



## Preparo de lâminas por secagem ao ar

Modificado de *Carvalho e Saraiva (1993)*

### Separar após a digestão das raízes:

- Fixador 3:1 fresco (metanol:acético ou etanol:acético, o mesmo usado para fixação das raízes) e manter no gelo.
- Acético 45% acondicionado num borel.
- Lâminas identificadas usando um lápis para vidro.

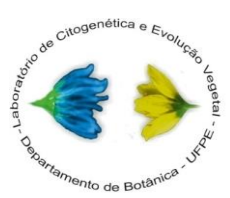
1. Lave as raízes duas vezes em água destilada.
2. Separe a região meristemática do restante da raiz com auxílio de uma lupa, colocando os meristemas em uma lâmina (ou placa de Petri pequena), devidamente etiquetada, com cuidado para não ressecar o material
3. Retire o excesso de água, adicione uma gota da solução enzimática celulase 2% (Onozuka) e pectinase 20% (Sigma) que cubra todas as pontas de raízes e incube as lâminas em câmara úmida em estufa a 37 °C, pelo tempo necessário para que o material fique extremamente macio, quase despedaçando com um simples toque.
4. Após o tempo de digestão, retire a solução enzimática com a ajuda de um papel de filtro, com cuidado para não tocar na raiz e lave-as adicionando água destilada cuidadosamente para não danificá-las. Repetir o processo duas vezes. Na última lavagem, o material poderá começar a ser preparado ou poderá ser mantido na câmara úmida a aproximadamente 4 °C.

### Obs. Realizar todo procedimento utilizando luvas e máscaras de proteção.

5. Identificar a lâmina usando um lápis para vidro caso necessário (A identificação vai apagar durante as lavagens caso esteja escrito à caneta).
6. Lave a lâmina com **fixador gelado** recém-preparado antes de colocar a raiz, utilizando uma pipeta Pauster. A partir desse item, a lâmina deve ficar em posição ligeiramente inclinada mediante a colocação de um apoio em uma das laterais.



## Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



7. Coloque 1-3 raízes com auxílio da pinça ou pipeta Pasteur e lave-a com mais fixador gelado para retirar toda a água. Comece a macerar o material com o auxílio de seringas de insulina.

**Obs. O tamanho da ponta de raiz a ser macerada é importante. Se for grande demais, a lâmina terá, além das células meristemáticas, células diferenciadas que não interessam e atrapalham a visualização das meristemáticas. Se for pequeno demais, corre-se o risco de desperdiçar células meristemáticas.**

8. Continue lavando com fixador gelado à medida que o material for macerado. Quando o material estiver completamente macerado, lave a lâmina pela última vez com fixador por pelo menos duas vezes.
9. Seque a lâmina com bomba de ar e mergulhe em uma solução de ácido acético a 45% por um período de 10 a 15 s (é possível deixar incubando até 5 min enquanto faz outras lâminas).
10. Leve a lâmina para a estufa a 37°C, onde ocorrerá a secagem.
11. Identifique a área da lâmina (24 x 32 ou 22 x 22 mm) onde estão a maioria das células em mitose.

Modificado de:

C. R. Carvalho, L. S. Saraiva. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotechnic and Histochemistry*, 68:142-145, 1993.

