

# BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo

Vcl. 22

Campinas, julho de 1963

N.º 34

## NOVA TÉCNICA PARA A CONTAGEM DE CROMOSSOMOS EM AMENDOIM (*ARACHIS HYPOGAEA* L.) (1)

DIXIER M. MEDINA e CÂNDIDA HELENA T. M. CONAGIN, engenheiras-agrônomas, Seção de Citologia, Instituto Agrônômico

### RESUMO

Dificuldades constantemente encontradas na determinação do número de cromossomos em *Arachis* trouxeram a necessidade de pesquisar novos métodos. Uma técnica eficiente foi então desenvolvida no laboratório de Citologia do Instituto Agrônômico de Campinas e que consta do seguinte: a) pré-tratamento das raízes com solução saturada de paradichlorobenzeno à temperatura de 16 a 20°C durante 4-8 horas ou por uma solução 0,002  $\frac{\text{mo}}{1}$  de oxiquinoleína a 16°C durante 6 a 7 horas; b) hidrólise em orceína acética (2% de orceína em ácido acético a 70%) e ácido clorídrico na proporção de 9:1; c) coloração e esmagamento em orceína acética a 1% em ácido acético a 45%.

Tanto o paradichlorobenzeno como a oxiquinoleína produzem o efeito c-mitótico sobre os cromossomos do amendoim, aumentando o número de células em metáfase e produzindo o espalhamento e o encurtamento dos cromossomos. Isso permite contá-los com a maior facilidade.

São apresentados os detalhes da técnica bem como comentários sobre o modo de ação do paradichlorobenzeno no material em questão.

### 1 - INTRODUÇÃO

Para a determinação do número de cromossomos em amendoim era normalmente utilizado, no laboratório de Citologia, o processo de cortes de pontas de raízes. A fixação era em "Craf", seguida da desidratação pela série do álcool butílico, inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina de Heidenhain.

(1) Trabalho apresentado na XV Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizada em Campinas, de 7 a 13 de julho de 1963. Recebido para publicação em 17 de julho de 1963.

Nem sempre, porém, chegava-se a um resultado plenamente satisfatório, apresentando os cromossomos de amendoim uma certa tendência de aglomeração, o que dificultava sua contagem. A técnica de esmagamento de raízes também apresentava as mesmas dificuldades além da posição quase sempre lateral das metáfases.

Numa tentativa de pré-tratamento com paradiclorobenzeno, embora tendo-se obtido bons resultados com outras plantas (4, 9), não se havia conseguido que o Pdb atuasse sobre os cromossomos de amendoim (4).

Com a intensificação das pesquisas em diversas espécies de *Arachis*, houve necessidade de ser encontrado um processo rápido e eficiente para contagens dos cromossomos, o que constitui o objetivo deste trabalho.

## 2 – MATERIAL E MÉTODO

Após revisão feita em literatura recente sobre as técnicas empregadas para diferentes materiais, decidiu-se experimentar algumas, as mais simples, rápidas e executáveis em nosso laboratório. Assim, relativamente à coloração, tentativas foram feitas aplicando-se técnicas como carmim acético (5, 7), hematoxilina (19),orceína associada a “fast green” (20) e orceína (6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

Com a finalidade de conseguir o encurtamento e o espalhamento dos cromossomos, foi adotado o pré-tratamento de raízes, empregando-se as seguintes drogas de conhecido efeito c-mitótico: paradiclorobenzeno, oxiquinoleína e colchicina.

O material utilizado em tôdas as experiências foi *Arachis hypogaea* L. var. **Tatuí** (V. 76). Para melhor avaliar os resultados, cada técnica foi experimentada ao mesmo tempo em cebola (*Allium cepa* L.).

As microfotografias foram tiradas com Fotomicroscópio Zeiss. Os desenhos foram executados com câmara clara (2).

## 3 – OBSERVAÇÕES

### 3.1 – COLORAÇÃO

De um modo geral, tôdas as técnicas experimentadas deram boa coloração em raízes de cebola; no amendoim, entretanto, apenas a técnica da orceína, de Sharma e colaboradores, deu bons resultados.

(2) Os autores agradecem à srta. Zorah de Mello, da Seção de Botânica, a colaboração na execução dos desenhos.

Os cromossomos ficaram bem coloridos, apresentando, além disso, bem evidentes a duplicidade, os centrômeros e as contrações, que se acentuam nas metáfases.

Entretanto, é muito difícil obter placas metafásicas em vista polar; em geral, elas se apresentam lateralmente; das poucas figuras conseguidas nessa posição, a maior parte corresponde, provavelmente, a um estado um pouco anterior à metáfase (figura 1-A, B e C). A figura 4-B mostra um campo comumente encontrado no qual se vêem uma metáfase lateral e a vista polar de uma prometáfase; esta última corresponde à figura 1-C.

No que diz respeito à coloração, o problema podia ser considerado resolvido; era preciso, ainda, conseguir o encurtamento e o espalhamento dos cromossomos através do pré-tratamento das raízes com drogas de efeito c-mitótico.

### 3.2 - PRÉ-TRATAMENTO COM PARADICLOROBENZENO

Numa experiência preliminar, foram comparados os seguintes tratamentos de raízes:

- 1) Fixação imediata em álcool absoluto: ácido acético (1:1) à temperatura ambiente;
- 2) Fixação imediata em álcool absoluto: ácido acético (1:1) em refrigerador a 12-18°C;
- 3) Fixação em álcool absoluto: ácido acético (1:1) após um dos seguintes pré-tratamentos:
  - a) com água à temperatura ambiente;
  - b) com água, em refrigerador a 12-18°C;
  - c) com Pdb, à temperatura ambiente;
  - d) com Pdb, em refrigerador a 12-18°C;
  - e) com Pdb, em refrigerador a 5-10°C;

A solução de Pdb foi preparada de acordo com Meyer (10).

As seguintes observações foram feitas:

A) a fixação imediata mostrou que as raízes estavam em intensa atividade mitótica, mas era muito raro se encontrar uma metáfase. Quando essa fixação se processou sob baixa temperatura, foi observado o espalhamento dos cromossomos, cuja duplicidade era bem evidente (figura 1-D); a maior parte das metáfases, porém, apresentava-se lateralmente;

B) a permanência das raízes na água durante 2 a 4 horas produziu uma desorganização dos núcleos e uma paralisação da mitose, diminuindo

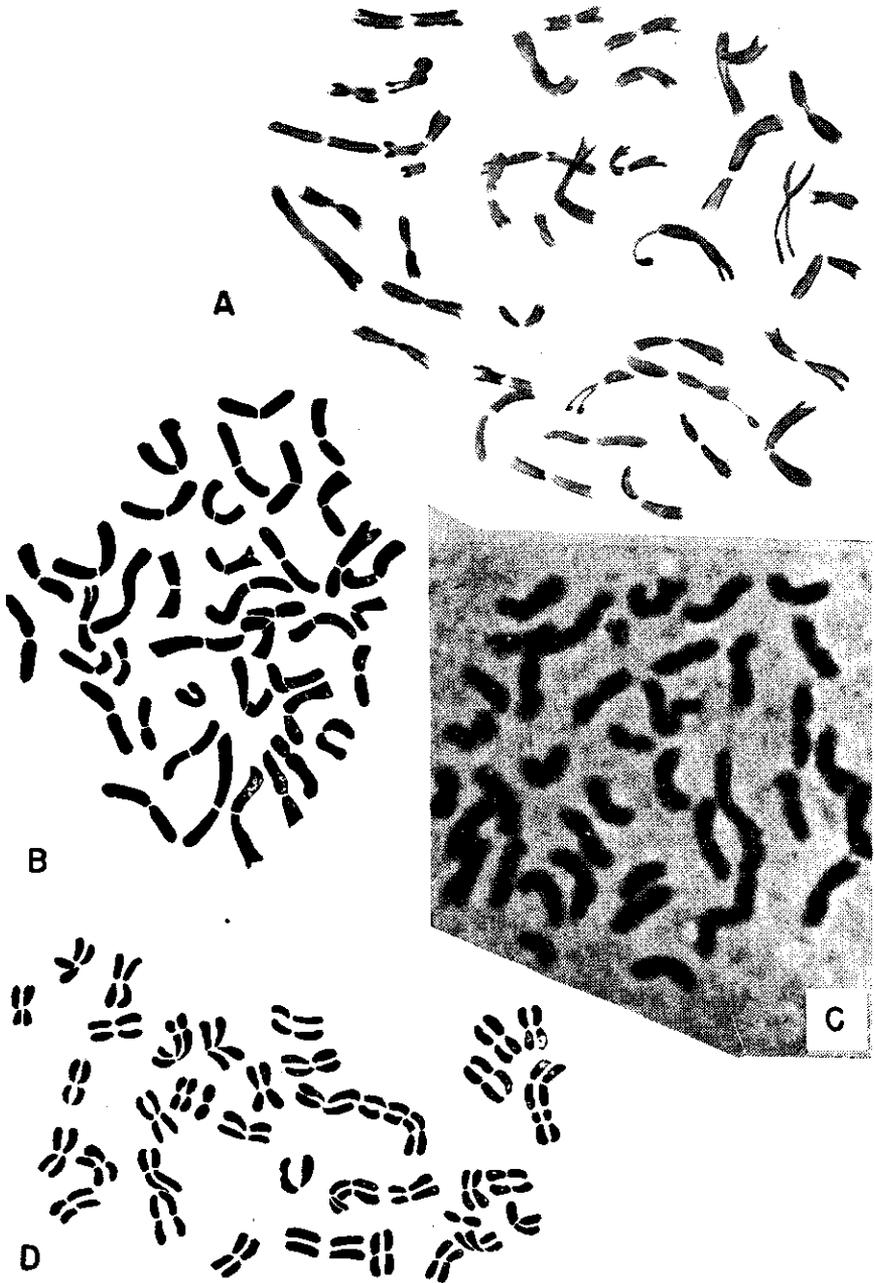


FIGURA 1. — Placas pró-metáfásicas em raízes fixadas imediatamente após a colheita. A — C — fixação à temperatura ambiente; D — fixação a baixa temperatura. A, B e D;  $\times 2.320$ ; C  $\times 2.650$ .

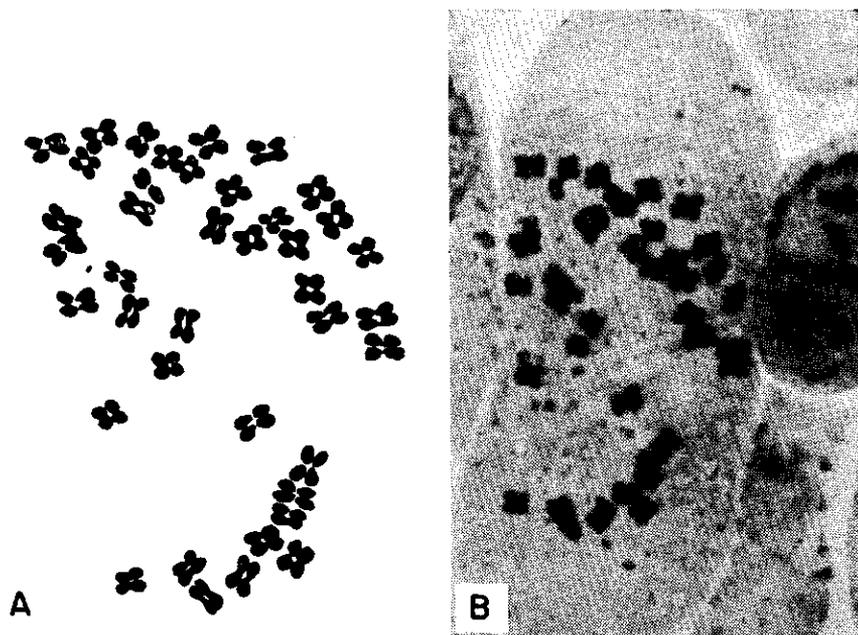


FIGURA 2. — Pré-tratamento com paradiclorobenzeno durante 2h à temperatura ambiente. Desenho e microfotografia da mesma célula. A  $\times 2.320$ ; B  $\times 1.880$ .

sensivelmente o número de metáfases. Este efeito era mais acentuado no tratamento à temperatura ambiente;

C) no tratamento com paradiclorobenzeno, à temperatura ambiente, observou-se efeito semelhante ao da água, havendo paralisação da mitose. Algumas preparações mostraram ótimas figuras de cromossomos encurtados e espalhados (figuras 2-A e B e 3-A, B e C); tais células, porém, eram raras;

D) o tratamento com paradiclorobenzeno em refrigerador a  $12-18^{\circ}\text{C}$  encurtou e espalhou os cromossomos, tendo-se conseguido algumas boas figuras para contagem e até para fotografias, tanto com duas como com quatro horas de tratamento;

E) no tratamento com Pdb em refrigerador a  $5-10^{\circ}\text{C}$  não foi observado o efeito c-mitótico, estando as raízes paralisadas em sua atividade.

Essas observações sugeriram que o pré-tratamento com paradiclorobenzeno necessita, para produzir seu efeito sobre os cromossomos, que as raízes se mantenham em perfeito estado, sem prejuízo da atividade mitótica.

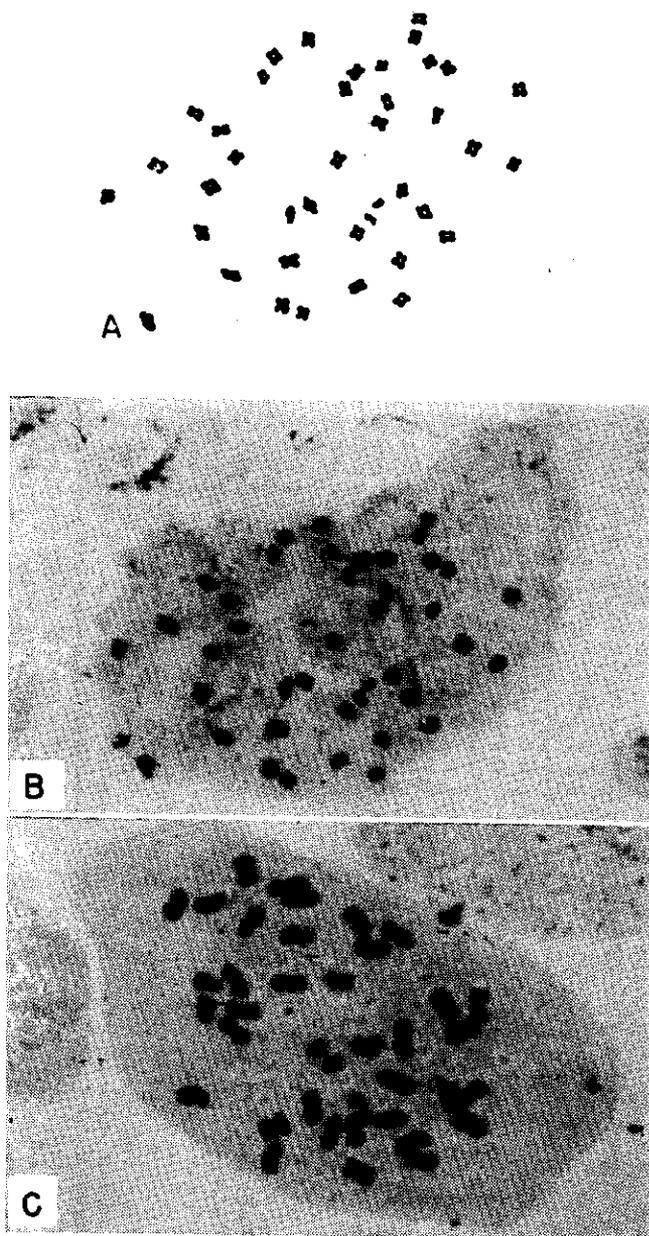


FIGURA 3. — Pré-tratamento com paradi-chlorobenzeno à temperatura ambiente. A e B — durante 5 horas (desenho e microfotografia da mesma célula); C — durante 2 horas. A,  $\times 1.160$ ; B,  $\times 1.140$ ; C,  $\times 1.760$ .

Sob êsse ponto de vista, novas experiências foram realizadas às temperaturas de 12, 16, 20 e 24°C, o pré-tratamento sendo feito em raízes colhidas e em plantas.

O material foi colhido em água a uma temperatura próxima da do solo e em seguida colocado em recipientes contendo a solução saturada de paradiclorobenzeno também à temperatura ambiente. No caso do tratamento de plantas, somente as raízes eram mergulhadas na solução. A seguir as temperaturas eram estabilizadas, gradualmente, para cada caso, gastando-se cerca de 10 minutos para isso.

Durante o pré-tratamento é essencial, como já recomendara Meyer (10), que pinças, rólhas e vasilhame estejam limpos, isentos de qualquer contaminação química; também devem ser evitados choques de temperatura; caso contrário a droga utilizada (paradiclorobenzeno, neste caso) terá a sua ação prejudicada.

Raízes foram fixadas de hora em hora, desde uma até 14 horas; em alguns casos houve coleta até com 22 e 23 horas. Quatro a cinco raízes eram colhidas de cada vez e as lâminas preparadas à medida do possível, após 3 horas de fixação ou mesmo no dia seguinte, de acôrdo com Sharma e Sharma (17). Do mesmo modo que Sharma & Bal (11), verificou-se que a fixação é dispensável e que raízes transferidas do paradiclorobenzeno diretamente para a orceína forneciam também boas preparações.

### 3.2.1 — RESULTADOS

Foram os seguintes os resultados dessa série de experiências:

a) A temperatura de 24°C não é favorável ao pré-tratamento; de um modo geral, as raízes não se conservam em atividade, seja nos tratamentos de raízes cortadas seja nos tratamentos das plantas. Em apenas uma das experiências foram observadas algumas células com cromossomos espalhados, de material colhido entre 3 e 7 horas após pré-tratamento da planta;

b) A temperatura de 12°C também não se mostrou favorável. Em uma das experiências realizadas não foi observado o efeito do Pdb, embora o material se tivesse conservado em bom estado até com 13 horas de tratamento. Numa segunda experiência, células com bom espalhamento dos cromossomos foram encontradas entre 8 e 12 horas no Pdb;

c) Quando a experiência se realizou a 16 e a 20°C, células para contagem dos cromossomos foram encontradas desde 3 até 23 horas de tratamento; a duração ótima variou de uma experiência para outra, o mesmo acontecendo para a duração máxima. Os resultados foram mui-

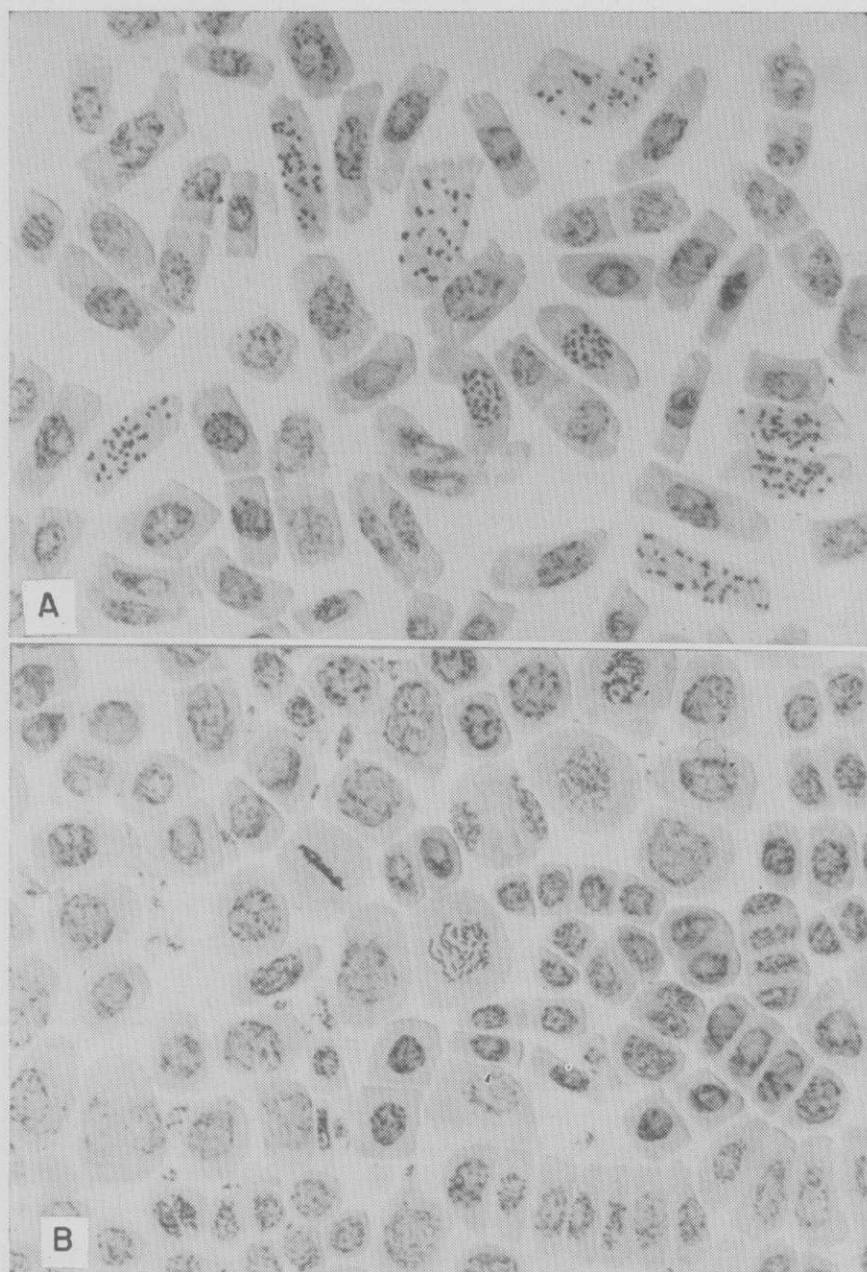


FIGURA 4. — A — Pré-tratamento com paradiclorobenzeno à temperatura de 16°C, durante 4 horas (campo mostrando várias células com cromossomos encurtados e espalhados);  $\times 360$ ; B — Campo sem tratamento;  $\times 340$ .

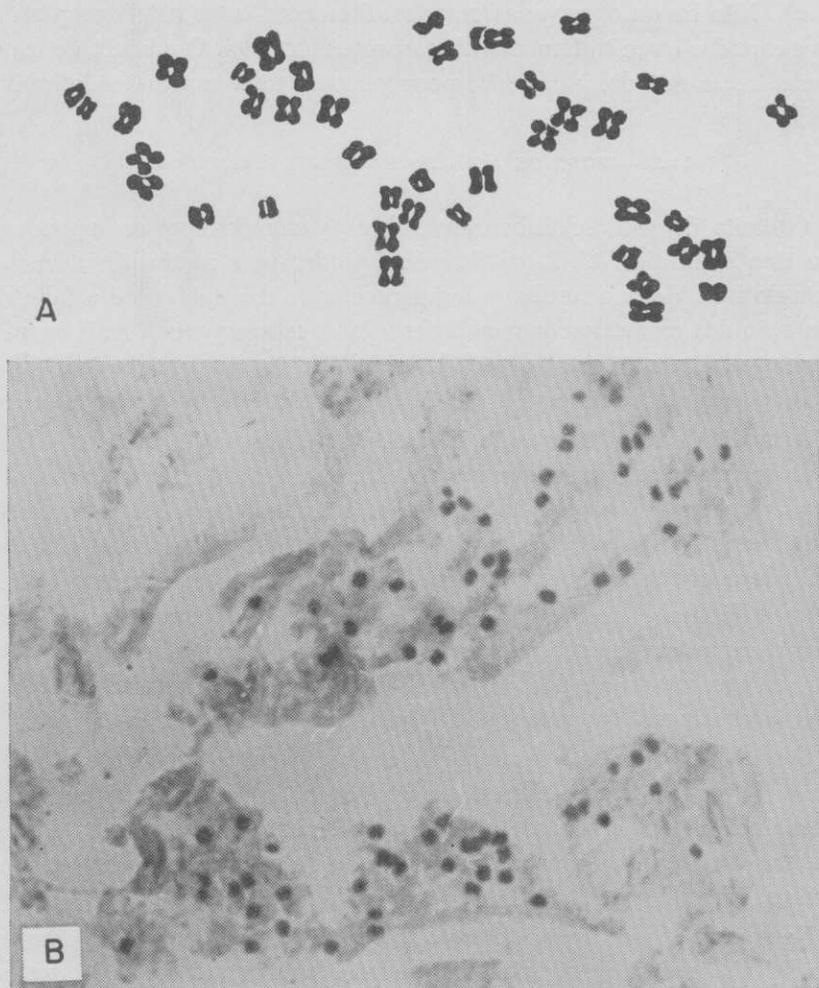


FIGURA 5. — Pré-tratamento com paradiclorobenzeno a 16°C; A — durante 4 h;  $\times 2.320$ ; B — durante 6 h;  $\times 930$ .

to superiores: tôdas as raízes tratadas apresentaram grande quantidade de células com os cromossomos encurtados e espalhados (figuras 4-A e 5-A e B); o aspecto dos cromossomos foi comparável ao que se obteve nos tratamentos descritos anteriormente, mesmo naqueles à temperatura ambiente. A vantagem do tratamento em questão foi, entretanto, a quantidade muito grande de células com cromossomos nesse estado e a constância dos resultados; isso permite, com rapidez e segurança, a determinação do número de cromossomos em *Arachis*.

d) Não foram observadas grandes diferenças entre o tratamento das raízes cortadas e seu tratamento diretamente na planta. O número de experiências nesse sentido, porém, foi pequeno para uma conclusão definitiva.

### 3.2.2 — MODO DE AÇÃO DO PARADICLOROBENZENO

O efeito do paradichlorobenzeno sobre os cromossomos do amendoim é do tipo c-mitótico (8). Logo de início produz-se a inativação da substância do fuso, do que resulta o desaparecimento das anáfases e a falta de orientação dos cromossomos metafásicos; êstes se apresentam mais ou menos aglomerados no centro da célula e embora não possam ser individualizados nesse estado, observa-se o seu encurtamento, causado pela droga.

À medida que o tratamento se prolonga, observam-se metáfases bem menos aglomeradas, com alguns cromossomos destacados da aglomeração central. Finalmente, prolongando-se mais o tratamento, vêem-se cromossomos metafásicos espalhados por tôda a célula, permitindo com a maior facilidade a contagem, mesmo com objetiva de pequeno aumento. Apresentam-se bastante encurtados e têm o aspecto de pequenas cruces de braços desiguais; permanecem nesse estado por muito tempo e o seu aspecto pode ser comparado ao descrito por Levan (8) como "scattered over the cell in a diakinesis-like manner" (figura 4-A).

O que caracteriza o tratamento de um certo ponto em diante é o número cada vez maior de células dêste tipo, o que, aliás, era esperado como consequência da não divisão do centrômero. Além das c-metáfases há as pró-fases, em que êles são vistos ao longo de todo o comprimento, com os centrômeros bastante evidentes (figura 6-A e B).

Em várias células foram observadas c-anáfases nas quais cada cromossomo filho se separa inteiramente do outro e células até com 80 cromossomos espalhados puderam ser analisadas. Numa das experiências isso foi conseguido depois do material permanecer 23 horas no paradichlorobenzeno a 20°C; efeito semelhante foi também observado em tratamentos de 4 h e de 9 h a 16°C (figuras 7-A, B e 8-A, B).

Metáfases aglomeradas ("clumped metaphases") foram observadas em *Spinacia oleracea*, por Berger e Witkus (1), e em *Arachis hypogaea*, por Carpentier (3), após tratamento prolongado com colchicina. Ambos os autores concluem que tal aspecto da "c-metáfase" é característico de plantas de cromossomos pequenos.

Do que foi possível observar no presente estudo, parece que a maior ou menor aglomeração dos cromossomos depende, em primeiro lugar, do

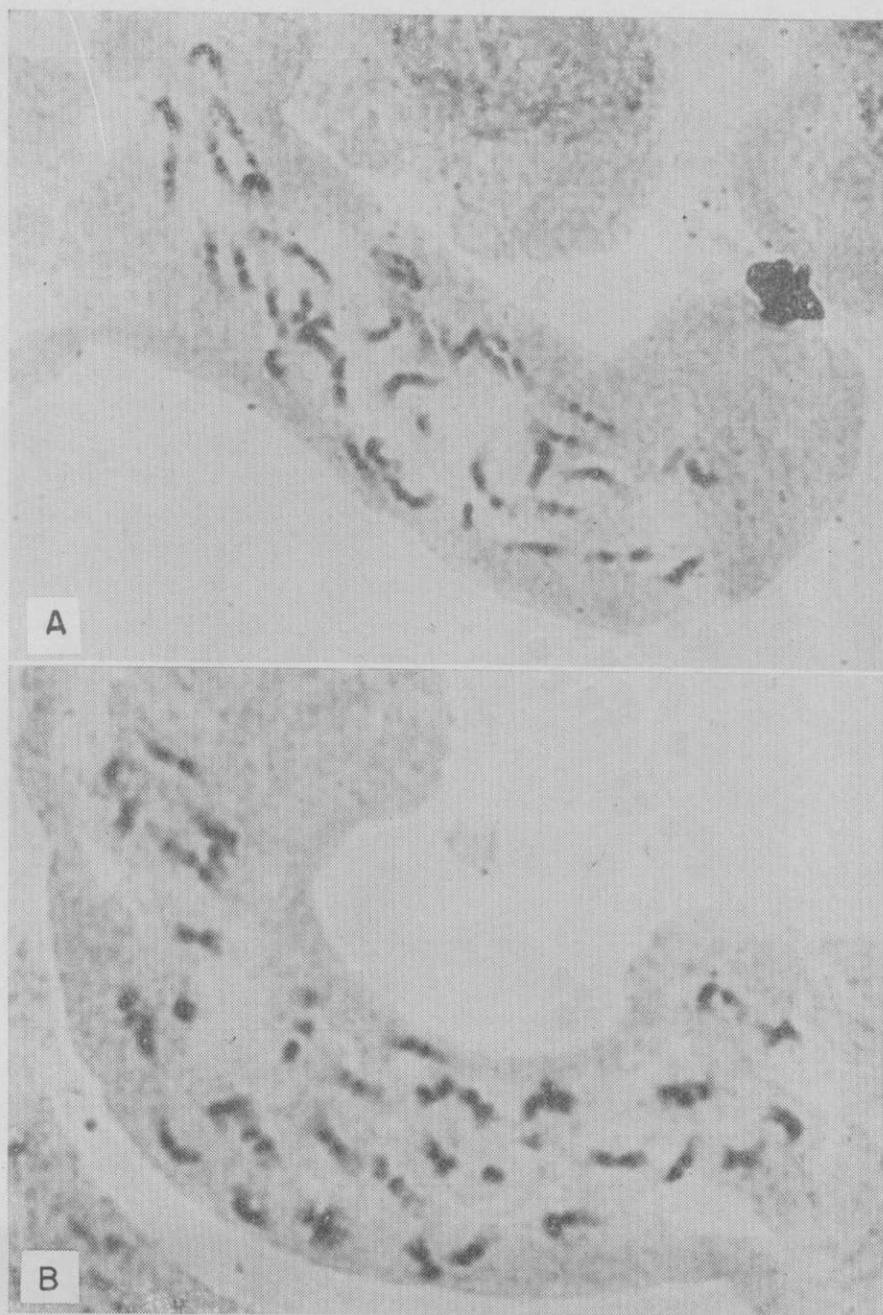


FIGURA 6. — Pré-tratamento com paradichlorobenzeno a 16°C durante 6 h; prófases;  
A —  $\times 1.650$ ; B —  $\times 1.840$ .

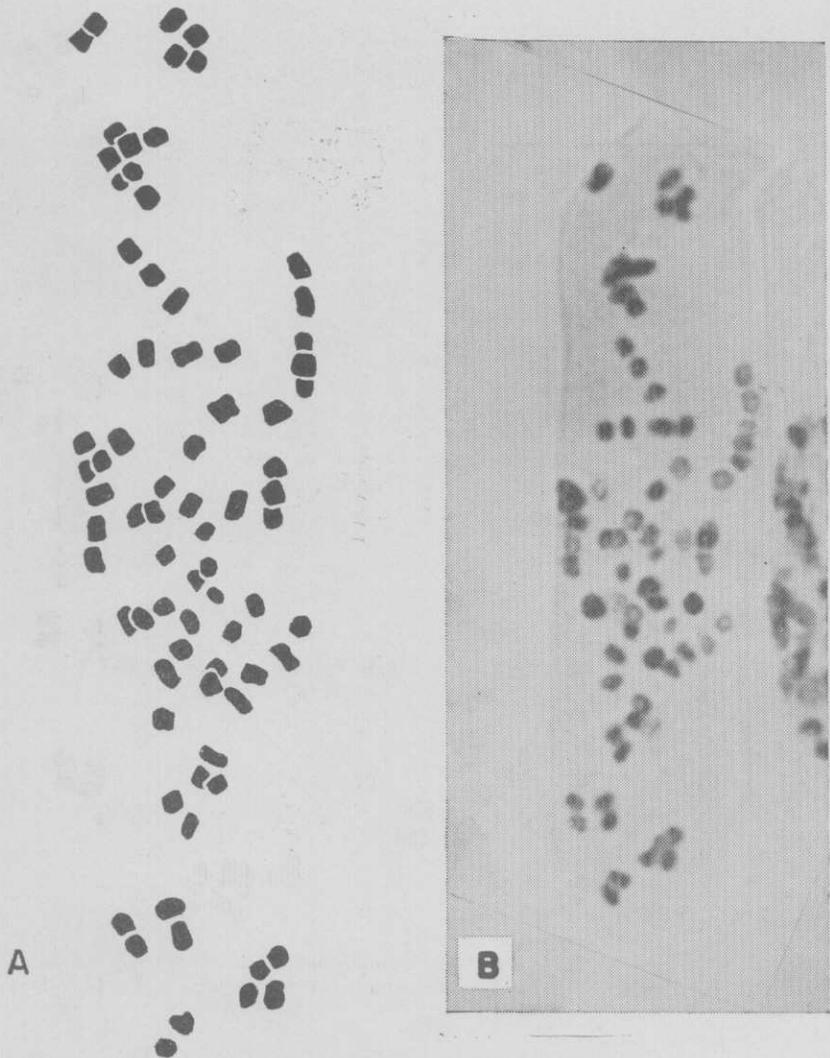


FIGURA 7. — Pré-tratamento com paradiclorobenzeno a 16°C durante 4 horas; c-anáfase com 80 cromossomos (desenho e microfotografia da mesma célula); A,  $\times 2950$ ; B  $\times 2.200$ .

estado em que se encontrava a célula quando se lhe aplicou o tratamento: imaginando uma raiz em intensa atividade mitótica no momento da aplicação do paradiclorobenzeno, nela existem células em tôdas as fases da mitose, desde prófases, telófases e até células em repouso. Ao ser atingida pela droga, uma célula em anáfase pode completar a separação dos cro-

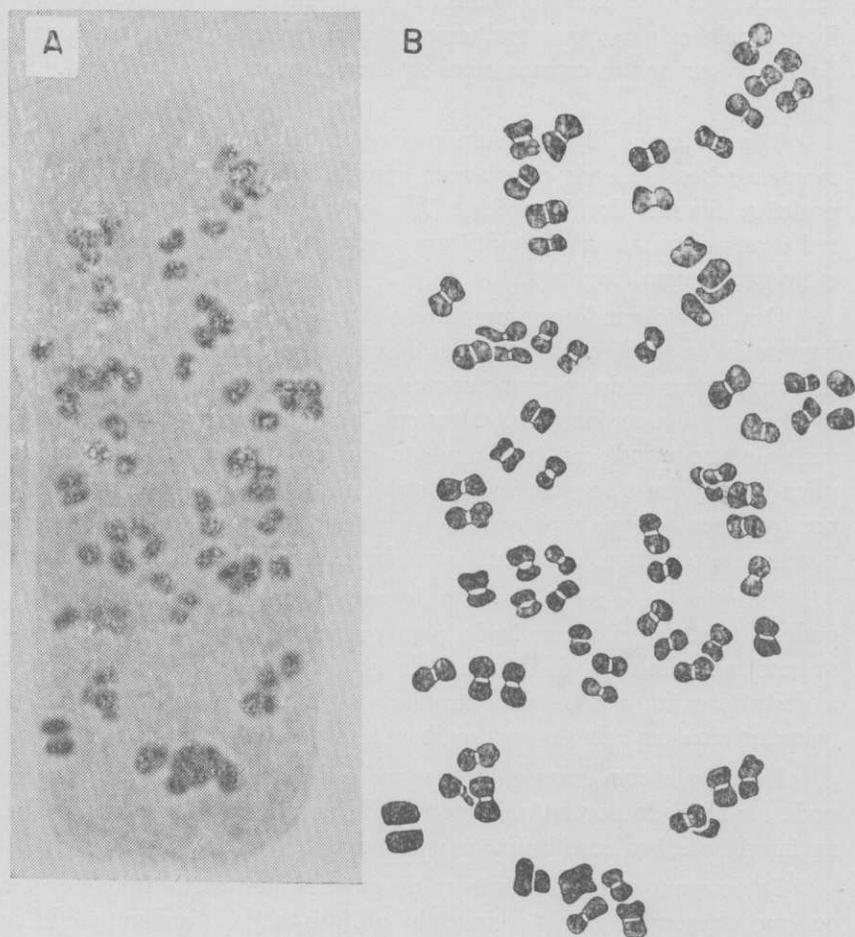


FIGURA 8. — Pré-tratamento com paradiclorobenzeno a 16°C durante 9 horas; c-anáfase com alguns cromossomos já separados (microfotografia e desenho da mesma célula); A,  $\times 2.090$ ; B,  $\times 2.950$ .

mossomos e formar dois núcleos telofásicos; uma célula em metáfase, porém, pode não começar a anáfase, e, com a destruição do fuso, ficar com os cromossomos desorientados; como, porém, eles já se encontravam muito próximos uns dos outros, não há espalhamento dos mesmos; estas seriam, então, as metáfases aglomeradas, observadas já no início do tratamento, perfeitamente distintas das metáfases laterais, vistas no material não tratado pelo Pdb. Por sua vez, uma célula que, ao iniciar-se a ação do paradiclorobenzeno esteja em prófase inicial, vai aos poucos sofrendo a ação do mesmo: os cromossomos vão encurtando, e, como não há formação da

substância do fuso, não se organizam para a metáfase, permanecendo espalhados pela célula; êsse espalhamento será maior ou menor, dependendo do estado em que os cromossomos se encontravam ao serem atingidos pelo Pdb.

Tjio e Levan (18) concluem em seu trabalho que a oxiquinoleína aumenta a viscosidade do citoplasma, imobilizando os cromossomos em suas posições. Sharma & Moorkerjea (14) concluem que, de um modo geral, todos os pré-tratamentos modificam a viscosidade do plasma e agem, até certo grau, como fixadores.

Ora, considerando que numa raiz ativa, no início do tratamento, deve haver células em diferentes estados da mitose, e considerando a dupla ação da droga encurtando os cromossomos e modificando a viscosidade do plasma, teremos um conjunto de fatores cuja interação poderá explicar a grande variação encontrada no espalhamento dos cromossomos. Dêsse modo explica-se também o fato de se encontrarem metáfases aglomeradas, mesmo nos tratamentos mais prolongados, ao mesmo tempo que aumenta consideravelmente o número das células com bom espalhamento dos cromossomos.

Se assim fôr, o modo de ação do paradiclorobenzeno em *Arachis* (que poderá, talvez, ser generalizado para outras plantas de cromossomos pequenos) assemelhar-se-á, de um lado ao da colchicina, no que se refere à destruição do fuso, e, de outro lado teria uma ação semelhante à da oxiquinoleína em relação ao espalhamento dos cromossomos.

De acôrdo com Brown (2), o número de divisões celulares nas raízes pode ser alterado por fatores interferindo na mitose pròpriamente dita ou na interfase e isso constituiria um processo dependente de enzimas.

Fatores que alterem o número de mitoses num certo espaço de tempo ou que alterem a duração do ciclo prófase-telófase podem modificar o resultado de um pré-tratamento com paradiclorobenzeno, seja no número de células afetadas, seja no espalhamento dos cromossomos.

O fato, pois, de não se repetirem exatamente os mesmos resultados em tratamentos idênticos, sob condições controladas de temperatura, feitos em ocasiões diferentes, pode ser explicado através de diferenças no estado das raízes e das plantas.

### 3.3 – PRÉ-TRATAMENTO COM OXIQUINOLEÍNA

O pré-tratamento das raízes de amendoim com solução 0,002 mo de 8-hidroxiquinoleína também produziu efeito sôbre os cromossomos, de modo a facilitar a contagem dos mesmos.

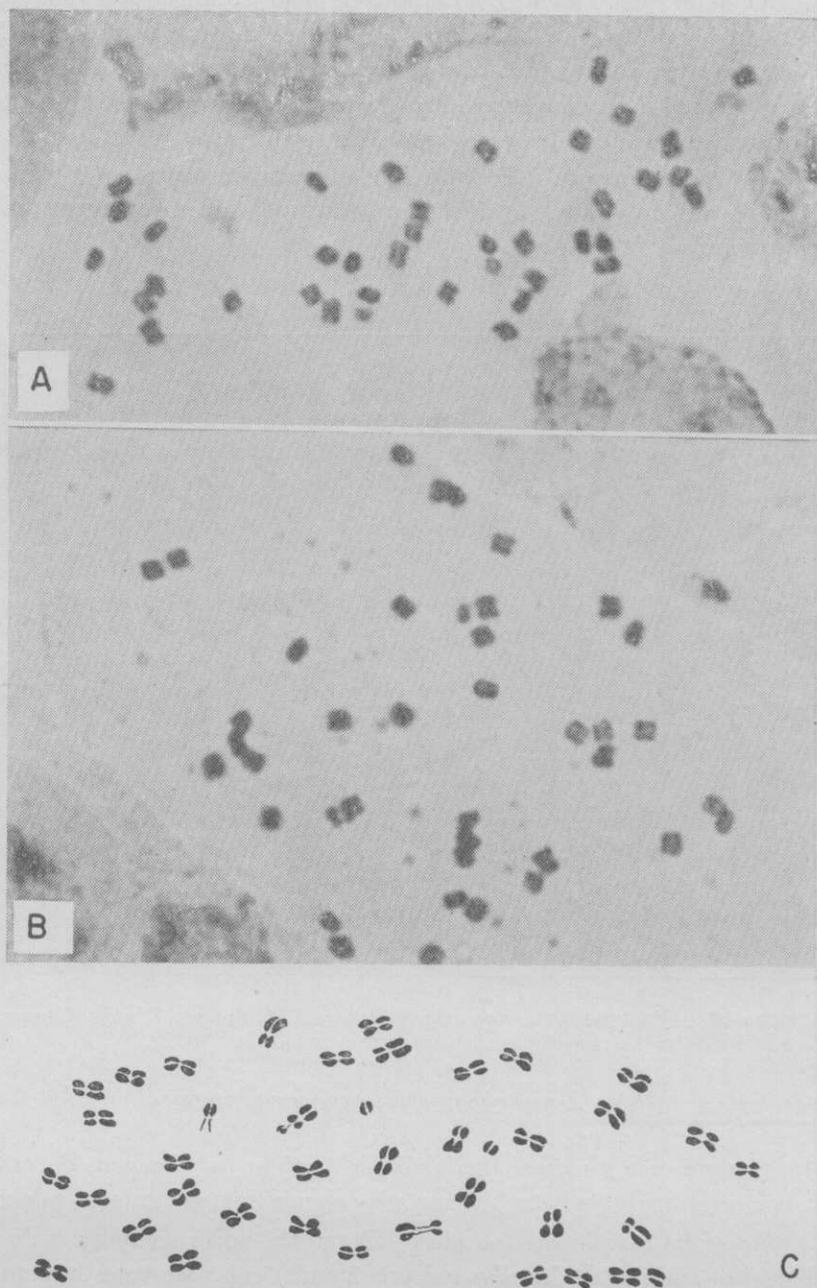


FIGURA 9. — Pré-tratamento com oxiquinoleína a 16°C durante 7 horas. A,  $\times 1.945$ ; B  $\times 2.120$ ; C,  $\times 2.320$ .

O efeito final é idêntico ao produzido pelo paradiclorobenzeno, tendo-se conseguido ótimas lâminas com 6 e 7 horas de tratamento a 16°C, nas quais foi observada grande quantidade de células com encurtamento e espalhamento dos cromossomos metafásicos. A figura 9-A, B, C, mostra os 40 cromossomos perfeitamente espalhados, com o aspecto de cruzinhas devido ao efeito c mitótico; a figura 10 representa um campo com várias células no mesmo estado, tôdas elas se prestando para a contagem dos cromossomos.

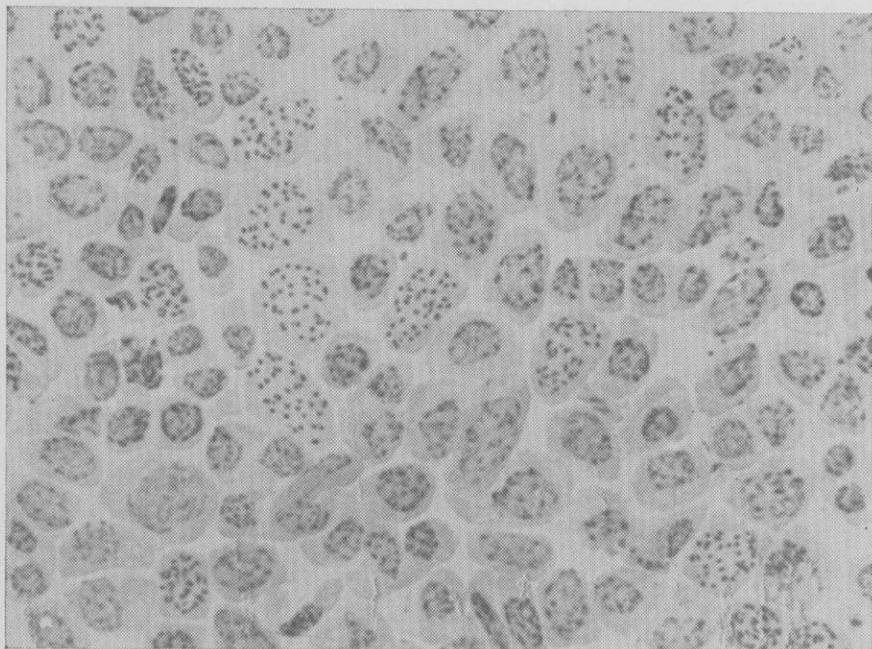


FIGURA 10. — Pré-tratamento com oxiquinoleína a 16°C durante 7 horas. Campo com várias células de cromossomos encurtados e espalhados.  $\times 410$ .

#### 3.4 — TRATAMENTOS COM COLCHICINA

Sempre com a mesma finalidade de facilitar as contagens de cromossomos em *Arachis*, foram experimentados alguns tratamentos com colchicina.

Ao serem examinadas, no nosso laboratório, raízes secundárias de “seedlings” de melancia (*Citrullus vulgaris* Shrad.) cujas sementes haviam sido tratadas pela colchicina, observou-se que algumas estavam duplicadas, enquanto outras eram de constituição quimérica; nestas últimas notou-se que,

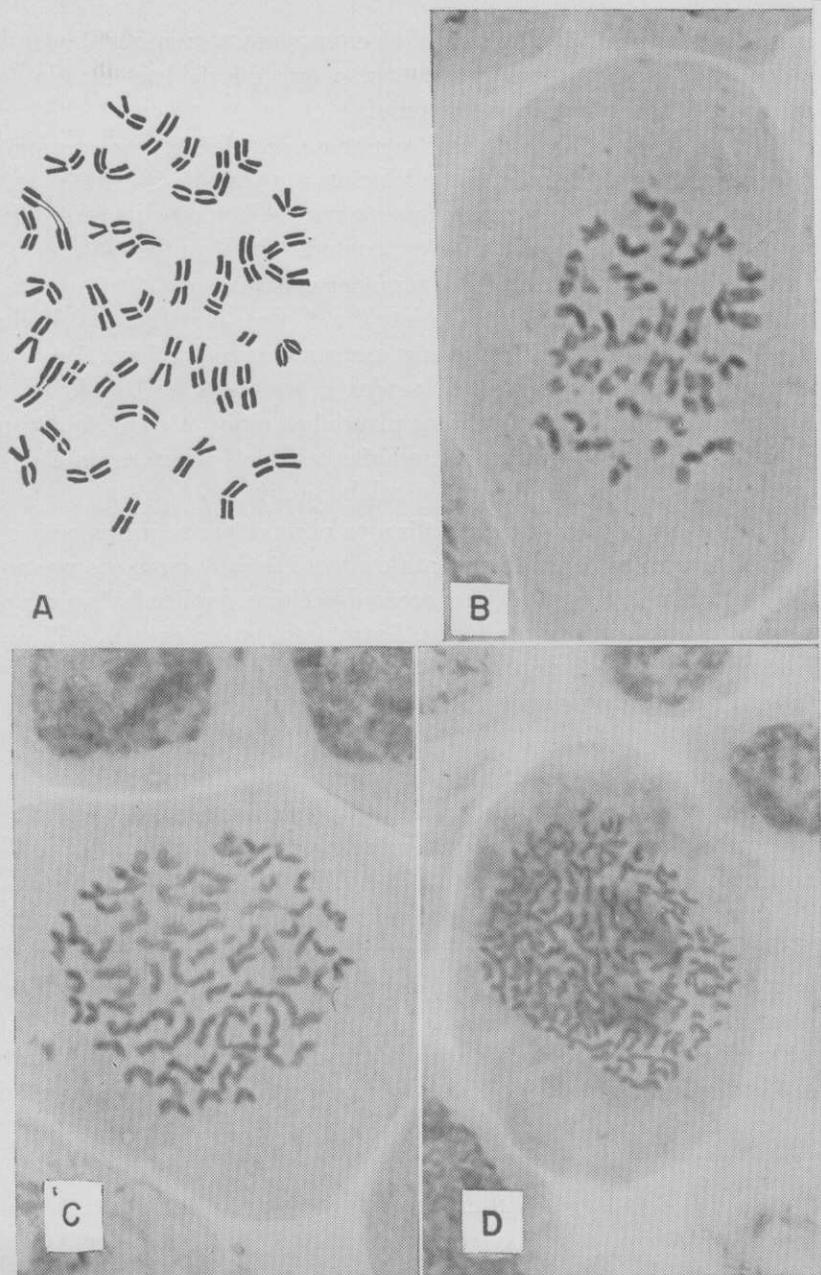


FIGURA 11. — Tratamento com colchicina a 0,1% durante 6 horas; A e B — desenho e microfotografia de uma célula com 40 cromossomos; A,  $\times 2.320$ ; B,  $\times 1.625$ ; C — célula com 80 cromossomos  $\times 1.250$ ; D — célula com 160 cromossomos  $\times 830$ .

mesmo nas células não duplicadas, os cromossomos se apresentavam encurtados, bem separados uns dos outros, o que diferia bastante do aspecto comumente encontrado nesse material.

Disso adveio a idéia de um tratamento semelhante para o amendoim. A concentração da solução de colchicina e a duração do tratamento deveriam ser de forma a permitir apenas um melhor espalhamento dos cromossomos em metáfase, sem haver, contudo, duplicação.

As sementes foram postas a germinar em caixas de Petri e imersas em soluções de colchicina a 0,1% durante 6 a 8 horas e a 0,25% e 0,5% durante 8 horas, quando as raízes principais estavam com 0,5 a 2 cm. Terminado o tratamento, foram as sementes lavadas e semeadas em terra, na estufa. Alguns dias mais tarde, quando as plantinhas estavam com 2 a 4 pares de fôlhas, colheram-se as raízes secundárias, as quais foram examinadas pelo processo daorceína, de Sharma e colaboradores.

Em todos os tratamentos realizados observaram-se raízes com células duplicadas em que eram facilmente contados  $2n=80$  cromossomos ao lado de outras com apenas 40. A proporção de células duplicadas era maior nas raízes dos tratamentos mais fortes. Entretanto, no tratamento 0,1% durante 6 horas encontrou-se duplicação ( $2n=80$ ) e reduplicação ( $2n=160$ ), além de uma pequena porcentagem de células com  $2n=40$  cromossomos (figuras 11-A a D e 12-C).

Em uma única planta, tratada durante 8 hs com colchicina a 0,1% obteve-se o resultado desejado: efeito da colchicina sobre a mitose (sem duplicação dos cromossomos) produzindo placas metafásicas com 40 cromossomos bem espalhados (figura 12-A e B).

O tratamento de sementes em germinação pela colchicina, com a finalidade de se obter o efeito c-mitótico nas raízes secundárias, é, portanto, de resultado incerto. Sua aplicação como método para contagem de cromossomos não se justifica, uma vez que ótimos resultados foram conseguidos com a aplicação do paradiclobenzeno e da oxiquinoleína. Entretanto, tal técnica de tratamento poderá servir de ponto de partida, caso se queira tentar a duplicação de cromossomos em amendoim.

#### 4 — CONCLUSÕES

Das observações realizadas e da discussão dos resultados obtidos, as seguintes conclusões gerais podem ser tiradas:

A. O efeito do Pdb e da Oq, sobre os cromossomos somáticos de amendoim é do tipo c-mitótico, espalhando-os e encurtando-os.

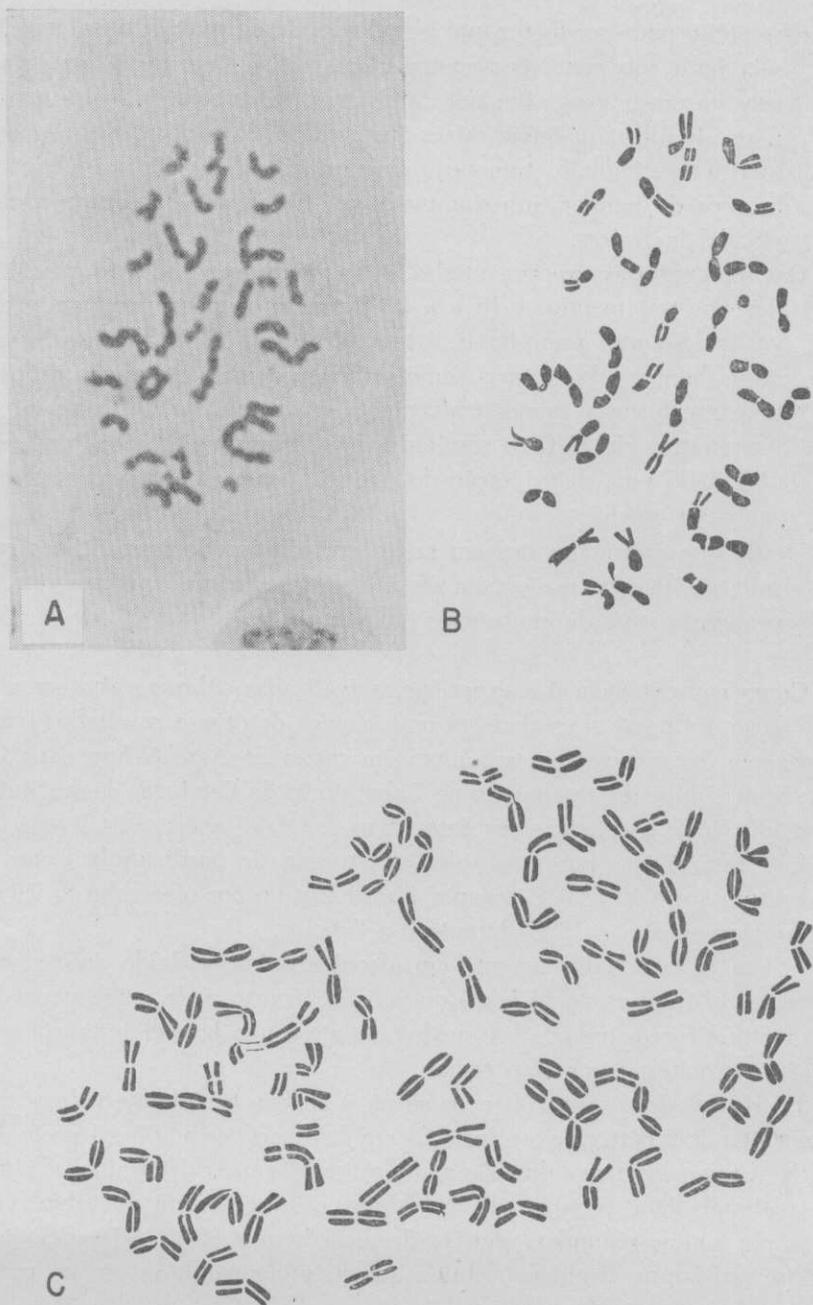


FIGURA 12. — Tratamento com colchicina a 0,1%. A e B durante 8 horas — microfotografia e desenho de uma célula com 40 cromossomos; A,  $\times 1.860$ ; B,  $\times 2.320$ ; C durante 6 horas — célula com 80 cromossomos  $\times 2.320$ .

- B. Esse efeito pode ser facilmente observado, desde que: a) o tratamento seja feito sob condições controladas de temperatura; b) as raízes estejam em intensa atividade mitótica: plantas com dois até quatro pares de folhas possuem raízes apropriadas; c) as raízes sejam mantidas em atividade: traços do fixador ou da orceína ou choques bruscos de temperatura durante o pré-tratamento paralisam a atividade das raízes.
- C. Das temperaturas experimentadas, os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos a 16 e a 20°C durante um tempo que pode variar de quatro a oito horas. À temperatura de 12°C também se consegue bom resultado, mas como prolonga demais a duração do tratamento, torna-se menos conveniente como método de trabalho. À temperatura de 24°C os resultados não foram satisfatórios, tendo-se observado uma deterioração do material, com completa desorganização dos núcleos.
- D. Desde que os tratamentos em raízes cortadas produziram ótimos resultados, não há razão para efetuá-los nas plantas, uma vez que o primeiro caso é de muito mais fácil execução.

Como consequência das experiências realizadas sobre pré-tratamento e coloração, foi possível estabelecer uma técnica de ótimos resultados para a contagem de cromossomos somáticos em raízes de *Arachis hypogaea* L. Esta técnica, adotada atualmente no Laboratório de Citologia do Instituto Agrônomo (3), consta dos seguintes itens:

1. Tratar raízes por uma solução saturada de pardiclorobenzeno à temperatura entre 16 e 20°C durante 4 a 8 horas ou por uma solução 0,002 mo de oxiquinoleína a 16°C durante 6 a 7 horas.

2. Fixar as raízes diretamente em álcool absoluto e ácido acético na proporção de 1:1 durante 24 horas ou mais. A fixação pode ser dispensada se as lâminas forem preparadas imediatamente e não houver interesse em conservar o material por mais tempo.

3. Hidrolisar as raízes (fixadas ou não) em um tubinho de vidro arredado contendo 9 partes de orceína a 2% em ácido acético a 70% e 1 parte de HCl N. A temperatura e a duração da hidrólise devem ser determinadas para cada material. Para as raízes de amendoim, o aquecimento do tubinho à chama por alguns segundos, seguido de meia hora a 30°C, foi suficiente; hidrólise satisfatória também é obtida apenas prolongando-se um pouco o primeiro aquecimento (sem ferver).

(3) Em outras espécies de *Arachis* e algumas espécies de *Coffea* foi fácil a determinação do número de cromossomos em raízes, utilizando-se esta técnica.

4. Colorir, colocando a pontinha da raiz (2 mm) em uma lâmina, numa gota deorceína a 1% em ácido acético a 45%. Decorridos alguns minutos, o bastante para o corante penetrar por todo o material, colocar por cima a lamínula. Se a hidrólise foi suficiente, o material cede ao pêso da própria lamínula, espalhando-se um pouco. Aquecer levemente à chama e completar o espalhamento, fazendo pressão com um palito de fósforo ou uma rôlha, até que o material fique reduzido a uma só camada de células. A lamínula não deve escorregar nesta operação.

5. Retirar o excesso de corante com papel de filtro e selar. Como selante pode-se usar a seguinte fórmula: 150 g de breu e 50 g de cêra de abelha.

Lâminas preparadas dessa maneira podem ser examinadas no mesmo dia, mas conservam-se em bom estado por cêrca de dois meses, tendo algumas delas durado até quatro meses.

#### A NEW TECHNIQUE FOR COUNTING CHROMOSOMES OF THE PEANUT PLANT

##### SUMMARY

The determination of the chromosome number in sections or smears of the peanut plant (*Arachis hypogaea* L.) is rather difficult because of the small number of cells with polar view of metaphase plates and for the tendency of the peanut chromosomes to clump together. Several techniques were tried in order to overcome these difficulties. The best results were obtained with the following method:

(a) pre-treatment of the root tips in a saturated solution of paradichlorobenzene at 16-20°C for 4-8 hours or in a 0,002 M solution of oxyquinoline at 16°C for 6-7 hours; (b) *hydrolysis in acetic orcein* (2% orcein in 70% acetic acid) and hydrochloric acid in the proportion of 9:1; (c) smear and staining in 1% acetic orcein in 45% acetic acid.

Paradichlorobenzene and oxyquinoline produce the c-mitotic effect on the chromosomes of *Arachis*. Consequently the number of cells at metaphase is greatly increased and the chromosomes appear shortened and scattered throughtout the cell. This makes the countings very easy.

Comments about the mode of action of paradichlorobenzene on *Arachis* chromosomes are made and a detailed schedule of the technique is presented.

##### LITERATURA CITADA

1. BERGER, C. A. & WITKUS, E. R. A cytological study of c-mitosis in the polysomatic plant *Spinacia oleracea*, with comparative observations on *Allium cepa*. Bull. Torrey Bot. Club 70:457-467. 1943.
2. BROWN, R. The effects of temperature on the duration of the different stages of cell division in the root tips. Jour. Ex. Bot. 2:96-110. 1951.

3. CARPENTIER, SIMONE. Action de la colchicine sur les racines e radicelles d'Ara-chide. *Revue de Cytologie et de Biologie Végétales* 15:153-178. 1954.
4. CONAGIN, CANDIDA H. T. M. Ação do paradichlorobenzeno sôbre os cromossomos somáticos. *Bragantia* 10:355-369. 1950.
5. HANSON, A. A. & OLDEMEYER, D. L. Staining root-tip smears with acetocarmine. *St. Techn.* 26:241-242. 1951.
6. LA COUR, L. Acetic-Orcein: a new stain-fixative for chromosomes. *St. Techn. material.* *St. Techn.* 16:169-174. 1941.
7. LESINS, KARLIS. Procedure to facilitate chromosome counts in difficult plant ma-
8. LEVAN, ALBERT. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas* 24:471-486. 1938.
9. MEDINA, DIXIER M. Observações citológicas em *Coffea*. *Coffea stenophylla*. Trabalho apresentado à Reunião de Botânica no Instituto Agrônômico de Campi-ans em 1952. (Não publicado).
10. MEYER, JAMES R. Prefixing with paradichlorobenzene to facilitate chromosome study. *St. Techn.* 20:121-125. 1945.
11. SHARMA, A. K. & BAL, A. K. Coumarin in chromosome analysis. *St. Techn.* 28:255-257. 1953.
12. ----- & BHATTACHARYYA, N. K. An investigation on the Karyotype of the genus *Crinum* and its phylogeny. *Genetica* 28:263-296. 1956.
13. -----, Chromosome studies on two genera of the family Pipe-  
raceae. *Genetica* 29:256-289. 1959.
14. ----- & MOORKERJEA, MISS ARCHANA. Paradichlorobenzene and other che-  
micals in chromosome work. *St. Techn.* 30:1-7. 1955.
15. ----- & SARKAR, S. K. Cytology of Different Species of Palms and its  
Bearing on the Solution of the Problems of Phylogeny and Speciation. *Genetica*  
28:361-488. 1956.
16. ----- & SHARMA, ARHANA. Karyotype studies in *Cestrum* as an aid to taxo-  
nomy. *Genetica* 29:83-100. 1957.
17. -----, Permanent smears of leaf tips for the study of chromo-  
somes. *St. Techn.* 32:167-169. 1957.
18. TJJO, J. H. & LEVAN, A. The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *Ann.*  
*Ext. Exp. Aula Dei* 2:21-64. 1950.
19. WITTMANN, W. Aceto-Iron-Haematoxylin for staining chromosomes in squashes of  
plant material. *St. Techn.* 37:27-30. 1962.
20. ZELLINGA, A. E. An improved acetic orcein squash method for serial cytological  
preparations. *Euphytica* 5:171-174. 1956.