

## Inducción Artificial de Poliploidia Mediante Colchicina en *Vitis vinifera*

por

A. GARGIULO\*)

### Antecedentes y Finalidad

El interés del mejoramiento de la vid mediante la inducción artificial de formas poliploides, comenzó a aumentar cuando se estableció que ciertas variedades cultivadas con éxito, eran tetraploides. Tal es el caso del Muscat Canon Hall cultivada en Inglaterra en invernáculos, que es la forma tetraploide del Moscatel de Alejandría. En 1938 se introdujeron en E. E. U. U. una serie de variedades cultivadas comercialmente en Japón. Debido al tamaño de sus bayas se sospechó de que se trataba de tetraploides. Posteriormente esto se confirmó al determinarse que estas variedades eran las formas tetraploides de Delaware, Niagara, Catawba y Koshu (1).

También según OLMO (1) entre las variedades del Este („Eastern“) la mas ampliamente cultivada en California, la Pierce, ha resultado ser tetraploide. Es este el primer caso en que una variedad de vid tetraploide se comporta exitosamente en amplios cultivos.

Un carácter deseado en las variedades de mesa es el tamaño grande de las bayas. La poliploidía ofrece bajo este aspecto un método promisorio de mejoramiento, pues las formas tetraploides concidas, presentan esta ventajosa característica.

La Barbera D'Asti tetraploide presenta bayas de mayor tamaño que la diploide (2). Lo mismo se observa en la variedad Malbeck (3). DERMEN (4) observó aumento de tamaño en bayas de distintas variedades de muscadíneas (*Vitis rotundifolia*). RIVES y POUGET (5) constataron que el Chasselas Gros Coulard es una mutación tetraploide, que presenta mayor tamaño de grano que la forma diploide.

WAGNER (6) estudiando comparativamente 48 mutantes espontáneos tetraploides con sus correspondientes formas diploides observa en las primeras un aumento de tamaño de las bayas que oscila entre 23 y 63 % con respecto a las segundas.

Conjuntamente con el carácter favorable anteriormente mencionado, aparecen en muchos casos caracteres desfavorables en el autotetraploide, tales como los observados por OLMO (1) de disminución del número de granos por racimo, disminución del peso del racimo y de la longitud del mismo, pero esto no es general pues algunas variedades presentaron casos inversos. La Sauvignon blanc presenta según el mismo autor un promedio en peso por racimo de

\*) Matrícula N° 2373.

107  $\pm$  45 gramos en la forma tetraploide y 85  $\pm$  37 gramos en la diploide es decir que existe una diferencia en favor de la primera de 22  $\pm$  4,50 gramos. La Zinfandel tetraploide dió un promedio de longitud de racimo de 16,5  $\pm$  4,7 centímetros mientras que en la diploide se observó 14,7  $\pm$  1,9 centímetros, la diferencia en favor de primera es pues de 1,8  $\pm$  0,72 centímetros.

De esto se deduce que el efecto producido por la duplicación del número de cromosomas es muy variable según los genotipos de las variedades consideradas, y por este motivo es necesario recurrir al cruzamiento y selección entre variedades tetraploides para combinar los caracteres favorables.

La autofecundación de diferentes variedades tetraploides seguida de selección y posterior cruzamiento entre diferentes líneas autofecundadas durante varias generaciones podría ser un método aconsejable para producir heterosis, ya que la pérdida de vigor producida por autofecundación nos da un indicio de la existencia en forma heterocigota, de genes para vigor que se hallan segregando y que podrían recombinarse en formas más ventajosas.

Sería interesante constatar a este respecto si se confirman en otros tetraploides las observaciones de OLMO (1) en cuanto al mayor efecto depresivo producido por la autofecundación en tetraploides en comparación con las correspondientes formas diploides. La explicación de este hecho podría orientarnos en lo que a métodos de obtención de heterosis se refiere.

Es posible también que la causa de este fenómeno sea que el Muscat Canon Hall no sea un autotetraploide del Moscatel de Alejandría sino de una planta de semilla proveniente de la misma variedad, según el mismo OLMO (1) afirma un poco antes. En este caso no se habrían duplicado los cromosomas del Moscatel de Alejandría sino de otro genotipo diferente, pues en la planta de semilla se habría producido con anterioridad a su formación segregación de caracteres, y quizás también fecundación por polen extraño, de modo que la depresión observada en la descendencia apreciada por el rendimiento en frutos y el crecimiento en diámetro de los troncos, tendría por causa diferencias de constitución genotípica y no la poliploidía solamente.

El pequeño número de plantas observadas (155 plantas de semillas tetraploides y 31 de diploides) puede originar desviaciones que son frecuentes en pequeñas poblaciones.

Los cruzamientos realizados con uvas apirénicas para producir nuevas variedades sin semillas, apreciadas tanto como variedades de mesa como para desecar, en la industria de pasas, presentan la conocida desventaja de que el carácter de apirenia en las variedades obtenidas va unido generalmente al de tamaño pequeño de las bayas. OLMO (7) encontró un elevado coeficiente de correlación entre peso de baya y peso de semilla como así también entre peso de baya y número de semillas.

Estas variedades pueden mejorarse mediante la inducción de la poliploidía.

En el presente trabajo, se hace mención más adelante a uno de estos casos. Se trata de la variedad estenospermocárpica 49 C Cherubini, obtenida por CHERUBINI (8) de un cruzamiento entre Moscatel rosado y Sultanina blanca.

La obtención de triploides podría proporcionar otro método para la obtención de variedades sin semilla. Estos triploides pueden obtenerse cruzando las variedades tetraploides con diploides. OLMO (9) cita un triploide obtenido por cruzamiento de Moscatel de Alejandría x Sultanina gigas y otro proveniente de una planta de semilla de la variedad Quagliano.

En este último caso, un óvulo o un grano de polen no reducido funcionó como gameta diploide.

Utilizando como padres tetraploides a las variedades Sultanina gigas, Lattuario nero 4 n, Sohíbi 4 n y Barbera D'Asti 4 n se han efectuado numerosos cruzamientos desde 1952 con la finalidad antedicha.

El conocido problema de la esterilidad de los híbridos interespecíficos, resuelto en otras especies por la obtención de anfidiploides, abre grandes perspectivas a la poliploidía, — quizás las mayores de este método — en el mejoramiento de la vid. Se entiende que la esterilidad debe ser en estos casos de origen cromosómico, ya sea que las especies posean desigual número de cromosomas o bien que los mismos no poseyendo el grado de homología necesario presenten irregularidades durante el apareamiento sináptico de cigotena y paquitena de la meiosis.

DERMEN (4) incluye en su programa de mejoramiento en Horticultural Crops Research Branch, Agricultural Research Service Beltsville, Maryland U. S. A., la obtención de híbridos fértiles de *Vitis rotundifolia* con *Vitis vinifera* y *Vitis labrusca* mediante el cruzamiento de las formas poliploides de las mismas, ya que sus híbridos diploides son estériles.

LELAKIS (10) hace resaltar también la importancia de la poliploidía en la obtención de híbridos fértiles a partir de diploides estériles y cita como casos de posible aplicación del método el híbrido de Málaga x *Vitis rotundifolia*, de OLMO y PATEL, el N. C., B 4 — 50 (Black Morocco x *Vitis rotundifolia*) y el N. C., B 4 — 52 (Semillón x *Vitis rotundifolia*) de DETJEN. Siendo 38 los cromosomas somáticos de *Vitis vinifera* L. según OLMO (9) confirma, 38 los de *Vitis labrusca* y 40 los de *Vitis rotundifolia*, los híbridos de esta última especie cruzada con cualquiera de las dos primeras, poseen 39 cromosomas somáticos, presentando una esterilidad de origen cromosómico.

La *Vitis rotundifolia* posee como es sabido la máxima resistencia a la filoxera, de donde se deduce la importancia de la poliploidía en estos híbridos. Un nuevo campo se abriría en el problema de los productores directos y aún dentro de los híbridos utilizados como pié.

Actualmente estoy tratando de obtener con el mismo método utilizado para producir tetraploides a partir de diploides, octoploides a partir de tetraploides y exaploides a partir de triploides, para estudiar el efecto de los diferentes grados de poliploidía en *Vitis vinifera* y en híbridos interespecíficos.

### Material y Metodo

Los primeros intentos de obtención de poliploides mediante aplicación de colchicina se realizaron en 1952 juntamente con el Ing. GONZÁLEZ, entonces profesor de genética de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo.

Debido a la baja concentración utilizada de 0,05% no se observó ninguno de los síntomas característicos producidos por el alcaloide, a pesar de haberse tratado un gran número de yemas en el momento de la brotación. El trabajo se abandonó hasta 1954, año en que realicé nuevos intentos, que resultaron exitosos al aumentar la concentración de la colchicina.

Las aplicaciones de colchicina se efectuaron en las yemas en brotación de plantas adultas en todos los métodos descriptos, tratando de eliminar cuando era posible, todos los demás brotes, de manera de concentrar la brotación en los sectores tratados. Se efectuó la aplicación no solamente en el meristema

terminal, sino también en las nuevas yemas en formación. El desarrollo de los brotes en el momento del tratamiento varió desde el momento en que se hincha la yema hasta aquel en que el brote alcanza unos 5 centímetros de longitud.

Debido a la constitución anatómica de las yemas existían dificultades para la penetración de la solución hasta el meristema apical y yemas laterales. Esto se subsanó agregando detergente a la solución. Se utilizó el conocido comercialmente como „Rapidnetzer — spezial“ de la Badische Anilin & Soda-Fabrik.

Las concentraciones de colchicina se aumentaron a 0,5% y 1%.

Los brotes se sumergieron en tubitos de vidrio que se sostenían del sarmiento mediante tela emplástica.

Para evitar la evaporación de la solución contenida en los tubitos, se ensayó también cerrarlos en la parte superior con algodón y cubrir éste con parafina. Presentó este método el inconveniente de que se demoraba mucho tiempo en cada tratamiento.

Otro de los métodos usados consiste en inyectar dentro de la yema la solución, cuando la longitud del brote es de 1 centímetro a 1,5 centímetros.

Presenta la ventaja de la gran rapidéz de los tratamientos, con respecto a los métodos anteriores y no tiene el inconveniente de aquellos de sumerción en cuanto a la muerte del meristema terminal y a veces de todo el brote cuando el tratamiento se prolonga por varias horas. Esto parece ser debido a la obstaculización de las funciones respiratorias y no a la concentración de colchicina, pues con concentraciones del 0,5% se produce también la necrosis a partir del extremo del brote hacia atrás, del mismo modo que con las soluciones más concentradas.

En cuanto a las concentraciones óptimas parecen hallarse entre 0,5% y 1% de colchicina.

El número de tratamientos más apropiado parece ser, uno en el caso de usar solución al 1% y dos tratamientos separados por un intervalo de una semana, cuando la solución es de 0,5%.

Se trabajó con las variedades:

Sohibi, Lattuario nero, Moscatel rosado, Gobernador Benegas y Almería (Ohanes).

En Sohibi se observó el mismo año del tratamiento, aparte de los indicios de tetraploidía en los brotes y hojas, racimos con flores aparentemente tetraploides por su mayor tamaño y forma globosa, completamente distinta al de las sin tratar; estas flores no llegaron a cuajar. Se observaron también hojas con sectores de apariencia tetraploide y sectores diploides.

El tratamiento fué de inmersión durante 24 horas en solución acuosa de colchicina al 1%.

El brote no murió por no hallarse totalmente sumergido y solamente estarlo en un pequeño sector, desde el cual subía la solución y penetraba en las zonas meristemáticas, quizás por tensión superficial.

En 1956 fructificó dando algunos cencerros con granos de mayor tamaño que la forma diploide y menos alargados, con un color rosado mas intenso.

Se trataron 114 yemas en ese año y se constató que aparecen con frecuencia brotes con aspecto de tetraploides, quimeras, deformaciones y demás síntomas característicos producidos por un tratamiento efectivo. A pesar de ello, sólo un brote en el que los síntomas aparecieron también en las flores y en los frutos, el de la variedad Sohibi antes citada, se sometió al exámen

citológico, observándose 76 cromosomas en células somáticas de ápice vegetativo de raíz. Quizás un examen más minucioso hubiese revelado la presencia de otros poliploides. También al forzar mediante una poda adecuada la brotación de yemas ubicadas en la axila de las hojas de aspecto poliploide como DERMEN (4) recomienda, habría contribuido a un mayor éxito de los tratamientos. LELAKIS (10) obtuvo mediante la eliminación de las hojas una brotación anticipada de las yemas ubicadas en las axilas de las mismas.

En 1955 se usaron las siguientes técnicas de aplicación de la colchicina:

**Tratamiento A:** Se utilizó colchicina al 1% en solución de glicerina al 10% en agua, con detergente „Rapidnetzer — spezial“ de la „Badische Anilin & Soda-Fabrik“ al 0,05% para favorecer la penetración de la solución.

En los otros métodos de tratamiento, B y C, se utilizó también la misma solución de colchicina.

Se aplicó en brotes que en general no pasaban de 2 centímetros de longitud, mediante jeringa y aguja de inyecciones, tratando de llegar al ápice vegetativo y a las yemas en formación, separando con ayuda de la aguja las pequeñas hojas que las recubren y tratando de dañar los tejidos lo menos posible.

Se trataron 211 yemas sobre 22 variedades de vinífera un productor directo y 2 híbridos americanos. En una sola variedad de *Vitis vinifera*, la 49 C Cherubini (Moscatel rosado x Sultanina blanca) se corroboró mediante el recuento de cromosomas su estado tetraploide.

**Tratamiento B:** En este tratamiento y en el „C“, el número de brotes por planta varió según el vigor de las mismas, se trató de dejar solamente los brotes sometidos a la acción de la colchicina.

Cuando los brotes tenían de 20 a 30 centímetros de longitud, se cortó la parte apical y se trataron las 3 yemas siguientes a partir del ápice con la solución ya mencionada.

Se repitieron los tratamientos en algunos casos 2 veces y en otros 3 con intervalos que oscilaban desde 1 a 12 días entre los mismos.

Para asegurar la persistencia del líquido sobre la yema, se recubrió a ésta con un trozo de algodón embebido en la solución. Las yemas restantes del brote se eliminaron.

Se trataron 78 yemas sobre 26 brotes pertenecientes a 6 variedades de *Vitis vinifera* sin obtenerse resultados corroborados por el examen citológico.

**Tratamiento C:** Consiste en tratar en brotes de 40 a 80 centímetros de longitud aproximadamente las 3 últimas yemas en formación a partir del corte del ápice, que se efectúa más abajo que en los tratamientos anteriores.

Las yemas anticipadas se eliminan previamente.

Se trataron 195 yemas sobre 65 brotes pertenecientes a un productor directo, una americana y 13 variedades de *Vitis vinifera*.

En este tratamiento se obtuvo el máximo de mutaciones. En Barbera D'Asti, Lattuario nero, Sohíbi y Almería aparecieron algunos brotes con hojas flores y frutos de aspecto tetraploide en su totalidad, sin sectores diploides. En las 2 primeras se observaron 76 cromosomas en sus células somáticas, en Sohíbi no se utilizó el examen citológico, por existir abundante material tetraploide obtenido por el método A. En Almería se observaron células somáticas con 38 cromosomas a pesar de las netas características de tetraploide observadas. Un examen más minucioso permitirá determinar si se trata de una quimera, ya que estas se presentan con frecuencia en otras variedades de vid que se tenían por totalmente poliploides, según EINSET y LAMB (11).

La concentración de colchicina del 1% resulta un poco elevada, ya que en muchos casos se observó que mataba a la yema mas pequeña, es decir la de parte superior del brote, y parece actuar tambien sobre el cambium pues en el entrenudo superior se paraliza frecuentemente el crecimiento en espesor. Por este motivo es aconsejable utilizar soluciones al 0,5% con 10% de glicerina y detergente, tal como DERMEN (4) y LELAKIS (10) preconizan. Como puede observarse, los métodos de tratamientos B y C, no son mas que una variante de el utilizado por los autores arriba mencionados. La diferencia estriba en que en lugar de tratar barbechos colocados en macetas, se trataron plantas adultas vigorosas, con la ventaja en este último caso de poder obtener en el mismo año del tratamiento flores y frutos, en muchas variedades que fructifican facilmente en femielas. Con estos elementos se simplifica enormemente la terea de detectar este tipo de mutaciones, pues las características de las flores, tamaño de los granos de polen y forma de los frutos son lo suficientemente netas como para asegurar que los tejidos internos son poliploides. Otra ventaja la constituye la gran cantidad de puas que pueden obtenerse para injertar y reproducir rapidamente las mutaciones obtenidas. Con esta finalidad se ha utilizado el injerto de hendidura sobre plantas adultas.

En todos los casos se observaron testigos sin tratar desyemados y preparados del mismo modo que los tratados y en el mismo momento.

Las soluciones de colchicina conservadas durante un año aparentemente no perdieron su poder. Una técnica utilizada para apreciar su actividad consiste en colocar cebollas con la parte inferior sumergida en agua y en estufa a unos 26° C. para provocar la emisión de raíces. Cuando estas emergen se substituye el agua por una solución de colchicina al 0,05% y al cabo de 12 horas se fijan y colorean con carmín acético los extremos de las raicillas siguiendo la técnica de HEITZ (12) que permite obtener excelentes preparados con gran rapidéz (alrededor de 5 minutos). Aplicando la misma se observó un 100% de las células en división en el estado característico de la „C — mitosis“ (desaparición del huso acromático, retardo de la separación de los cromosomas en la zona del centromero, etc.).

### **Metodos Utilizados Para Detectar Las Mutaciones Inducidas**

Cuando una yema o un brote en activo crecimiento entrà en contacto con la solución de colchicina, se producen una serie de reacciones y cambios morfológicos, histológicos, citológicos y fisiológicos que nos orientan en la localización de los brotes poliploides.

Se describen a continuación una serie de síntomas de poliploidía, característicos, en el orden en que se observan.

1. Retardo en la brotación: El primer indicio observado de que la colchicina ha actuado en las zonas meristemáticas del ápice vegetativo, es el retardo de la brotación. Este fenómeno puede explicarse como una detención de la división celular en las células en estado de „C — mitosis“. LELAKIS (10) da otra explicación a este fenómeno.

2. Deformaciones foliares, quimeras, tamaño de los estomas, número de cloroplastidos contenidos en los mismos y aspecto del tejido epidérmico: El cono vegetativo de la yema se halla protegido por una serie de escamas y hojuelas en diferentes estados de desarrollo

embriológico; las de la base se hallan en un estado más avanzado que las del ápice, y por este motivo las variaciones morfológicas que experimentan son también diferentes. Las deformaciones de las hojas basales constituyen un síntoma bastante característico. En las hojas superiores se presentan quimeras con superficies variables de zonas diploides y tetraploides (fig. 1). Aparecen también brotes con hojas de aspecto tetraploide en toda su superficie.

En un brote aparecieron hojas divididas simétricamente por la nervadura principal  $L_1$  en dos sectores, uno  $2n$  y el otro  $4n$ , con la siguiente característica: Una hoja presentaba en su lado derecho el sector  $4n$  y en la hoja del nudo siguiente aparecía a la izquierda dicho sector tetraploide. En las demás hojas seguían apareciendo alternativamente los sectores  $2n$  y  $4n$  a ambos lados de la nervadura  $L_1$  que las divide simétricamente.

De esto se deduce que se trataba de una quimera sectorial, que dividía al brote en dos zonas exactamente simétricas, pasando el eje de simetría por las nervaduras principales  $L_1$  de las hojas. Debido a que los pámpanos presentan una filotoxia de  $\frac{1}{2}$  correspondía una vez al lado izquierdo y otra vez al derecho la zona tetraploide.

Las quimeras periclinales se presentan en hojas de apariencia tetraploide con epidermis diploide. Esta última característica puede detectarse por el tamaño de los estomas, mayores en los tetraploides como lo hacen DERMEN (4) y LELAKIS (10), por el exámen citológico de ápices vegetativos, método seguido por EINSET y LAMB (11), por la marcada sinuosidad de las membranas celulares de los tejidos epidérmicos  $4n$ , como también establece LELAKIS (10) y por el número de cloroplastidos presentes en los estomas, método utilizado por RIVES y POUGET (5).

Estos autores utilizan la siguiente técnica para hacer mas visibles a los cloroplastidos (reacción de MOLISCH): „Fragmentos de epidermis son sumergidos en una solución de nitrato de plata ( $AgNO_3$ ) al 1% durante 2 ó 3 minutos. El nitrato de plata se reduce a nivel de los cloroplastidos y precipitando la plata sobre ellos, en forma selectiva, los colorea de negro“. Los estomas de tejidos tetraploides presentan mayor número de cloroplastidos que los de tejidos diploides.

3. Morfología foliar: Las hojas tetraploides presentan un color verde mas oscuro, mayor espesor y consistencia, nervaduras de mayor grosor, dientes del limbo mas obtusos y el seno peciolar en U. En casos en que esta forma de

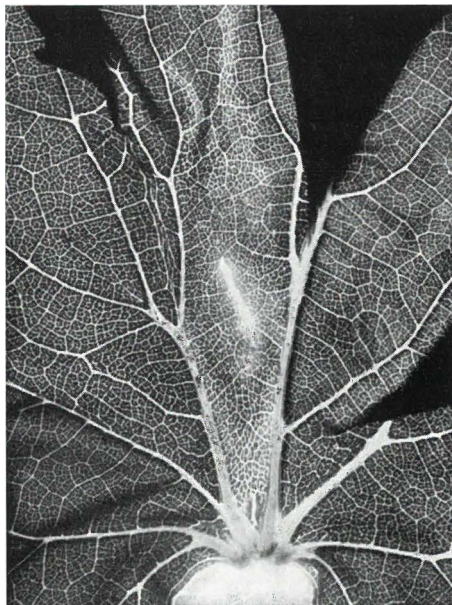


Fig. 1: Quimera. Zona deploide en el centro rodeada de tejidos tetraploides

seno peciolar no se manifiesta claramente, existe sin embargo una tendencia mayor a la misma que en las correspondientes formas diploides. En todos los casos se observa una mayor curvatura de la nervadura  $L_4$  en las formas tetraploides que provoca esta tendencia a la forma de U.

En algunas variedades las hojas tetraploides presentan un aspecto ondulado, por ejemplo en la 49 C. Cherubini 4 n y en la Almería 4 n.

4. Tamaño y forma de flores, granos de polen y frutos: Este es, después del recuento de cromosomas, el indicio más seguro de poliploidía en tejidos internos. Solamente se realizó el exámen citológico en los brotes en que aparecían flores y frutos de aspecto tetraploide.

Sin embargo, según DERMEN (4) pueden originarse órganos de fructificación a partir de tejidos superficiales, y si estos son diploides aquellos lógicamente también lo serán.

Las inflorescencias y flores tetraploides son de mayor tamaño que las diploides.

Los estambres curvados hacia abajo, carácter ligado a polen estéril, aparecieron en las variedades 49 C. Cherubini y Almería en las formas 2 n y 4 n.

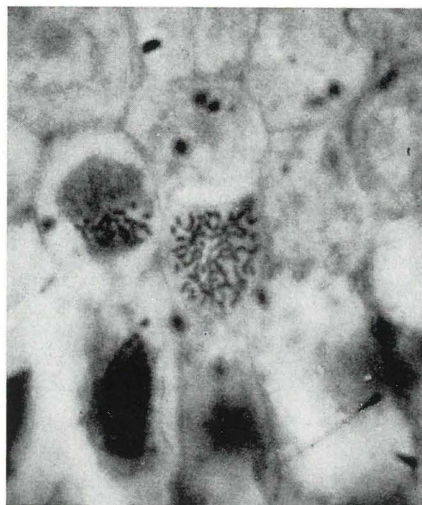


Fig. 2: Metafase de células somáticas de Lattuario nero 4 n (76 cromosomas)

Los granos de polen de los tetraploides son de mayor tamaño que los de los diploides.

Las bayas, de mayor tamaño en las formas 4 n, presentan también cambios morfológicos; así las de Lattuario nero 2 n que son fusiformes, aparecen en estado tetraploide con una forma obovoide (fig. 2)

5. Exámen citológico: El recuento de cromosomas se realizó en extremos de raicillas. Estas se obtuvieron en algunos casos de estacas colocadas en arena húmeda y en otros de las que emitían las puas injertadas y tapadas con tierra. Las raíces se fijaron en Craf (solución A: 93 p. ácido crómico 1% y 7 p. ácido acético gl. solución B: 30 p. formol 40% y 70 p. agua destilada) ambas soluciones se mezclaron en partes iguales en el momento de usarlas.

Se utilizó como colorante cristal violeta y como mordiente ácido crómico.

En los sucesivos pasos de deshidratación, clarificación, imbibición, inclusión en parafina, cortes con micrótopo, disolución de la parafina e hidratación, blanqueo, mordiente, coloración, deshidratación, diferenciación, clarificación y montaje, se siguió la técnica aconsejada por SAURA (13) con una variante que consiste en hacer un nuevo pasaje en ácido crómico de 10 minutos después del cristal violeta, para evitar un exceso de decoloración de los cromosomas al hacer el pasaje por iodo-iodurado. Los cortes con micrótopo se realizaron de un espesor de 10 a 15 micrones.



### Resumen

Se enumeran las ventajas de la poliploidía en vid como método de mejoramiento al producir un aumento de tamaño de bayas en las variedades de mesa y en las apirénicas utilizadas también en la industria de pasas.

Se sugiere la obtención de triploides por cruzamiento de diploides con tetraploides como nuevo método en vid de obtención de variedades apirénicas.

Se destaca la importancia del método en la obtención de híbridos fértiles a partir de estériles cuando la esterilidad es debida a causas cromosómicas.

Se está intentando obtener octoploides a partir de tetraploides y exaploides a partir de triploides para estudiar el efecto de los distintos grados de poliploidía en diferentes especies del género *Vitis* y en híbridos interespecíficos.

Se describen las técnicas utilizadas para inducir poliploidía y el modo de detectar las mutaciones producidas.

### Bibliografía

1. OLMO, H. P.: Breeding tetraploid grapes. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. **59**, 285—290 (1952).
2. GARGIULO, A.: Mutación espontánea tetraploide en Barbera D'Asti. *Vitis* **1**, 156—158 (1957).
3. ZULOAGA, P. A. y A. GARGIULO: Poliploidía en *Vitis vinifera* L. Rev. Fac. Cienc. Agrarias U. N. C. **4**, 1—13 (1954)
4. DERMEN, H.: Colchicoidy in Grapes. J. Heredity. **45**, 159—172 (1954).
5. RIVES, M. et R. POUGET: Le Chasselas Gros Coulard. Mutant tetraploide. *Vitis* **2**, 1—7 (1959).
6. WAGNER, E.: Über spontane tetraploide Mutanten von *Vitis vinifera* L. *Vitis* **1**, 197—217 (1958).
7. OLMO, H. P.: Correlations between seed and berry development in some seeded varieties of *Vitis vinifera*. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. **48**, 291—297 (1946).
8. CHERUBINI, C.: Obtención de variedades de vid sin semillas mediante la hibridación. Rev. Fac. Cienc. Agraris **1**: N<sup>o</sup> 1,35 (Nota científica).
9. OLMO, H. P.: Chromosome numbers in the European grape (*Vitis vinifera*). Cytology (Tokio), 603—613 (1937).
10. LELAKIS, P.: Induction de la Polyplodie chez *Vitis vinifera* L. par application de la colchicine. Ann. L'Ecole Nat. D'Agriculture de Montpellier **30**, 3—97 (1957).
11. EINSET, J. and B. LAMB: Chimeral sports of grapes. Alleged tetraploid varieties have diploid „skin“. J. Heredity **42**, 158—162 (1951).
12. HEITZ, E.: Die Nucleal — Quetschmethode. Ber. dt. bot. Ges. **53**, 870—8 (1935).
13. SAURA, F.: Técnicas usuales para observar cromosomas. Fac. Agron. y Vet. Univ. Buenos Aires. Bol. N<sup>o</sup> 27 (1949).

ingegangen am 28. 4. 1960