

SCHULZE (1988) trabalhando com propagação *in vitro* e aclimação em um viveiro comercial, descreve duas técnicas de micropropagação para violeta africana, partindo de culturas de segmentos de folhas, até o alongamento de gemas e aclimação em casa-de-vegetação. Este autor cita como vantagens desta técnica, qualidade fitossanitária, o valor comercial e a redução no tempo para desenvolvimento, aclimação e produção das mudas.

2.2. Características da Glutamina Sintetase (GS)

Segundo MIFLIN & LEA, 1980; McNALLY *et al.*, 1983; HIREL *et al.*, 1984, a Glutamina Sintetase (GS) (EC 6.3.1.2) é considerada a principal rota de assimilação de amônia em plantas, ocorrendo em diferentes isoformas e localizações.

MAGALHÃES & HUBER (1989), trabalhando com milho, observaram maior atividade da GS e GDH (Desidrogenase Glutâmica) nas raízes. Com o pH do meio corrigido com a adição de CaCO_3 , ocorreu um aumento da atividade da GS foliar, enquanto que nas raízes a atividade, tanto de GS quanto de GDH, decresceu. Segundo os autores, a atividade de GS é estimulada pela absorção de NH_4^+ , com a queda do valor do pH.

Cultivando plântulas de milho em presença de NH_4Cl , HANDA *et al.* (1985), coletou amostras nos 3, 8, 13, 18 e 23 dias de cultivo depois da germinação, e observou aumento na taxa de crescimento da plântula a cada estágio de avaliação. A atividade de GS modificou-se apenas a partir do 18º dia, indicando que a assimilação de nitrogênio nos primeiros dias de crescimento seria consequência da atividade da GDH.

Com relação à atividade das enzimas Glutamina Sintetase (GS) e Desidrogenase Glutâmica (GDH), segundo CÁNOVAS *et al.* (1986), trabalhando com diferentes tecidos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Hellfrucht Frühstamm), obteve atividade mais alta da GS em folhas e GDH em raízes, aos 40 dias da semeadura. Em condições *in vitro*, a atividade da GS decresce com o aumento de concentrações de ácido *p*-chloromercuribenzoic. e podem também ser reguladas por transições no fotoperíodo entre luz/escuro. CÁNOVAS *et al.* (1991), trabalhando com embriões de

Pinus pinaster, observaram atividades de GS em elevação durante a germinação, na ausência ou presença de luz.

SUZUKI *et al.* (1981) em experimentos realizados com raízes de cinco espécies vegetais (milho, arroz, soja, ervilha e cevada), determinaram que o local de ação da enzima GS é no citossol.

Calos provenientes de folhas e raízes de *Bouvardia ternifolia* foram desenvolvidos em meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com fontes diferentes de Nitrogênio. JIMÉNEZ & FERNÁNDEZ (1983), observaram que em presença de glutamina 5mM, ocorria um retardamento no crescimento dos diferentes calos. Em presença de NO_3^- 20mM, havia um crescimento elevado. A atividade da GS foi encontrada em níveis altos quando na presença de succinato, malato ou citrato, no meio de cultura MS. A atividade específica da enzima GS é reduzida na presença de glutamina no meio de crescimento (RHODES *et al.*, 1975).

Um procedimento relativamente rápido de cinco etapas foi usado na purificação da GS da raiz e uma forma da enzima GS₁ de folhas da cultura do arroz (IYER *et al.*, 1981). As etapas foram, preparação de extratos brutos, precipitação de sulfato de amônio, filtração em Sepharose 4B, fracionamento em DEAE-Sephadex A25 e cromatografia em ADP-Sepharose 4B. A proteína purificada apareceu como uma banda simples na eletroforese com gel de poliacrilamida. Também trabalhando com arroz, HIREL & GADAL (1980), encontraram as mesmas relações entre as diferentes isoformas desta enzima. HIREL *et al.* (1982), observaram valores de atividade da GS₂ cinco vezes maior em folhas maduras que em tecidos estiolados em arroz.

As atividades da GS₁ e GS₂ estão distribuídas proporcionalmente entre cloroplastos e citossol, nos tecidos fotossintetizantes (RATHNAM & EDWARDS, 1976). Em folhas de sorgo, HIREL & GADAL (1982), mostraram uma atividade maior para GS₁ (67%) em relação à GS₂ (33%).

Segundo BEEVERS & STOREY (1976), a enzima GS é solúvel e específica para glutamina como doador de amida, possuindo alta atividade com NADH e baixa com NADPH como doador de elétrons.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1:

3.1. Desinfecção do material vegetal

Mudas de violeta africana adquiridas em um viveiro comercial no município de Piracicaba - SP, foram trazidas para o Laboratório de Biotecnologia do CEBTEC - ESALQ, com a finalidade de servir como matrizes para o processo de micropropagação. Estas mudas tiveram suas folhas destacadas e desinfectadas utilizando-se soluções de hipoclorito de sódio e etanol.

Tratamento 1 - Solução de hipoclorito de sódio 0,4% v/v preparada a partir de produto comercial (água sanitária com 2,0% de cloro ativo), por um período de 20 minutos;

Tratamento 2 - Solução de hipoclorito de sódio 0,4% v/v preparada a partir de produto comercial (água sanitária com 2,0% de cloro ativo), por um período de 10 minutos;

Tratamento 3 - Solução de etanol 75% v/v, durante um período de 20 minutos ;

Tratamento 4 - Solução de etanol 75% v/v por 5 minutos seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,4% v/v (vide tratamento 2).

Todo o processo de desinfecção foi realizado em condições assépticas, em balcão previamente limpo com álcool, e vidrarias e instrumentos de corte flambados e/ou esterilizados em autoclave. Após os tratamentos, os explantes foram enxaguados três vezes em água deionizada esterilizada sob condições assépticas.

3.2. Preparo dos meios de cultura

Foi utilizado como meio básico para teste de concentrações crescentes de BAP, os sais minerais e vitaminas do meio MURASHIGE & SKOOG (1962). Os sais que compõem este meio foram testados em quatro concentrações (25, 50, 75 e 100%) combinadas com quatro concentrações do regulador vegetal BAP (0; 0,5; 1,0 e 2,0mg.L⁻¹), compondo um experimento fatorial de quatro concentrações de sais com quatro concentrações de BAP.

Todos os meios de cultura foram acrescidos de 30,0 g.L⁻¹ de sacarose, o pH ajustado para 5,7 e logo após foi adicionado 7,0 g.L⁻¹ de ágar. Os meios foram distribuídos em alíquotas de 50 ml em frascos de 300 ml, os quais foram fechados com alumínio laminado e autoclavados por 20 minutos à temperatura de 120°C sob 1 atm de pressão.

3.3. Preparo e inoculação dos explantes

As folhas que passaram por quatro diferentes processos de desinfecção, foram cortadas em condições estéreis dentro de câmara de fluxo laminar, em pedaços de

1 cm² em placas de Petri contendo água destilada deionizada esterilizada. Os explantes, foram então inoculados nos meios de cultivo previamente autoclavados.

3.4. Condições de cultivo dos explantes

Após a inoculação dos explantes no meio de cultura, os mesmos foram incubados em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro), à temperatura de 25 ± 2°C, por um período de quatro semanas, após o qual este material foi retirado do meio para as avaliações.

3.5. Metodologia de avaliação

Avaliação da eficiência dos métodos de desinfecção

Os quatro métodos de desinfecção utilizados, foram visualmente avaliados após uma semana de cultivo nos meios com diferentes níveis de sais e regulador vegetal, através da contagem do número de explantes contaminados com fungos e/ou bactérias.

O desenvolvimento da cultura após quatro semanas de cultivo *in vitro* foi acompanhado através da determinação da massa de matéria fresca e da massa de matéria seca. Após a pesagem do material fresco, este foi colocado em estufa a 60°C, até atingir peso constante, para determinação da massa de matéria seca.

Experimento 2:

3.6. Preparo dos meios de cultura para o desenvolvimento das plântulas.

Para este segundo experimento onde foram analisados teores de proteínas solúveis totais e a enzima assimilatória de nitrogênio glutamina sintetase, usou-se meio de cultura MS normal e modificado. Foi preparado 1 litro de meio de cultura para cada tratamento.

Para os tratamentos T1 e T2, utilizou-se meio de cultura MS nas concentrações, normal e 50% dos sais, respectivamente. Para os tratamentos T3, T4 e T5, a solução 1 contendo nitrato de amônio (NH_4NO_3) foi substituída por nitrato de sódio (NaNO_3) nas concentrações 1,7g , 3,4g e 5,1g respectivamente. Para os tratamentos T6, T7 e T8 foram excluídas as soluções 1 e 2 (NH_4NO_3 e KNO_3 , respectivamente) e acrescentado ao meio de cultura cloreto de amônio (NH_4Cl) nas doses 1,07g , 2,14g e 3,21g respectivamente.

3.7. Preparo dos extratos

Foi retirado 1,0g de material fresco de cada tratamento e homogeneizado durante 2 minutos em almofariz acondicionado em recipiente com gelo. O tampão utilizado foi TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5 acrescentado de β -mercaptoetanol 2 mM e EDTA 1 mM.

O material homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado como extrato nas análises bioquímicas. A centrifugação foi feita a 0° C em centrífuga refrigerada SORVAL modelo RC5C com rotor SM-24.

3.8. Determinação da massa de matéria fresca e massa de matéria seca

Para a determinação da massa de matéria fresca e seca, foram pesadas 10 plântulas de cada tratamento, e colocadas em estufa de secagem marca FANEM modelo 001-M/1, a 50^o C por 72 horas. Partes da matéria fresca foram utilizadas às determinações de teores proteicos e atividade da enzima GS.

3.9. Determinação do teor de proteínas pelo método BRADFORD (1976).

Baseado no método de BRADFORD (1976), os extratos do material estudado foram preparados com tampão TRIS, utilizando-se uma alíquota de 0,1ml do extrato diluído cinco vezes, acrescido em tubo de ensaio contendo 5,0ml do reagente de BRADFORD, que deu origem a uma mistura colorida a qual foi lida no espectrofotômetro HITACHI modelo U-3210 a 595nm.

O reagente de BRADFORD provém de 100mg de COMASSIE BRILLIANT BLUE G-250 diluído em 50ml de etanol a 95% v/v, acrescido de 100ml de H₃PO₄ a 85% v/v, e aferido para 1,0 litro com água deionizada. O reagente foi filtrado duas vezes em papel de filtro qualitativo de marca REAGEN.

Basicamente o teor de proteínas das amostras foram calculados a partir da amostra de uma curva padrão feita com albumina de soro bovino (BSA).

3.10. Determinação da atividade da glutamina sintetase

Para a determinação desta enzima foi utilizado o método ELLIOT (1953), conduzindo a reação sob agitação contínua em banho maria a 30°C durante 30 minutos, contendo 0,7ml de tampão TRIS-HCl 200mM, pH 7,5 ; 0,2ml de ATP 50mM, pH 7,0 ;

0,5ml de glutamato de sódio 500mM ; 0,1ml de $MgSO_4$ 1M ; 0,1ml de caseína 100mM; 0,3ml de hidroxilamina 100mM, pH 7,0 ; 0,1ml de extrato; totalizando um volume de 2,0ml.

Decorrido o tempo de 30 minutos em banho maria, a reação foi interrompida pela adição de 2,0ml de reagente de cloreto férrico - $FeCl_3$ (10%) TCA (24%) HCl (6N), 1:1:1 - formando um complexo marrom-amarelado.

A mistura foi centrifugada a 3.000 g e no sobrenadante foi feita a leitura a 540nm em espectrofotômetro HITACHI modelo U-3210.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1

4.1. Avaliação dos métodos de desinfecção

Os resultados obtidos para os métodos de desinfecção utilizados, mostram um efeito melhor no tratamento com hipoclorito de sódio exposto por um período de 20 minutos (Tabela 1). Estes resultados mostram que este tratamento foi superior aos demais, pelo fato de ter apresentado um menor número de fungos e bactérias contaminantes no meio, e uma maior sobrevivência e desenvolvimento dos explantes.

Os resultados obtidos, embora mostrem um efeito relativamente eficiente para o tratamento com etanol 75% por um período de 20 minutos, não permitiram a utilização deste método para a desinfecção dos explantes, uma vez que a exposição ao etanol por este período afetou a multiplicação celular causando a morte dos explantes.

Quanto aos outros dois tratamentos, a eficiência destes foi relativamente menor que o tratamento com hipoclorito de sódio exposto por um período de 20 minutos.

Tabela 1 - Número de explantes* de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) apresentando contaminações por fungos e/ou bactérias expostos a quatro métodos de desinfecção, após um período de uma semana de incubação em meio MS.

Tratamento	fungos	bactérias
NaClO 0,4%** por 20'	7,0 b ***	5,0 b
NaClO 0,4% por 10'	12,0 a	8,0 b
Etanol 75% por 20'	3,0 c	9,0 b
Etanol 75% por 5' + NaClO 0,4% por 10'	7,0 b	13,0 a
C.V.(%)	17,94	21,21

* Média de 20 explantes foliares avaliados por tratamento.

** Vide Material e Métodos.

*** Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

4.2. Desenvolvimento da cultura

O desenvolvimento da cultura após 4 semanas de cultivo *in vitro* foi acompanhado através da determinação da massa de matéria fresca e da massa de matéria seca. Após a pesagem do material fresco, este foi colocado em estufa a 60°C, até atingir peso constante, para determinação da massa de matéria seca, cujos resultados são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

4.3. Efeito de concentrações de sais e de doses crescentes de BAP

Os resultados obtidos para os efeitos de concentrações de sais no meio MS combinados com níveis crescentes de BAP indicam que o regulador vegetal BAP é necessário para o desenvolvimento de explantes foliares de violeta africana nos níveis intermediários testados, em concentrações que devem estar entre 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, em presença de 50%, 75% ou 100% de sais de MS. Entretanto, por razões econômicas, estes resultados indicam que é viável a utilização do meio MS com 75% da concentração original de sais.

A concentração de sais do meio MS influenciou o aumento da massa de matéria fresca dos explantes, a partir de 50% da concentração original deste. A concentração de BAP no meio também influenciou este aumento de massa, sendo os melhores resultados obtidos nas doses de 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹. Estes resultados, obtidos nos tratamentos 10; 11; 14 e 15 os quais estão plotados na Tabela 2, evidenciam estes efeitos.

Tabela 2 - Efeito da concentração de sais no meio MS e de níveis crescentes de BAP, na massa de matéria fresca (mg), de explantes* foliares de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*), após quatro semanas de incubação em câmara de crescimento.

	mg/L de BAP			
	0,0	0,5	1,0	2,0
25% de sais do meio MS	620 g**	700 f	830 e	870 e
50% de sais do meio MS	680 fg	840 e	1007 cd	860 e
75% de sais do meio MS	710 f	1202 b	1180 b	1060 c
100% de sais do meio MS	700 f	1270 a	1160 b	980 d

C.V. = 2,81%

* Média de 20 explantes foliares avaliados por tratamento.

** Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Os resultados observados para o aumento da massa de matéria seca dos explantes, obtidos nestes mesmos tratamentos, plotados na Tabela 3 também confirmam esta hipótese, sugerindo que deve existir uma interação entre as concentrações de sais minerais e os níveis de regulador vegetal utilizados.

Tabela 3 - Efeito da concentração de sais no meio MS e de níveis crescentes de BAP, na massa de matéria seca (mg), de explantes* foliares de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*), após quatro semanas de incubação em câmara de crescimento.

	mg/L de BAP			
	0,0	0,5	1,0	2,0
25% sais do meio MS	48 g**	50 g	60 fg	65 f
50% sais do meio MS	48 g	66 f	96 e	67 f
75% sais do meio MS	60 fg	119 bc	115 bcd	110 cd
100% sais do meio MS	57 fg	140 a	128 ab	102 de

C.V. = 6,21 %

* Média de 20 explantes foliares avaliados por tratamento.

** Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Para se definir um nível ótimo para o desenvolvimento de explantes de *S. ionantha*, é necessário fazer cultivos sucessivos de um mesmo material nos meios testados, até que a concentração destes sais minerais e regulador vegetal estejam em equilíbrio no material vegetal. Entretanto, estes resultados indicam que os limites nas

concentrações de BAP no meio de cultivo estão abaixo de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, concentração esta, abaixo do que vem sendo utilizado por alguns pesquisadores que trabalharam com violeta africana, levantados na revisão bibliográfica do presente trabalho (CHEN *et alii*, 1987; ZHANG *et alii*, 1986).

Experimento 2

4.4 - Análise do teor de proteínas solúveis totais e da enzima glutamina sintetase

4.4. 1 - Teores de proteínas solúveis totais

Comparação entre T1 e T2:

Conforme dados plotados na Tabela T7, nota-se que o tratamento T2 constituído por 50% dos sais do meio MS, possui maior quantidade de proteína total com relação ao tratamento T1 com a formulação original do meio de cultura MS, até os 30 dias da inoculação, período este ideal para transferência de substrato. A representação gráfica pode ser vista na Figura 4.

Comparação entre T3, T4 e T5:

Nota-se que na dose intermediária de nitrato de sódio (3,4g), utilizado para o tratamento T4, até os 30 dias, o teor de proteína total foi o maior, conforme a Tabela 8 e representado graficamente na Figura 5.

Comparação entre os tratamentos T6, T7 e T8:

De acordo com os dados plotados na Tabela 9, observa-se que o tratamento T8 foi o qual apresentou os maiores níveis de proteínas totais até o final do experimento aos 50 dias. Pode-se notar uma queda nos níveis de proteína, em todos os tratamentos a partir dos 20 dias da inoculação, sugerindo uma resposta negativa ao cloreto de amônio, com relação ao crescimento da plântula.

4.4.2 - Atividade específica da glutamina sintetase

Comparação entre T1 e T2:

Observa-se na Figura 1 que os níveis da enzima glutamina sintetase foram significativamente maiores no tratamento T2, com 50% da concentração dos sais do meio de cultura MS, até 40 dias de desenvolvimento em sala de crescimento, sendo este o período máximo antes da transferência da plântula para outro substrato. A Tabela 4 mostra os altos níveis da enzima no tratamento T2 com relação ao T1.

Comparação entre os tratamentos T3, T4 e T5:

Nos tratamentos T3, T4 e T5, a solução 1 (NH_4NO_3) foi substituída por NaNO_3 em três níveis crescentes (1,7g ; 3,4g e 5,1g respectivamente), sendo que as demais soluções foram as originais do meio de cultura MS. Nota-se que o tratamento T3 sintetizou mais a enzima GS, seguida do tratamento T4, conforme os dados plotados na Tabela 5 e representado graficamente na Figura 2. Os níveis de GS no tratamento T5, permaneceram praticamente constantes utilizando-se 5,1g de NaNO_3 .

Comparação entre os tratamentos T6, T7 e T8:

Nos tratamentos T6, T7 e T8, as soluções, 1 (NH_4NO_3) e 2 (KNO_3) foram substituídas por doses crescentes de NH_4Cl (1,07g ; 2,14g e 3,21g respectivamente), observando-se que o tratamento com menor dose de NH_4Cl , foi o qual apresentou maior síntese da enzima GS, conforme os números plotados na Tabela 6 e representados graficamente na Figura 3.

Tabela 4 - Análise da atividade de glutamina sintetase em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS normal (T1) e meio de cultura MS com 50% na concentração dos sais (T2).

	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4	COLETA 5
T1	132,95 b*	273,08 b	480,78 b	433,41 b	712,98 a
T2	341,28 a	460,09 a	740,91 a	677,88 a	685,21 a

D.M.S. = 13,32

C.V. = 2,70%

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Figura 1 - Representação gráfica da análise da atividade de glutamina sintetase em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS normal (T1) e meio de cultura MS com 50% na concentração dos sais (T2).

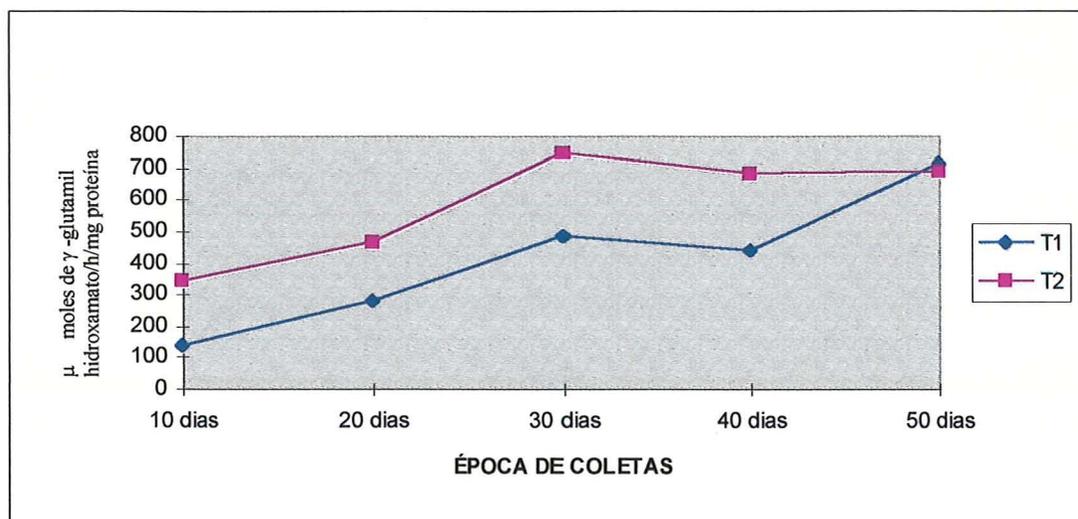


Tabela 5 - Análise da atividade de glutamina sintetase em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS acrescido de 1,7g NaNO₃ (T3); 3,4g NaNO₃ (T4) e 5,1g NaNO₃ (T5).

	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4	COLETA 5
T3	360,63 b*	500,09 a	957,95 a	546,08 a	555,23 a
T4	444,11 a	430,72 a	740,55 b	509,22 a	552,98 a
T5	254,89 c	489,71 a	520,27 c	539,29 a	593,17 a

D.M.S. = 36,40

C.V. = 5,89%

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Figura 2 - Representação gráfica da análise da atividade de glutamina sintetase em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS acrescido de 1,7g NaNO₃ (T3); 3,4g NaNO₃ (T4) e 5,1g NaNO₃ (T5).

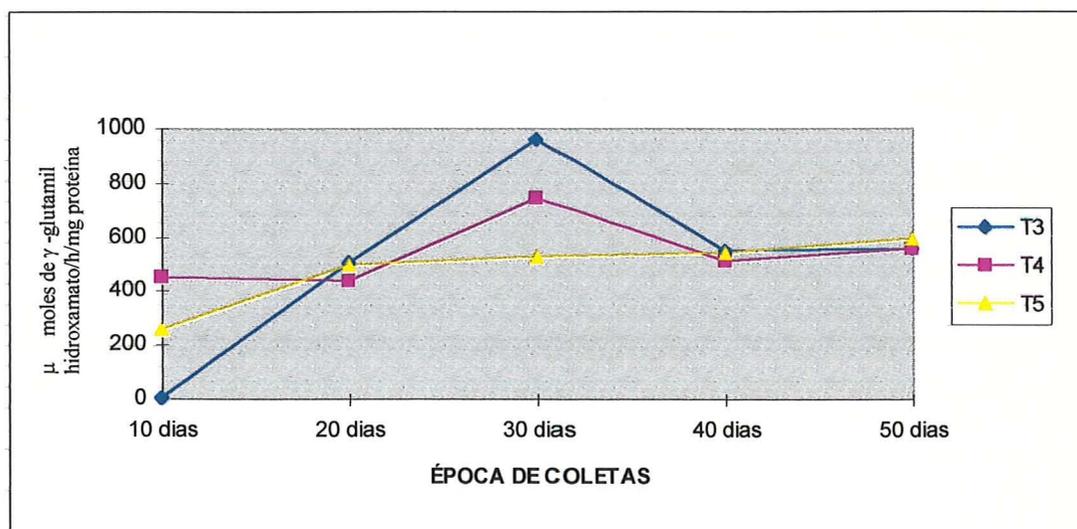


Tabela 6 - Análise da atividade de glutamina sintetase em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio MS acrescido de 1,07g NH₄Cl (T6); 2,14g NH₄Cl (T7) e 3,21g NH₄Cl (T8).

	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4	COLETA 5
T6	401,74 a*	579,45 a	729,09 a	555,81 a	615,09 a
T7	236,12 b	264,21 c	567,34 b	341,09 c	476,14 b
T8	372,93 a	449,02 b	710,48 a	430,07 b	573,31 a

D.M.S. = 32,76

C.V. = 5,80%

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Figura 3 - Representação gráfica da análise da atividade de glutamina sintetase em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS acrescido de 1,07g NH₄Cl (T6); 2,14g NH₄Cl (T7) e 3,21g NH₄Cl (T8).

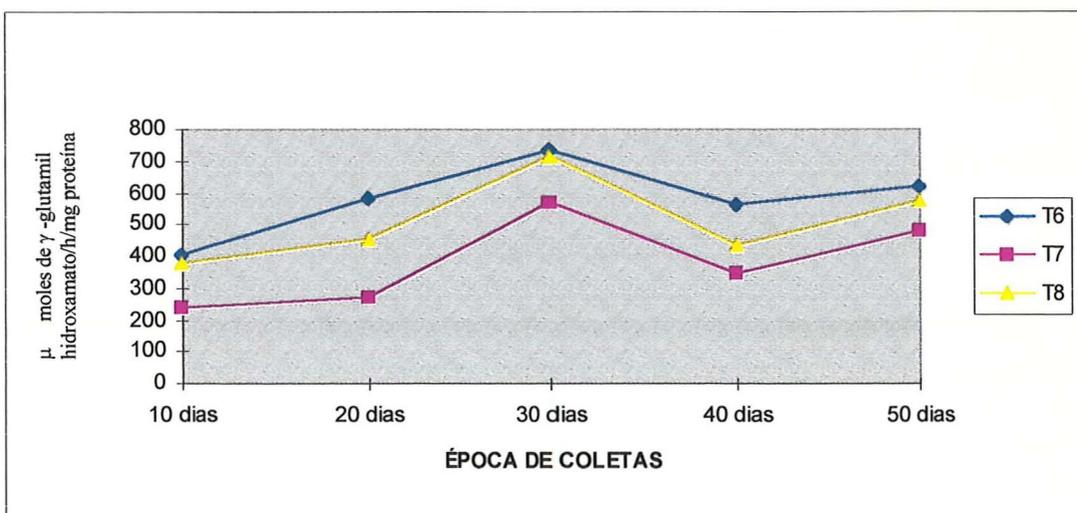


Tabela 7 - Análise do teor de proteína total solúvel em extratos de *Saintpaulia ionantha* entre os tratamentos T1 (MS normal) e T2 (50% da concentração dos sais MS).

	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4	COLETA 5
T1	46,01 b*	27,19 b	34,27 a	29,18 a	30,88 a
T2	69,53 a	66,23 a	37,12 a	23,29 a	23,36 a

D.M.S. = 4,84

C.V. = 12,57%

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Figura 4 - Representação gráfica da análise do teor de proteína total solúvel em extratos de *Saintpaulia ionantha* para os tratamentos T1 (MS normal) e T2 (50% da concentração dos sais MS).

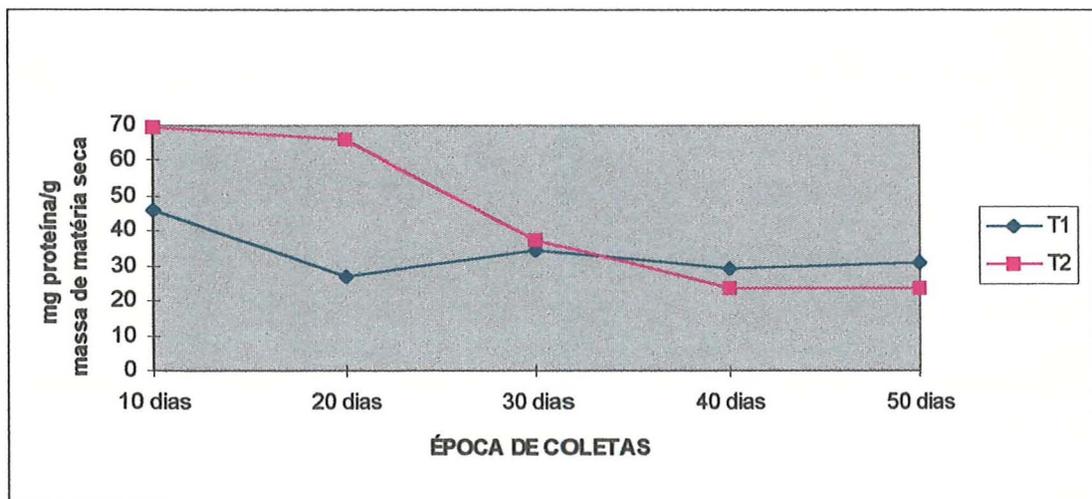


Tabela 8 - Análise do teor de proteína total solúvel em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS acrescido de 1,7g NaNO₃ (T3); 3,4g NaNO₃ (T4) e 5,1g NaNO₃ (T5).

	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4	COLETA 5
T3	60,72 a*	32,52 b	36,98 a	23,25 b	15,97 b
T4	63,79 a	58,73 a	28,56 a	30,54 ab	19,71 b
T5	28,82 b	64,32 a	44,22 a	47,14 a	41,66 a

D.M.S. = 9,02 C.V. = 19,51%

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Figura 5 - Representação gráfica da análise do teor de proteína total solúvel em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS acrescido de 1,7g NaNO₃ (T3); 3,4g NaNO₃ (T4) e 5,1g NaNO₃ (T5).

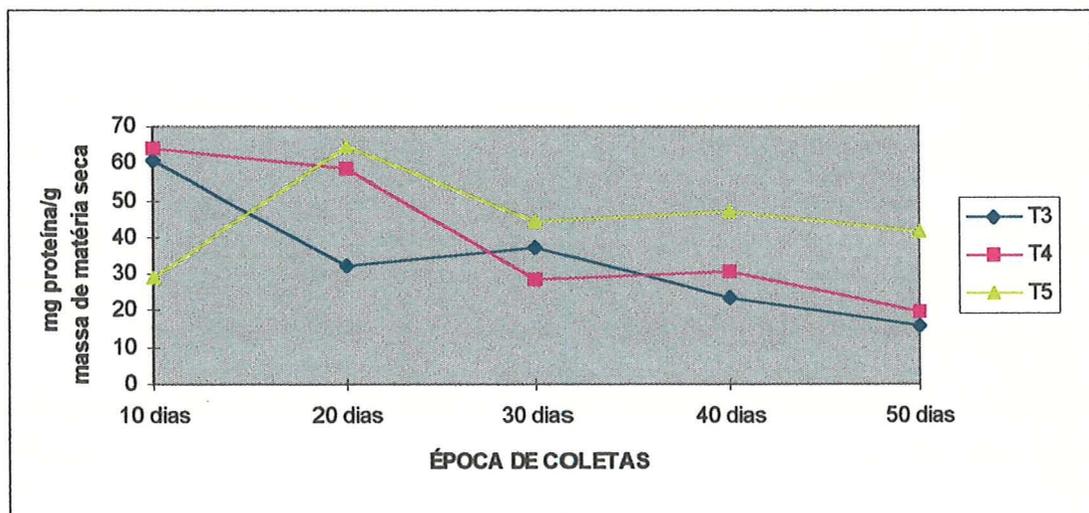


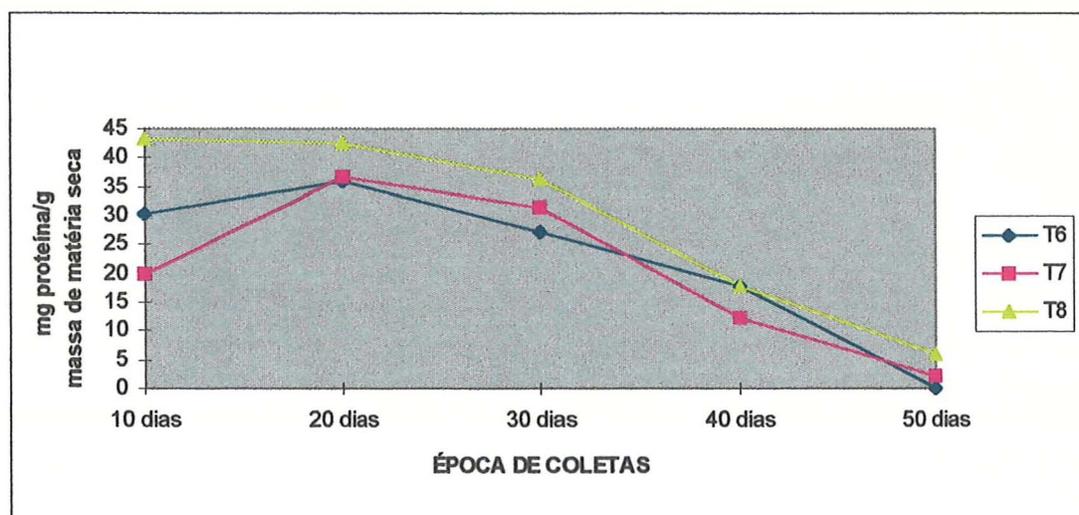
Tabela 9 - Análise do teor de proteína total solúvel em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS acrescido de 1,07g NH₄Cl (T6); 2,14g NH₄Cl (T7) e 3,21g NH₄Cl (T8).

	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4	COLETA 5
T6	30,48 b*	35,83 b	27,32 b	17,69 a	0,03 b
T7	19,91 c	36,64 b	31,51 ab	12,06 b	1,94 ab
T8	43,12 a	42,62 a	36,16 a	17,76 a	5,97 a

D.M.S. = 2,11 C.V. = 7,63%

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Figura 6 - Representação gráfica da análise do teor de proteína total solúvel em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS acrescido de 1,07g NH₄Cl (T6); 2,14g NH₄Cl (T7) e 3,21g NH₄Cl (T8).



CONCLUSÕES

Experimento 1

Os resultados obtidos no presente trabalho, permitem concluir que:

- a) a desinfecção dos explantes foliares de violeta africana com hipoclorito de sódio a 0,4% v/v por 20 minutos foi o melhor tratamento testado, reduzindo significativamente as contaminações durante o cultivo, sem afetar a sobrevivência dos explantes;
- b) os sais do meio MS podem ser utilizados em até 75% da concentração original sem influenciar negativamente na organogênese dos explantes foliares;
- c) a concentração ótima de BAP para organogênese de violeta africana *in vitro* está entre 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹.

Experimento 2

Os resultados obtidos das análises do teor de proteínas solúveis totais e glutamina sintetase, permitem concluir que:

- a) Utilizando-se 50% da concentração dos sais MS (T2), o teor de proteínas solúveis totais foi significativamente maior com relação ao tratamento T1 constituído de meio de cultura MS original;

- b) Substituindo-se nitrato de amônio (Solução 1 do meio de cultura MS) por Nitrato de sódio, nota-se que a dose de 3,4g (T4), foi a que produziu maiores teores de proteínas solúveis totais;
- c) Observa-se que a utilização de cloreto de amônio no meio de cultura para desenvolvimento de plântulas de *S. ionantha*, a partir de 20 dias da inoculação, tornou-se prejudicial à síntese de proteínas, sendo que o tratamento T8 foi o qual apresentou maiores teores;
- d) O tratamento T2 (50% dos sais MS) foi o qual apresentou maiores níveis de glutamina sintetase.
- e) O tratamento T3 (3,4g de nitrato de sódio) possibilitou maior síntese de glutamina sintetase;
- f) O tratamento T6 (1,07g de cloreto da amônio) que continha a menor dose desse sal, foi o qual apresentou maiores níveis da enzima estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEEVERS, L.; STOREY, R. Glutamate synthetase in developing cotyledons of *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, Rockville, 57:862-866, 1976.
- BOUZIGUES, P. *In vitro* plant production for ornamental horticulture in France. **P.H.M. Revue Horticole**. 277: 15-23. 1987.
- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, 72: 248-354, 1976.
- CALDAS, R. A.; CALDAS, L.S. - Nitrate, ammonium and kinetin effects on growth and enzyme activities of Paul's Scarlet Rose callus. **Physiol. Plant**. 37:111-116.
- CALDAS, L. S.; HARIDASSAN, P.; FERREIRA, E. F. Meios nutritivos. *In: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. TORRES, A. C. & CALDAS, L. S. Brasília. 1990. 433 p.

CÁNOVAS, F.M.; AVILA, C.; BOTELLA, J. R.; VALPUESTA, V.; CASTRO, I. N. Effect of light-dark transition on glutamine synthetase activity in tomato leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 66: 648-652, 1986.

CÁNOVAS, F.M.; CANTON, F. R.; GALARDO, F.; GARCIA-GUTIERREZ, A.; VICENTE, A. D.; DE-VICENTE, A. Accumulation of glutamine synthetase during early. **Planta**, Berlin, 185(3): 372=378, 1991.

CASSELLS, A.C.; PLUNKETT, A.; KELLEHER, D. Screening of *Saintpaulia ionantha* Wendl. cultivars for caulogenetic potential based on the *in vitro* responses of young axenic leaves on auxin and cytokinin factorial media. **Scientia Horticulturae**. 30(1-2):151-157. 1986.

CHANG, J. S. *In vitro* rapid propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. **Plant-Physiology Communications Zhiwu Sheglixue Tongxun**. 5: 34-36. 1985.

CHEN, Y.C.; LU, X.H.; LIN, H.Z. - The effect of some growth regulators on morphogenesis in a somatic cultural of *Saintpaulia ionantha*. **Acta Horticulturae Sinica**. 14(1):57-61. 1987.

ELLIOTT, W.H. Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, 201:661-672, 1953.

- GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. A cultura de tecidos em fitopatologia. *In: Manual de Fitopatologia* Vol. 1:495-505. Princípios e conceitos. BERGAMIN FILHO, KIMATI, H. & AMORIN, L. Ed. Ceres. 1995.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, A. M. Micropropagação. *In: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. TORRES, A. C. & CALDAS, L. S. Brasília. 433 p. 99-169. 1990.
- HANDA, S.; HUBER, D. M.; WAREEN, H. L.; TSAI, C.Y. Nitrogen nutrition and N assimilation in maize seedlings. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, 65: 87-93, 1985.
- HIREL, B.; GADAL, P. Glutamine synthetase in rice - a comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiology*, Rockville, 66: 619-623, 1980.
- HIREL, B.; GADAL, P. Glutamine synthetase isoforms in leaves of a C₄ plant: *Sorghum vulgare*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 54: 69-74, 1982.
- HIREL, B.; VIDAL, J.; GADAL, P. Evidence for a cytosolic-dependent light induction of chloroplastic glutamine synthetase during greening of etiolated rice leaves. *Planta*, Berlin, 155: 17-23, 1982.

HIREL, B.; WEATHERLEY, C.; CRETIN, C.; BERGOUNIOUX, C.; GADAL, P. Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. **Plant Physiology**, Rockville, 74:448-450, 1984.

IOANNOV, M. Micropropagation of african violet from petiole and leaf blade tissue. **Technical Bulletin, Agricultural Research Institute, Cyprus**. 92, 4p. 1987.

JIMÉNEZ, E. S.; FERNÁNDEZ, L. Biochemical parameters to asses cell differentiation of *Bouvardia ternifolia* Schelecht callus. **Planta**, Berlin, 158: 377-383, 1983.

JONES, J.B. - Comercial plant tissue culture in the United States. **Acta Horticulturae**. 2:212,639-643. 1987.

KRIKORIAN, A. D.; BERQUAM, D. L. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. **The Botanical Review**, 35:59-88. 1969.

McNALLY, S. F.; ORBANJO, T.O.; HIREL, B.; STEWART, G.R. Glutamine synthetase isoenzymes of *Striga hermonthica* and other angiosperm root parasites. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, 34:610-614, 1983.

MAGALHÃES, J.R.; HUBER, D. M. Maize growth and ammonium assimilation enzyme activity in response to nitrogen forms and pH control. **Journal of Plant Nutrition**, New York, 12(8): 985-996, 1989.

MIFLIN, B.J.; LEA, P. J. Ammonia assimilation. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E ed.. **The Biochemistry of Plants**. London, Academic Press, 1980. v.5, p. 169-202.

MOREL, G. Producing virus-free *Cymbidium*. **Am. Orch. Soc. Bull.** , 29 : 495-497. 1960.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, 25: 135 - 166. 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plantarum**. 15: 473 - 97. 1962.

RATHNAM, C. K. M.; EDWARDS, G. E. Distribution of nitrate assimilating enzymes between mesophyll protoplasmic and bundle sheath cell in leaves of three groups of C₄ plants. **Plant Physiology**, Rockville, 57: 881-885, 1976.

REIST, A.; LE, C.L. - *In vitro* culture (+): rapid and economic propagation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl. cv. Vroni). **Revue-Suisse-de-Viticulture, - d'Arboriculture-et-d'Horticulture**. 19 (5): 285-290. 1987.

SANDERSON, K.C.; MCGUIRE, J. Growth regulator sprays during propagation increase African violet crowns and leaves. **HortScience**. 23:6, I, 1085. 1988.

SCHULZE, D. *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. - in vitro propagation and acclimatization in a commercial laboratory. **Acta Horticulturae**. 226, vol.II, 619-622; International Symposium on Propagation of Ornamental Plants. 1988.

SUZUKI, A.; GADAL, P.; OAKS, A. Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. **Planta**, Berlin, 151: 457-461, 1981.

TAKEBAYASHI, S.S.G. Propagação *in vitro* de violeta africana (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl. 6º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, Campinas. p.78. 1987.

TOMBOLATO, A.F.C.; CASTRO, C.E.F.; MATTHES, L.A.F.; TAMADA, E.T. Tipos de substratos para formação de mudas de violeta africana (*Saitpaulia ionantha* H. Wendl.). 6º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, Campinas. p.20. 1987a.

TOMBOLATO, A.F.C.; TAMADA, E.T.; CASTRO, C.E.F.; MATTHES, L.A.F. Influência do tipo de material vegetativo na produção de mudas de violeta africana

(*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.). **6º Congresso Brasileiro de Floricultura e plantas Ornamentais**, Campinas. p.62. 1987b.

ZHANG, P.F.; NI, D.X.; WANG, Q; WANG, K.J. Hormonal control of somatic embryogenesis and callus growth of *Saintpaulia ionantha* in vitro. **Acta Botanica Sinica**. 28:4, 446-449, 1986.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Quadro da análise de variância para atividade de glutamina sintetase em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS normal (T1) e meio de cultura MS com 50% na concentração dos sais (T2).

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
TRATAMENTO	1	159160.0688075	159160.0688075	890.2409	0.00001
COLETA	4	556747.6823057	139186.9205764	778.5238	0.00001
TRA*COL	4	55367.4448482	13841.8612121	77.4226	0.00001
RESIDUO	10	1787.8313992	178.7831399		
TOTAL	19	773063.0273607			

MÉDIA GERAL= 495.837650

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO= 2.697%

Apêndice 2 - Quadro de análise de variância para atividade de glutamina sintetase em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS acrescido de 1,7g NaNO₃ (T3); 3,4g NaNO₃ (T4) e 5,1g NaNO₃ (T5).

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
TRATAMENTO	2	203802.6760941	101901.3380471	127.8742	0.00001
COLETA	4	391204.0826051	97801.0206513	122.7288	0.00001
TRA*COL	8	25462.2132516	3182.7766564	3.9940	0.01029
RESIDUO	15	11953.3103217	796.8873548		
TOTAL	29	632422.2822725			

MÉDIA GERAL= 486.673340

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO= 5.800%

Apêndice 3 - Quadro da análise de variância para atividade de glutamina sintetase em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio MS acrescido de 1,07g NH₄Cl (T6); 2,14g NH₄Cl (T7) e 3,21g NH₄Cl (T8).

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
TRATAMENTO	2	53714.3660005	26857.1830002	27.3098	0.00005
COLETA	4	478311.4044178	119577.8511045	121.5931	0.00001
TRA*COL	8	183783.4501586	22972.9312698	23.3601	0.00001
RESIDUO	15	14751.4000659	983.4266711		
TOTAL	29	730560.6206428			

MÉDIA GERAL= 532.810000

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO= 5.886%

Apêndice 4 - Quadro da análise de variância para teor de proteína total solúvel em extratos de *Saintpaulia ionantha* para os tratamentos T1 (MS normal) e T2 (50%) da concentração dos sais MS).

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
TRATAMENTO	1	533.4407723	533.4407723	22.6086	0.00105
COLETA	4	2943.7904925	735.9476231	31.1914	0.00008
TRA*COL	4	1658.3558121	414.5889530	17.5714	0.00035
RESIDUO	10	235.9455703	23.5945570		
TOTAL	19	5371.5326472			

MÉDIA GERAL= 38.635498

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO= 12.572%

Apêndice 5 - Quadro da análise de variância para teor de proteína total solúvel em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS acrescido de 1,7g NaNO₃ (T3); 3,4g NaNO₃ (T4) e 5,1g NaNO₃.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
TRATAMENTO	2	635.2407204	317.6203602	5.2588	0.01828
COLETA	4	3100.4100129	775.1025032	12.8332	0.00022
TRA*COL	8	3621.2860256	452.660732	7.4946	0.00069
RESIDUO	15	905.9700848	60.3980057		
TOTAL	29	8262.9068437			

MÉDIA GERAL= 39.833332

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO= 19.510%

Apêndice 6 - Quadro da análise de variância para teor de proteína total solúvel em extratos de *Saintpaulia ionantha* em meio de cultura MS acrescido de 1,07g NH₄Cl (T6); 2,14g NH₄Cl (T7) e 3,21g NH₄Cl (T8).

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
TRATAMENTO	2	422.6879255	211.3439627	63.7017	0.00001
COLETA	4	4993.3742976	1248.3435744	376.2664	0.00001
TRA*COL	8	331.1992227	41.3999028	12.4784	0.00009
RESIDUO	15	49.7656821	3.3177121		
TOTAL	29	5797.0271278			

MÉDIA GERAL= 23.881332

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO= 7.627%