

Tentative de "banding" des chromosomes du cotonnier

J.V. Escalant et J. Schwendiman
avec la collaboration technique de P. Pallares

Laboratoire de Cytogénétique du G.E.R.D.A.T., B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex.

RÉSUMÉ

On a essayé de mettre au point une coloration différentielle des chromosomes du cotonnier, en tentant d'abord d'adapter les techniques déjà utilisées sur d'autres végétaux. Diverses formules de dénaturation, comme par l'hydroxyde de baryum (suivi d'un tampon 2 x SSC) ou par l'HC. concentré, puis d'une coloration avec le Giemsa n'ont pas donné de résultats

suffisamment précis pour établir un caryogramme. Par contre, l'orcéine, utilisée dans le fixateur et le traitement ramollissant, permet de visualiser des chromosomes avec des bandes distinctes. Un protocole détaillé est donné qui devrait autoriser des comparaisons entre les espèces de cotonnier.

MOTS CLÉS : Banding *Gossypium*, chromosomes, Giemsa, orceine.

On reconnaît actuellement dans le genre *Gossypium* 33 espèces diploïdes ($2n = 2x = 26$ chromosomes) réparties selon 7 génomes (de A à G) et 4 espèces tétraploïdes ($2n = 4x = 52$ chromosomes) résultant de l'hybridation interspécifique d'espèces des génomes A et D, suivie du doublement de l'hybride.

De nombreux auteurs, parmi lesquels il convient de citer SKOVSTED (1937), WEBBER (1939), HARLAND (1939), ont cherché à définir les caryotypes des différentes espèces de cotonniers connues à cette époque, sans toutefois parvenir à une précision convenable. Ce n'est que récemment qu'EDWARDS, seul (1977, 1979, 1980) ou associé à MIRZA (1979), présente les caryotypes de 4 espèces, à savoir : *G. herbaceum* var. *africanum* (génome A), *G. sturtianum* et *G. australe* (génome C), *G. bickii* (génome G créé à cette occasion). Le nombre restreint d'es-

pèces jusqu'ici analysées s'explique en grande partie par les difficultés rencontrées pour obtenir un nombre suffisant de plaques métaphasiques bien dispersées, par la taille relativement petite des chromosomes et par le fait que les centromères sont peu visibles.

Face aux problèmes qui se posent pour identifier individuellement les chromosomes à l'aide de colorations conventionnelles (Feulgen, notamment), nous avons tenté d'appliquer au cotonnier différentes techniques de « banding ». Ces colorations différentielles d'abord mises au point sur chromosomes animaux (PARDEE et GALL, 1970; ADRIGHT et HSU, 1971), ont été rapidement adaptées aux chromosomes végétaux (VOSA et MARCHI, 1972; SCHWEIZER, 1973; SAPRA et NATARAJAK, 1973).

MATÉRIEL ET PROTOCOLE

Le matériel végétal consiste en pointes de racines de cotonniers diploïdes, en l'occurrence les deux espèces qui constituent le génome A : *G. herbaceum* var. *africanum* et *G. arboreum*, dont les chromosomes sont parmi les plus longs du genre. Plus rarement, *G. thurberii* (génome D) a aussi été utilisé.

L'une des principales difficultés qu'il convient de résoudre en préalable à toute étude est l'obtention d'un nombre conséquent de cellules au stade pré- ou métaphasique : il faut alors utiliser un agent mitoclasique et nous avons choisi, après divers essais, le monobromonaphthalène en solution saturée dans l'eau. La seule originalité de la méthode est son utilisation à 30° et non pas à 4°, comme c'est généralement le cas. Pour l'obtention de chromosomes dispersés, il fut nécessaire de pratiquer des traitements ramollissants, afin d'écraser convenablement les cellules du méristème libres de leurs parois pecto-cellulosiques. Le protocole suivant est préconisé pour l'obtention des préparations microscopiques destinées à subir les traitements ultérieurs :

1) Germination des graines

a) mettre les graines dans une boîte de Pétri, sur un papier filtre humidifié ;

b) placer cette boîte dans une étuve à 30 °C durant 48 heures.

2) Prétraitement

a) préparer une solution saturée de monobromonaphthalène dans l'eau distillée ;

b) filtrer cette solution directement dans la boîte de Pétri sur les graines entières, à 30 °C, durant 4 heures ;

c) prélever les pointes de racine et les laver dans plusieurs bains successivement d'acide acétique 45 % et d'eau distillée.

3) Fixation

24 heures dans une solution d'éthanol-acétique 3-1 à 4 °C.

4) Traitements ramollissants

a) mettre les pointes de racines dans une solution d'acide acétique 45 %, 20 minutes à 60 °C ;

b) les racines molles et translucides sont alors mises dans une solution enzymatique aqueuse à 0,5 % de cellulase et 0,5 % de pectinase à pH 4, 15 minutes à température ambiante.

5) Ecrasement

Après un rinçage très doux à l'eau distillée, les pointes de racines sont écrasées dans une goutte d'acide acétique 45 % entre lame et lamelle parfaitement propres et sèches. L'utilisation d'adhésif est ici vivement déconseillée.

6) Découpage et séchage

Les lames sont mises au congélateur durant 15 minutes, puis les lamelles sont décollées à l'aide d'un scalpel. Le tout est alors mis à sécher à l'étuve à 30 °C pour une nuit.

METHODES

I. Techniques de coloration différentielle utilisant le Giemsa

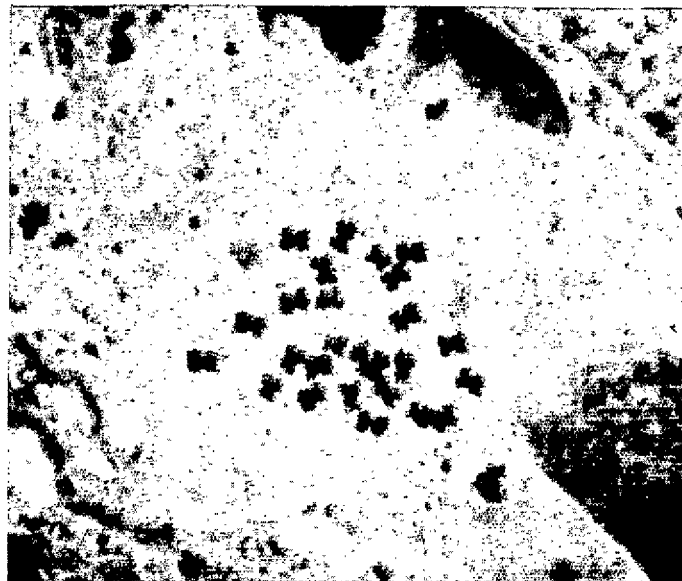
Le Giemsa est le colorant le plus utilisé dans la mise en évidence de bandes sur des chromosomes végétaux. Cette coloration intervient à la suite de différentes techniques dont les principales sont les techniques de « dénaturation-renaturation », les techniques de dénaturation seules et les techniques enzymatiques.

1) Technique de « dénaturation-renaturation »

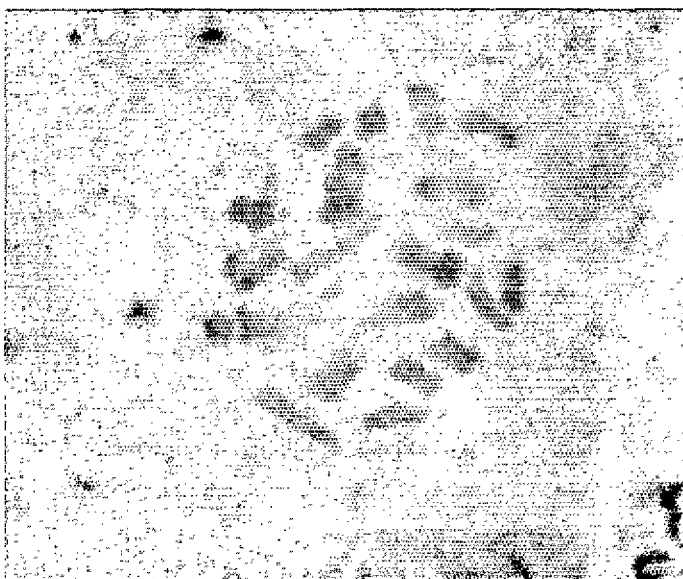
La plus classiquement utilisée, elle consiste en une dénaturation de l'ADN par l'hydroxyde de baryum, suivie d'une renaturation dans un tampon 2 x SSC, puis d'une coloration au Giemsa (FILLON, 1974; SEAL et BENNETT, 1981; TEOH et HUTCHINSON, 1983).



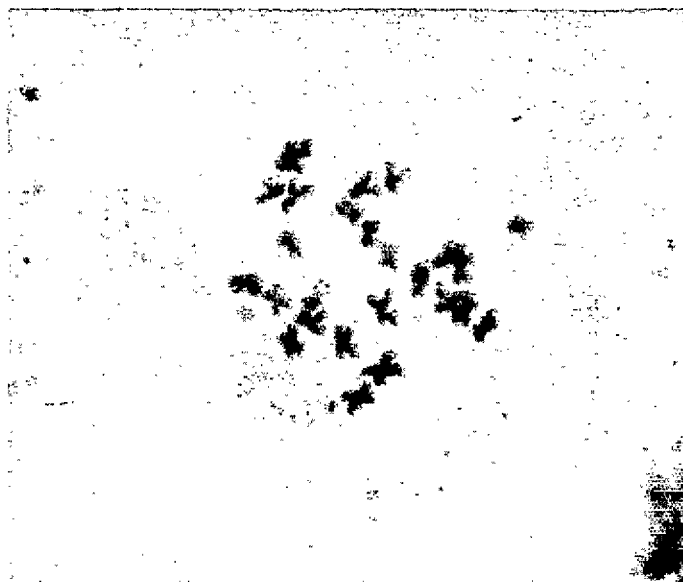
Vue 1.



Vue 4.



Vue 2.



Vue 3.

FIG. 1. — Métaphase de *G. herbaceum* var. *africanum* obtenue après un traitement de « dénaturation-renaturation ». Les chromosomes apparaissent très contractés et sans banding ($\times 1000$).

FIG. 1. — *Metaphase of G. herbaceum* var. *africanum* obtained after a "denaturation-renaturation" treatment. Chromosomes are very contracted and show no banding ($\times 1000$).

FIG. 2. — Prémétaphase de *G. herbaceum* var. *africanum* après traitement dénaturant par l'HCl 10 N. Banding present, mais peu net ($\times 1000$).

FIG. 2. — *Premetaphase of G. herbaceum* var. *africanum* obtained after a denaturing treatment by HCl 10 N. Chromosomes are not distinctly banded ($\times 1000$).

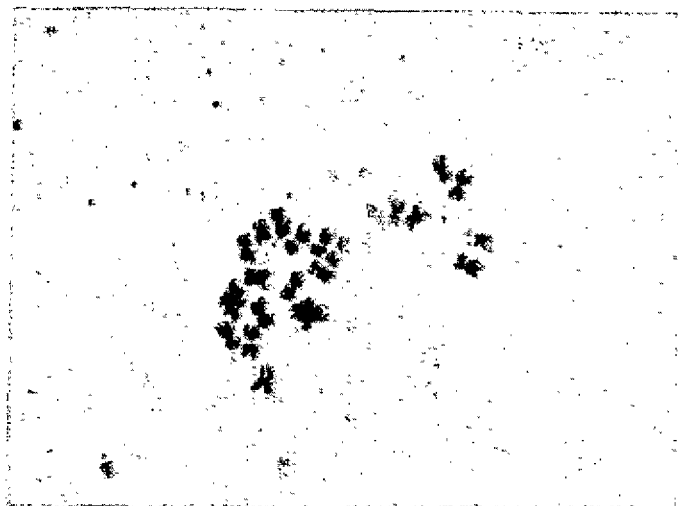
FIG. 3. — Métaphase de *G. thurberii* après traitement par l'orceïne acétique. Centromères bien localisés ($\times 1000$).

FIG. 3. — *Metaphase of G. thurberii* obtained after a treatment by acetic orcein. Centromeres are clearly localized ($\times 1000$).

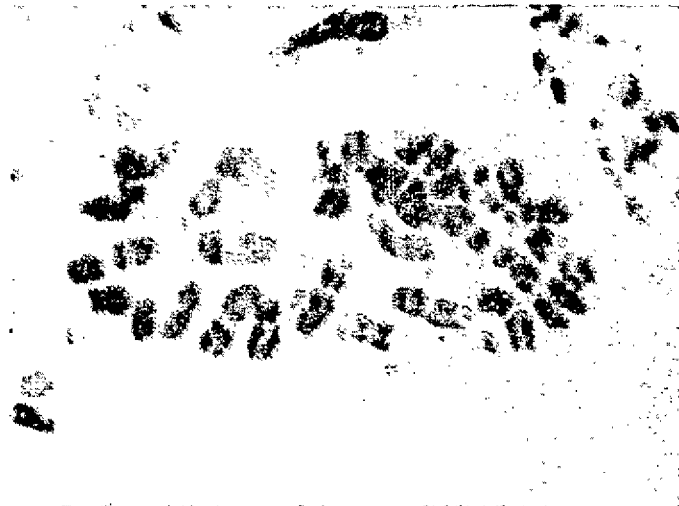
FIG. 4. — Métaphase de *G. arboreum* après traitement par l'orceïne acétique. Chromosomes très contractés ($\times 1000$).

FIG. 4. — *Metaphase of G. arboreum* obtained after a treatment by acetic orcein. Chromosomes are very contracted ($\times 1000$).





Vue 5.



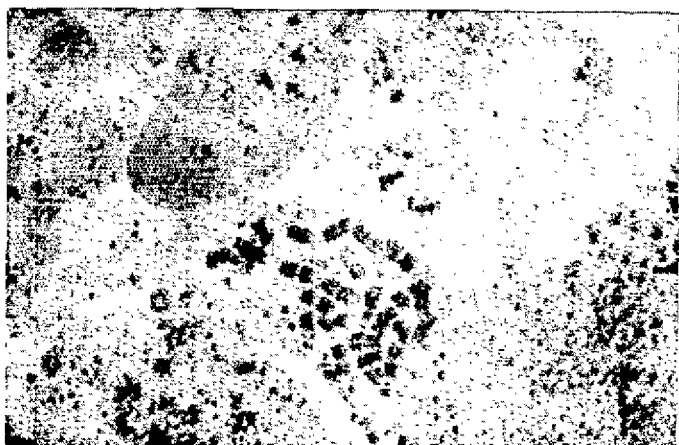
Vue 6.

FIG. 5. — Métaphase de *G. arboreum*, traitement par l'orceïne acétique. Centromères bien visibles, satellites très nets ($\times 1\,000$).

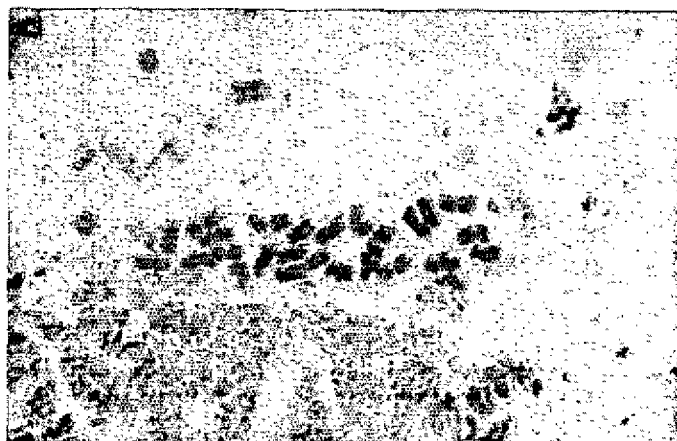
FIG. 5. — Metaphase of *G. arboreum* obtained after a treatment by acetic orcein. Centromeres and satellites are distinctly visible ($\times 1\,000$).

FIG. 6, 7 et 8. — Métaphases de *G. arboreum*, traitement par l'orceïne acétique. Banding bien visible ($\times 2\,000$, $\times 1\,000$, $\times 1\,000$ respectivement).

FIG. 6, 7 and 8. — Metaphases of *G. arboreum* obtained after treatments by acetic orcein. Banding is clearly marked ($\times 2\,000$, $\times 1\,000$ and $\times 1\,000$ respectively).



Vue 7.



Vue 8.

a) préparation de la solution de Ba (OH)₂: solution saturée dans l'eau, portée à 80°C avec agitation, puis refroidie à 40°C, température à laquelle elle est filtrée;

b) plonger les lames et les lamelles dans cette solution durant 5 minutes à 50°C;

c) rincer à l'eau distillée (4 bains de 15 minutes);

d) plonger dans un tampon 2 × SSC (annexes) à 60°C, pour 30 minutes;

e) rincer à l'eau distillée (4 bains de 15 minutes);

f) colorer au Giemsa (annexes) durant 30 minutes;

g) séchage et montage dans l'euparal.

2) Technique de dénaturation seule à l'HCl concentré

Utilisée par JOSHI et RANJERAR en 1980, elle ne nécessite pas de bain renaturant à haute température.

a) les lames sont mises dans une solution d'HCl 10 N à température ambiante durant 5 minutes;

b) rincées à l'eau distillée (3 bains de 5 minutes);

c) séchées et colorées au Giemsa durant 15 minutes;

d) montage dans l'euparal.

Le traitement par l'hydroxyde de baryum, suivi d'une renaturation et d'une coloration au Giemsa, permet d'observer en prémétaphase des chromosomes peu contractés, légèrement bandés. Par contre, en métaphase, ils sont plus contractés, colorés de façon uniforme, avec toutefois une interruption de la coloration au niveau du centromère (fig. 1).

Un résultat similaire est obtenu avec l'HCl concentré, mais quelques bandes sont discernables (fig. 2).

Des tentatives que nous avons faites, il ressort actuellement que le transfert au cotonnier des procédés fonctionnels sur

II. Technique de coloration différentielle utilisant l'orcéine acétique

L'orcéine acétique, quoique peu utilisée dans la recherche du «banding» a permis de mettre en évidence des bandes «0» sur *Lathyrus* sp. (LAVANIA et SHARMA, 1979) et des bandes C sur *Triticales* (SAPRA et STEWART, 1980).

Il convient ici de reprendre le protocole d'obtention des préparations donné précédemment, en y modifiant comme suit les seuls stades 3 et 4:

3) Fixation

Les pointes de racines sont mises dans une solution d'orcéine acétique (annexes) pour 24 heures à 4°C.

4) Ramollissement

a) macération dans une solution d'HCl-orcéine acétique (annexes) durant 3 heures à température ambiante;

b) les pointes sont alors remises dans l'orcéine acétique pour 3 à 4 heures à température ambiante;

c) avant l'écrasement, un passage dans l'acide acétique à 45%, durant 20 minutes et à 60%, évite une surcoloration et facilite la dispersion des cellules et des chromosomes.

Les points 5 et 6 du protocole restent identiques.

RESULTATS

d'autres végétaux (à l'aide du Giemsa) n'aboutit qu'à un banding peu reproductible et d'une netteté insuffisante. D'autres mises au point sont certainement nécessaires.

Par contre, le protocole avec l'acéto-orcéine nous a permis d'observer deux types de résultats: d'une part, des chromosomes très contractés dont seuls les télomères sont intensément colorés (fig. 3 à 5) et, d'autre part, des chromosomes peu contractés présentant jusqu'à 6 bandes distinctes (fig. 6 à 8). Sur de tels chromosomes, l'absence de coloration au niveau des centromeres permet de les localiser.

DISCUSSION

Le monobromonaphthalène en solution saturée dans l'eau est utilisé par tous les auteurs à 4°C, durant 3 heures, sur des pointes de racines séparées de leurs gaines. Appliqué au cotonnier, ce protocole n'a pas permis d'obtenir un bon indice mitotique de façon reproductible. Il se peut que la température de 4°C et le fait de couper les pointes de racines provoquent un stress physiologique important, entraînant le ralentissement, voire l'arrêt total de l'activité mitotique. Ceci semble confirmé par l'excellent résultat obtenu en utilisant le monobromonaphthalène sur des graines germées entières, à la température de 30°C.

L'orcéine acétique paraît, jusqu'à présent, le colorant le mieux adapté à l'obtention d'un banding sur chromosomes de cotonnier. Le protocole proposé a été testé sur trois espèces de cotonnier: *G. herbaceum* var. *africanum*, *G. arboreum* et *G. thurberii*. Il fait apparaître chez les trois espèces des bandes très nettes le long des chromosomes. Il convient maintenant de multiplier les essais afin de pouvoir vérifier la position des bandes sur les chromosomes d'une même espèce, appariés les chromosomes et ainsi établir les caryotypes bandés des espèces que l'on pourra comparer.

ANNEXES

Giemsa

- 3 cc de Giemsa du commerce en solution;
- 3 cc de tampon Na₂HPO₄ 0,5 M;
- 3 cc de tampon NaH₂PO₄ 0,5 M;
- 41 cc d'eau distillée.

Tampon 2 × SSC

- solution titrant:
- 0,03 M de trisodium citrate (Na₃C₆H₅O₇ · 2 H₂O);

- 0,3 M de chlorure de sodium (NaCl), dans l'eau distillée.
- Le pH est ajusté à 7 avec l'HCl N.

Orcéine acétique

- 3 g d'orcéine synthétique en poudre;
- 45 cc d'acide acétique;
- 55 cc d'eau distillée.

HCl-orcéine acétique

- 1 volume d'HCl 2 N dans 9 volumes d'orcéine acétique.

BIBLIOGRAPHIE

- ADRIGHI F.E. and T.C. HSU, 1971. — Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, 10, 81-86.
- EDWARDS G.A., 1977. — The karyotype of *Gossypium herbaceum* L. *Caryologia*, 30, 3, 369-374.
- EDWARDS G.A., 1979. — Genomes of the Australian wild species of cotton. I. *Gossypium sturtianum*, the standard for the C genome. *Can. J. Genet. Cytol.*, 21, 363-366.
- EDWARDS G.A., 1980. — Genomes of the Australian wild species of cotton. III. *Gossypium australe*. *Caryologia*, 33, 313-319.
- EDWARDS G.A. and M.A. MIRZA, 1979. — Genomes of the Australian wild species of cotton. II. The designation of a new G genome for *Gossypium bickii*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 21, 367-372.
- FILION N.G., 1974. — Differential Giemsa staining in plants I. Banding patterns in three cultivars of *Tulipa*. *Chromosoma*, 49, 51-60.

- HARLAND S.C., 1939. — The genetics of cotton. *Jonathan Cape, London*.
- JOSHI C.P. and P.K. RANJEKAR, 1980. — Technique for heterochromatin in the chromosomes of *Nigella damascena* and *Vicia faba*. *Hereditas*, 79, 154-156.
- LAVANIA U.C. and A.K. SHARMA, 1979. — Trypsin-orcein banding in plant chromosomes. *Stain Technol.*, 54, 3, 261-263.
- PARDUE M. and J.G. GALL, 1970. — Chromosomal localization of mouse satellite D.N.A. *Science*, 168, 1356-1358.
- SAPRA V. and M.D. STEWART, 1980. — Staining of heterochromatin bands and the determination of rye chromosomes in *Triticale* (wheat x rye hybrid). *Euphytica*, 29, 497-509.
- SARMA N.P. and A. NATARAJAN, 1973. — Identification of heterochromatic regions in the chromosomes of rye. *Hereditas*, 74, 233-238.
- SCHWEIZER D., 1973. — Differential staining of plant chromosomes with Giemsa. *Chromosoma*, 40, 307-320.
- SEAL A.G. and M.D. BENNETT, 1981. — The rye genome in winter hexaploid triticales. *Can. J. Genet. Cytol.*, 23, 647-653.
- SKOVSTED A., 1937. — Cytological studies in cotton. IV. Chromosome conjugation in interspecific hybrids. *J. Genet.*, 34, 97-134.
- TEOH S.B. and J. HUTCHINSON, 1983. — Interspecific variation in C-banded chromosomes of diploid *Aegilops species*. *Theor. appl. Genet.*, 65, 31-40.
- VOSA C.G. and P. MARCHI, 1972. — Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. *Nat. New Biol.*, 237, 191-192.
- WEBBER J.M., 1939. — Relationships in the genus *Gossypium* as indicated by cytological data. *J. Agric. Res. (Washington, D.C.)*, 58, 237-261.

Attempted banding of cotton chromosomes

J.V. Escalant and J. Schwendiman
with P. Pallares's technical collaboration

Laboratoire de Cytogénétique du G.E.R.D.A.T., B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex.

SUMMARY

A cotton chromosome differential staining has been tentatively developed, trying first to adapt the methods already applied to other plants. Denaturation techniques, using barium hydroxyde (followed by a 2% SSC buffer) or concentrated HCl, both followed by staining with Giemsa, have not given results precise enough for a karyogram to be established. On

the opposite, the use of acetic orcein in the fixing solution and a softening treatment allow chromosomes with distinct bands to be visually shown. A detailed procedure is given, which should make it possible to compare the different cotton species.

KEY-WORDS : Banding, *Gossypium*, chromosomes, Giemsa, Orcein.

The genus *Gossypium* is recognized today as comprising 33 diploid species ($2n = 2x = 26$ chromosomes) distributed according to 7 genomes (from A to G) and 4 tetraploid species ($2n = 4x = 52$ chromosomes) derived from interspecific hybridization between the species of the A and D genomes followed by the hybrid doubling.

Many authors, among whom SKOVSTED (1937), WEBBER (1939) and HARLAND (1939) should be cited, have attempted to define the karyotypes of the different cotton species known at the time, without reaching any satisfactory precision. It was only recently that EDWARDS, alone (1977, 1979, 1980) or associated with MIRZA (1979), presented the karyotypes of four species, namely: *G. herbaceum* var. *africanum* (A genome), *G. sturtianum* and *G. australe* (C genome) and *G. bickii* (G genome created

on this occasion). The reduced number of species so far analysed is mainly due to the difficulties met in obtaining enough plates showing proper chromosome dispersions, to the comparatively small size of the chromosomes and to the lack of visibility of the centromeres.

In front of the problems posed by individual identifications of chromosomes by conventional staining methods (with Feulgen for instance), we have tried to apply various banding techniques to the cotton plant. These differential staining techniques, first developed on animal chromosomes (PARDUE and GALL, 1970; ABRIGHI and HSU, 1971), have been quickly adapted to plant chromosomes (VOSA and MARCHI, 1972; SCHWEIZER, 1973; SAPRA and NATARAJAN, 1973).

MATERIAL AND PROCEDURE

The material consists of root tips of diploid cotton plants which, in this particular case, are the two species constituting the A genome i.e. *G. herbaceum* var. *africanum* and *G. arboreum*, the chromosomes of which are among the longest in the genus. More rarely, *G. thurberii* (D genome) has also been used.

One of the main difficulties which should be solved before any study can be performed is to obtain enough cells in the pre-metaphasic or metaphasic stage; a mitoclastic agent must be used and, after various tests, we have selected monobromonaphthalene in solution saturated in water. This technique is original in the sense that it is used at 30°, when the usual temperature is 4°. To obtain dispersed chromosomes, it has been necessary to practise softening treatments: the meristem cells, free from their pecto-cellulose walls, were properly squashed. In order to obtain microscopic preparations intended to undergo the differential staining treatments, the following procedure is recommended:

1) Seed germination

a) place delinted seeds in a Petri dish, on damp filter paper;

b) place the Petri dish in an autoclave at 30°C during 48 hours.

2) Pre-treatment

a) prepare a monobromonaphthalene solution saturated in distilled water;

b) filter this solution directly into the Petri dish on the seeds, at 30°C during 4 hours;

c) remove the root tips and wash them in several successive baths of 45% acetic acid and distilled water.

3) Fixation

24 hours in a 3-1 acetic-ethanol solution at 4°C.

4) Softening treatment

a) place the root tips in a 45% acetic acid solution at 60°C during 20 minutes;

b) the soft and translucent root tips are then placed in an aqueous enzymatic solution at 0.5% of cellulase and 0.5% of pectinase at pH 4, during 15 minutes at ambient temperature.

5) Squashing treatment

Having been gently rinsed with distilled water, the root tips are squashed in a drop of 45% acetic acid between a slide and a coverglass, thoroughly clean and dry. No adhesive is to be used.

6) Unsticking and drying methods

The slides are placed in a freezer during 15 minutes and the coverglasses are unstuck with a scalpel. They dry in an autoclave at 30°C during one night.

METHODS

I. Techniques of differential staining by Giemsa

Giemsa is the most currently used dye when making bands stand out on plant chromosomes. Staining occurs after different techniques, being the major ones: the technique of "denaturation-renaturation", the technique of denaturation alone and the enzymatic technique.

1) Technique of "denaturation-renaturation"

It is the most currently used. DNA is denatured with barium hydroxide, renatured in a 2 × SSC buffer and stained with Giemsa (FILIGN, 1974; SEAL and BENNETT, 1981; TBOH and HUTCHINSON, 1983).

a) preparation of the Ba (OH)₂ solution: the solution is saturated in water, heated to 80°C with agitation, cooled down to 40°C and filtered;

b) the slides and coverglasses are dipped into this solution during 5 minutes at 50°C;

c) rinsed with distilled water (4 baths of 15 minutes each);

d) dipped into a 2 × SSC buffer at 60°C during 30 minutes (annexes);

e) rinsed with distilled water (4 baths of 15 minutes each);

f) stained with Giemsa during 30 minutes (annexes);

g) dried and mounted in the euparal.

2) Technique of denaturation with concentrated HCl

It was used by JOSHI and RANJERAR in 1980 and requires no high temperature renaturing bath.

a) the slides are dipped into a solution of HCl 10 N at ambient temperature during 5 minutes;

b) rinsed with distilled water (3 baths of 5 minutes each);

c) dried and stained with Giemsa during 30 minutes;

d) mounted in the euparal.

II. Technique of differential staining by acetic orcein

Although relatively unused to obtain banding acetic orcein has made "O" and "C" bands stand out on *Lathyrus* sp. (LAVANIA and SHARMA, 1979) and *Triticales* (SAPRA and STEWART, 1980) respectively.

Preparations are obtained as described above, being the stages 3 and 4 alone modified thus:

3) Fixation

The root tips are placed in a solution of acetic orcein at 4°C during 24 hours (annexes).

4) Softening treatment

a) the root tips are soaked in a solution of HCl-acetic orcein during 3 hours at ambient temperature (annexes);

b) they are placed into acetic orcein during 3 to 4 hours at ambient temperature;

c) before they are squashed, they are dipped in 45% acetic orcein during 20 minutes at 60°C to avoid over-staining and make cell and chromosome dispersion easier.

Stages 5 and 6 are identical.

RESULTS

After the treatment with barium hydroxide followed by renaturation and staining with Giemsa, the chromosomes are comparatively non-contracted and slightly banded at premetaphase. At metaphase, they are more contracted and evenly stained; however, the centromere is not stained (fig. 1).

A similar result is obtained with concentrated HCl, but some bands are visible (fig. 2).

Our experiments show that transferring to cotton methods which are reliable on other plants (with Giemsa) only results

in a comparatively non-reproducible and insufficiently distinct staining. Additional experiments are certainly necessary.

Acetic orcein enabled us to observe two types of results: on the one hand, very contracted chromosomes of which only the telomeres are intensely stained (fig. 3 through 5) and on the other hand, relatively non-contracted chromosomes presenting up to 6 distinct bands (fig. 6 through 8). On such chromosomes, the area corresponding to the centromeres is not stained; consequently, they can be localized.

DISCUSSION

Monobromonaphthalene in solution saturated in water is used by every author, at 4°C during 3 hours, on root tips separated from their seeds. When applied to cotton, this method did not lead to any satisfactory mitotic index in a reproducible way. The low temperature (4°C) and the fact the root tips were cut have perhaps induced a physiological stress that made the mitotic activity slow down or even stop. Apparently, this is confirmed by the excellent result obtained with monobromonaphthalene on delinted seeds at 30°C.

So far, acetic orcein seems to be the most appropriate dye for obtaining banded cotton chromosomes. The procedure proposed has been tested on three cotton species namely, *G. herbaceum* var. *africanum*, *G. arboreum* and *G. thurberii*. It makes very distinct bands stand out along the chromosomes in the three species. Tests should now be multiplied to check the position of the bands on the chromosomes of a same species, pair the chromosomes and establish thus the banded karyotypes of the species which are comparable.

ANNEXES

Giemsa

3 cc manufactured Giemsa in solution;

3 cc Na₂HPO₄ buffer 0.5 M;

3 cc NaH₂PO₄ buffer 0.5 M;

41 cc distilled water.

2 × SSC buffer

0.03 M trisodium citrate (Na₃C₆H₅O₇ · 2 H₂O);

0.3 M sodium chloride (NaCl) in distilled water;

pH is adjusted to 7 with HCl N.

Acetic orcein

3 g synthetic orcein in powder;

45 cc acetic acid;

55 cc distilled water.

HCl-acetic orcein

1 volume of HCl 2 N in 9 volumes of acetic orcein.

RESUMEN

Se intentó obtener una coloración diferencial de los cromosomas del algodónero, tratando primero de adaptar las técnicas ya utilizadas en otras plantas. Los dos métodos de desnaturalización, con el hidróxido de bario (seguido por un tratamiento estabilizador 2 × SSC) o el HCl concentrado, y la coloración con el Giemsa no aportaron resultados

bastante precisos para establecer un cariograma. En cambio, el uso de orceína acética en el fijador y el tratamiento ablandante permitió visualizar cromosomas con bandas diferenciadas. Se da una descripción detallada de los métodos utilizados, la cual debería permitir comparaciones entre las distintas especies de algodónero.