

A Mitose nas Raizes do NOTHOSCORDUM FRAGRANS (Vent.) Kunth.

S. DE TOLEDO PIZA JUNIOR
Professor de Zoologia e Anatomia na
E. A. L. Q.

A. PARAVICINI TORRES
Assistente de Zoologia e Anatomia
na E. A. L. Q.

Constituindo o *Nothoscordum fragrans*, ao lado de *Allium sativum* e do *A. cepa* excellente material para o estudo da mitose somatica, vamos dar aqui, detalhadamente, o methodo que costumamos empregar na montagem de nossas preparações para que possa ser utilizado por todos aquelles que entre nós pretendam dedicar-se ao mesmo genero de estudos.

A observação da mitose somatica dessa planta se faz nas cellulas meristemaes da extremidade das raizes. Para isso collocam-se alguns bulbos ou "dentes" num vaso com areia molhada ou simplesmente com agua, para a producção de raizes. Assim que estas, que são cylindricas, broncas e tenras, attingem alguns millimetros, o que se verifica dentro de poucos dias (às vezes já no terceiro), cortam-se com uma tesoura as suas extremidades, que são immediatamente recebidas num pequeno balão de bocca larga contendo o liquido fixador.

Embora as cellulas em mitose só se encontrem nas proximidades do apice das raizes é conveniente, para facilitar a manipulação, que estas sejam cortadas com mais ou menos 0,5 cm. de comprimento.

A fixagem é feita no Bouin-Duboscq-Brasil, segundo as proporções estabelecidas por Lenoir (1) :

Alcool de 95°	645 c. c.
Formol	330 c. c.
Ac. acet. crist.	25 c. c.
Acido picrico	5 grs.

Nesse liquido as raizes permanecem de 24 a 48 horas. Findo este tempo inicia-se a lavagem das mesmas substituindo-

(1) Lenoir, M. — Évolution des Chromatines, Arch. de Morph. Génér. Expér., 26. pag. 4
Livr. Octave Doin, Paris, 1926.

se, no balão em que foram fixadas, o liquido fixador por alcool de 75°. Renova-se varias vezes o alcool que deve ficar no minimo uma hora em contacto com as raizes e agita-se cada vez até que elle saia completamente incolor, dando-se, então, por terminada a lavagem. Como a lavagem é muito mais perfeita e rapida com o alcool aquecido é conveniente fazer-se essa operação na estufa a 40° - 50°. Não ha inconveniente em deixar, durante a lavagem, o balão pernoitar na estufa.

Após a lavagem inicia-se a deshydratação substituindo successivamente o alcool de 75° por alcooes de 80, 85, 90, 95 e absoluto, em cada um dos quaes as raizes deverão permanecer de 2 a 3 horas. O ultimo banho, em alcool absoluto, pode prolongar-se até o dia seguinte.

Pode-se, tambem, sem levar em conta o grao exacto dos alcooes, proceder-se da seguinte maneira : substitue-se approximadamente 1/3 do volume do alcool a 75° contido no balão em que se acham as raizes, por egual volume de alcool absoluto. Depois de 2 ou 3 horas substitue-se metade do volume da nova mistura, egualmente por alcool absoluto. Após o mesmo lapso de tempo, substitue-se por alcool abs. 2/3 do volume da mistura. Finalmente, decantando todo o alcool dão-se ás raizes dois banhos de alcool absoluto, sendo que o ultimo pode durar toda a noite.

Procede-se em seguida á clarificação ou impregnação do objecto pelo dissolvente da parafina, a que se costuma chamar de intermediario. Como intermediario emprega-se, neste caso, o benzol. Vae-se substituindo gradativamente o alcool absoluto pelo benzol. Substitue-se primeiro 1/4, depois 2/4 da mistura, depois 3/4 e finalmente todo o volume. Em cada nova mistura as raizes podem ficar de 2 a 3 horas, sendo que podem passar a noite no benzol puro.

Vem agora a impregnação com parafina. Na estufa regulada a 56° - 58°, coloca-se uma capsula de porcelana com parafina pura, a qual funde geralmente a 54°. Na estufa deve haver tambem uma pinça metallica e duas caixas de Petri de 30 a 40 mm. approximadamente. Despeja-se parafina numa dessas caixas que deverá servir para o primeiro banho. Em seguida passam-se o benzol e ás raizes do balão para uma caixa de Petri relativa-

mente grande e leva-se esta á estufa por alguns minutos até que o seu conteúdo adquira a temperatura daquelle. Feito isto, com o auxilio da pinça e procurando apanhar as raizes pela extremidade opposta ao appice, passam-se estas do benzol para a parafina, na qual devem permanecer por umas quatro horas. Na outra caixa derrama-se a parafina para o segundo banho, passando-se para esta as raizes com o auxilio da pinça. O segundo banho deve durar toda a noite. Na manhã seguinte, procede-se á inclusão.

Besunta-se com glicerina uma caixa de Petri raza e de uns 50 mm. ou pouco mais de diamentro, deitando-se nella parafina. Com a pinça, collocam-se nella as raizes, duas a duas, com o apice do mesmo lado, dispostas em varias series e com cuidado para não alterar a posição das mesmas, retira-se a caixa da estufa, assentando o seu fundo sobre a superficie da agua fria contida num recipiente qualquer.

Assim que uma nata mais ou menos espessa se fórma á superficie da parafina, deixa-se cair a caixa do fundo do recipiente, onde permanecerá até completo resfriamento. Retira-se, em seguida, a caixa do recipiente e passando-se a lamina de de um canivete ou escalpelo entre a parafina solidificada e a parede da caixa, afunda-se novamente esta e deixa-se até que a parafina se desprenda e venha ter á tona da agua. Divide-se então este bloco circular em tantos pequeninos, blocos quadrangulares quantos forem os grupos de duas raizes, que se distinguem perfeitamente por transparencia no seio da parafina.

Com estes blocos, que vão para o microtomo, praticam-se cortes longitudinaes de 8 microns de espessura. Ao collar o bloco ao porta-objectos do microtomo, aparam-se as suas faces, reduzindo-as e deixando-as bem parallelas.

A distensão e collagem dos cortes se faz pelo methodo usado pslo Prof. Toledo Piza em todos os seus trabalhos e que differe um pouco do methdo ordinario. Para isso, procede-se do seguinte modo. Colloca-se no centro da lamina porta-objectos um pouco de agua distillada, misturando-se a esta, com um bastão fino de vidro, uma gotta de albumina glicerinada de Meyer.

Os cortes, retirados da navalha do microtomo com o au-

xilio de um delicado pincel, em pequenas fitas de 3, são dispostos sobre o liquido da lamina em 3 series. Collocando-se a lamina sobre a estufa que serviu para a inclusão, os cortes logo se distendem perfeitamente. Absorve-se então o liquido com um papel de filtro e com uma agulha de preparção dá-se uma disposição perfeita e definitiva aos cortes que deslisam facilmente sobre a superficie humida da lamina. As laminas assim preparadas ficam sobre a estufa até seccarem completamente.

Procede-se em seguida á hydratação dos cortes, fazendo-os percorrer uma serie de frascos de Borrel, o primeiro com xylol, o segundo com alcool absoluto e os outros com alcooes progressivamente mais fracos, sendo que os dois ultimos contem apenas agua distillada. Uma bõa hydratação consegue-se com a seguinte serie :

Xylol — alc. abs. — alc. 95° — alc. 85° — alc. 75° — alc. 40°
agua — agua devendo as laminas permanecerem cerca de 15 minutos em cada frasco.

A coloração se faz pela hematoxylina ferrica de Heidenhain. Da agua distillada as preparações passam para um frasco de Borrel contendo uma solução a 3 % de alumen de ferro, onde permanecerão por toda a noite. No dia seguinte pela manhã são lavadas em agua distillada durante alguns minutos e mergulhadas na hematoxylina (1) por algumas horas (até 24).

Quando os cortes estiverem intensamente coloridos de negro, inicia-se a diferenciação, empregando-se para isso uma solução a 2 % de alumen de ferro. Assim que a diferenciação attinja o ponto desejado, lavam-se as preparações durante 15 minutos na agua corrente, fazendo-as, em seguida, percorrer a serie alcoolica, da agua para o xylol (de 10 a 15 minutos em cada alcool e um minuto apenas no xylol). Feito isto, montam-se as preparações no balsamo.

*
* *

Passemos agora ao estudo da mitose somatica do *Nothoscordum fragrans*.

(1) Sol. a 10 oço de hematoxilina no alcool a 90.º 10 c. c.
Agua distillada 90 c. c.

Ao fazer a descripção dos phenomenos que se seguem, levaremos em conta, unicamente, os que se referem ao filamento chromatico.

Prophase — A prophase no *Nothoscordum fragrans* não é como se verifica com quasi todas as plantas, uma phase preliminar em que os chromosomios, contrahindo-se e regularizando a sua fórma, preparam-se para a divisão. Aqui, como no *Allium sativum*, (1) os chromosomios que já vêm divididos do nucleo em repouso, apenas se preparam para a separação. Sendo assim, desde que esses elementos começam a ser observados no seio da caryolymphe, isto é, logo que elles, em virtude da contracção e chromatinização progressivas que experimentam, adquirem uma espessura e uma coloração que permitem um exame commodo e perfeito, já se mostram nitidamente divididos. Cada chromosomio prophasico pois, apresenta-se constituido por dois filamentos independentes, enrolados em espiral, um sobre o outro, provenientes da divisão longitudinal de um chromosomio primitivo (Fig. 1). A principio os chromosomios filhos de cada par mostravam-se frouxamente entrelaçados, de maneira a não permittir duvida alguma a respeito da perfeita independencia que entre elles existe.

No inicio da prophase não é possível verificar a descontinuidade do filamento chromatico. Em qualquer ponto, porém, que seja examinado, revella esse filamento o caracteristico aspecto duplo precedentemente indicado. Cada uma das suas metades se mostra então como um tenue fio de diametro desigual, sobre o qual a chromatina se distribue irregularmente (Fig. 1). Mais tarde essas metades vão adquirindo uma coloração e um diametro mais uniformes, até originarem um espirema de aspecto homogeneo em todas as suas partes (Fig. 2). Com o progresso da contracção torna-se possível verificar a descontinuidade do espirema. Os elementos independentes e duplos que o constituem, continuando a se contrahir, acabam dando origem aos chromosomios metaphasicos, que são relativamente longos e se apresentam recurvados em U ou V de ramos eguaes ou não.

Metaphase — A medida que a prophase avança e a contracção dos chromosomios duplos progride, os elementos de

cada par se vão apertando cada vez mais, até que, na metaphase, apenas se mostram separados por uma fenda longitudinal, ligeiramente espiralada em alguns, que apesar de estreita, apresenta-se perfeitamente distincta (Fig. 3). Os chromosomios reunidos na placa equatorial apresentam os seus dois ramos ora em contacto ou muito proximos, ora mais ou menos afastados, ora se continuando quasi que em linha recta. Cada ramo podê, por sua vez, apresentar-se com um aspecto sinuoso ou diversamente recurvado.

Anaphase — A separação dos chromosomios que compõem cada par, dá-se segundo a fenda mediana que os delimita, de maneira autonoma e ao mesmo tempo ao longo de toda a sua extensão. O afastamento é que se verifica pelas partes inseridas no fuso achromatico. A avaliar pelas relações de comprimento entre os dois ramos dos chromosomios nas anaphases avançadas, a inserção desses elementos no fuso achromatico pode ser mediana ou sub-mediana. Assim que começa a separação das duas metades que constituem os chromosomios metaphasicos, já a divisão de cada uma dellas se inicia pelo apparecimento, ao longo de todo o seu comprimento de uma estreita fenda mediana (Fig. 4). Em consequencia desta tão prematura fissuração dos chromosomios - filhos, não é possível assignalar, não só durante a anaphase, como no decurso de toda a mitose, a existencia de elementos não fissurados. E até pelo contrario, os chromosomios quadripartidos previstos por TOLEDO PIZA para o *Allium sativum*, (2) podem ser aqui facilmente observados, exactamente num periodo de transição da metaphase para a anaphase (Fig. 5) E' nessa occasião, e quem sabe si tambem um pouquinho mais cedo, que se inicia o fendilhamento longitudinal dos chromosomios - filhos. Estes dirigem-se para os pólos, em cujas proximidades entram em cerrado "tassement" em que perdem por completo a sua individualidade. Quando alguns ramos chromosomicos ficam fóra da massa polar comprimida, nelles se póde perfeitamente observar a fenda mediana verificada em toda a anaphase, tal como se dá com o *Allium sativum*. (1^e 2). (Fig. 6).

Telophase — A telophase se inicia pelo afastamento dos chromosomios, seguido de deschromatinização e estiramento

progressivos. Assim que se afastam os chromosomios, possível se torna verificar que elles apresentam a mesma duplicidade com que entraram em "tassement" (Fig. 7). Distendendo-se á medida que o nucleo caminha para o repouso, os dois elementos que constituem cada chromosomio bipartido se entrelaçam, o que pôde ser observado nas telophases relativamente avançadas (Fig. 8). Dahi para diante os chromosomios se vão cada vez mais distendendo e deschromatinizando, até desaparecerem completamente no nucleo interphasico.

A mitose do *Nothoscordum fragrans* se desenrola segundo os mesmissimos moldes que a mitose do *Allium sativum* estudada por TOLEDO PIZA em 1928 (1) e mais tarde interpretada de maneira diversa por esse autor (3). Revendo, recentemente, aquelle seu trabalho, e fazendo algumas observações com o *Nothoscordum*, pensa, TOLEDO PIZA, haver encontrado nessas duas Liliaceas, um excellento argumento em favor da sua theoria do Plastinema. (2)

RÉSUMÉ

Les auteurs, après avoir donné une description détaillé de la methode employé pour le montage des coupes à la parafine, entrent dans l'étude de la mitose somatique du *Nothoscordum fragrans*, en montrant, que les chromosomes, divisés longitudinalement dès le début de l'anaphase, gardent leur duplicité jusqu'à la fin de cette phase, où, en entrant en tassement polaire ils perdent, parfois, leur individualité. Au commencement de la télaphase, la duplicité chromosomique réparaît, pour disparaître de nouveau dans le noyau au repos. 'A la mitose suivante, on voit que les chromosomes, très longs et très délicats, se montrent doubles dès le début de la prophase, en conservant cette duplicité jusqu'à l'anaphase. 'A ce moment là, les chromosomes-fils, qui présentent, à leur tour, une fente mediane, se séparent pour se diriger aux pôles opposés.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Fig. 1 — Nucleo de uma cellula meristemal da raiz de *Nothoscordum fragrans*, em inicio de próphase. (Original).

- Fig. 2 — Cellula meristemal da raiz de *Nothoscordum fragrans*, em plena profase. (Original, no estilo da fig. 16,c de Belar) (4).
- Fig. 3 — Cellula meristemal da raiz de *Nothoscordum fragrans*, em metaphase. (Original).
- Fig. 4 — Cellula meristemal da raiz de *Nothoscordum fragrans*, em plena anaphase. (Original).
- Fig. 5 — Cellula meristemal da raiz de *Nothoscordum fragrans*, em periodo de transição da metaphase para a anaphase, vendo-se os chromosomios quadripartidos. (Original).
- Fig. 6 — Cellula meristemal da raiz do *Nothoscordum fragrans*, em anaphase avançada, vendo-se os chromosomios em cerrado "tassement". (Original).
- Fig. 7 — Cellula em telophase, na extremidade da raiz do *Nothoscordum fragrans*. (Original).
- Fig. 8 — Chromosomios duplos, entrelaçados, de uma cellula em telophase, da extremidade da raiz do *Nothoscordum fragrans*. (Original).

- 1) TOLEDO PIZA, S. DE — Historia dos chromosomios na mitose somatica do alho. Rev. de Agric. Vol. 3, Nº 9 - 10, 1928, pag. 17 - 20.
- 2) TOLEDO PIZA, S. DE — Mitose somatica. Alguns casos interessantes debaixo do ponto de vista da theoria do Platinema. Bol. do Mus. Nac. Vol. VII, Nº 3. 1931.
- 3) TOLEDO PIZA, S. DE — Localizaçào dos factores na linha nuclear como base de uma nova theoria sobre a hereditariedade, Piracicaba, 1930, pag. 78.
- 4) BELAR — Der Formwechsel der Protistenkerne, verl. von Gustav Fischer, Jena, 1926, pag. 27

A degeneração é um mal dos processos de reprodução zootecnica, sempre que a eles não presida criterio científico. — EPICARMUS.