

Rev. FCA UNCuyo. Tomo 42. N° 2. Año 2010. 143-159.

Micropropagación de portainjertos de vid de interés para la provincia de Misiones ¹

Micropropagation of grape rootstocks of interest for Misiones province

Diego R. Guerrero ²

Luis A. Mroginski ³

Mario A. Krivenky ⁴

Martín C. Domínguez ⁵

Originales: Recepción: 27/05/2009 - Aceptación: 21/10/2009

RESUMEN

Con el objeto de micropropagar portainjertos de vid de interés para la provincia de Misiones (Paulsen 1103 y Vr 04343) se cultivaron segmentos nodales y ápices meristemáticos. Para el establecimiento de segmentos nodales se evaluaron diferentes concentraciones del medio propuesto por Murashige y Skoog (MS) $^{-1/4}$, $1/2$, 1- adicionando diferentes concentraciones de benciladenina (0; 1; 3 y 5 mg.L⁻¹) y ácido naftalenacético (0 y 0,01 mg.L⁻¹). Se evaluaron estado fisiológico y topófitis de yemas. En fase de multiplicación se evaluaron ápices, segmentos uni y binodales con o sin hoja desplegada. Para el establecimiento de ápices se evaluó el medio MS $1/2$ suplementado con bencilaminopurina (0; 0,5; 1; 2 mg.L⁻¹). Los mejores resultados para el establecimiento de segmentos nodales se obtuvieron con yema despierta en medio MS $1/4$ sin adición de reguladores. La multiplicación de los mismos puede realizarse partiendo de un explanto uni o binodal con o sin hoja. Al

ABSTRACT

In order to develop a micropropagation system for different grape rootstock of interest for Misiones Province (Paulsen 1103 and Vr 04343), nodal segments and root tips were cultured. Different concentrations of the medium proposed by Murashige and Skoog (MS) $^{-1/4}$, $1/2$, 1- adding different concentrations of benzyladenine (0; 1; 3 and 5 mg.L⁻¹) and naphthylacetic acid (0 and 0.01 mg.L⁻¹) were evaluated for the establishment of nodal segments. Topofisis and physiological state of the buds were also evaluated. Shoot tips and one-node and two-node segments with or without leave were evaluated in the multiplication stage. For the establishment of shoot tips the medium MS $1/2$ supplemented with benzylaminopurine (0; 0.5; 1; 2 mg.L⁻¹) was evaluated. The best results for establishment phase of nodal segments with the bud were obtained with the medium MS $1/4$ without regulator's addition. Multiplication phase can start from an one or two-node

1 Trabajo subsidiado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

2 Becario de postgrado de INTA, alumno de la Maestría en Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Sargento Cabral 2131. Campus Sargento Cabral. (3400) Corrientes. Argentina. diegog@cerro.inta.gov.ar

3 Profesor de la Cát. de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Investigador Principal de CONICET.

4 Técnico Investigador. Área Vitrocultivo. Estación Experimental Agropecuaria INTA Cerro Azul. C. C. 6. Ruta Nacional 14 km 836. (3313) Cerro Azul. Misiones. Argentina.

5 Técnico Investigador. Área Molecular. EEA INTA Cerro Azul.

utilizar ápices como explanto, se debe adicionar al medio MS $\frac{1}{2}$ bencilaminopurina en una concentración de 0,5 mg.L⁻¹. En la aclimatación de las plantas, se obtuvieron valores de supervivencia de 80 a 90%.

explant with or without leaf. When using shoot tips as explant, the medium MS $\frac{1}{2}$ should be added with benzyladenine at 0.5 mg.L⁻¹. In acclimated plants, we obtained survival values between 80 and 90%.

Palabras clave

explanto • medio de cultivo • multiplicación • topófisis

Keywords

explant • culture media • multiplication • topofisis

INTRODUCCIÓN

En la provincia de Misiones se ha generado la necesidad de diversificar la producción agrícola basada fundamentalmente en los cultivos de yerba mate, té y tabaco. Una de las alternativas que ha surgido es la producción de frutales tales como la vid, el manzano, el duraznero y el ciruelo.

Las variedades de vid mayormente cultivadas en la provincia de Misiones son Niágara Rosada (*V. labrusca*) y Venus (*Vitis labrusca* x *V. vinifera*). Estas variedades son injertadas sobre el pie Paulsen 1103 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*) o Vr 04343 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*). Ambos portainjertos poseen una moderada resistencia a la cochinilla del suelo *Eurhizococcus brasiliensis* (12). Esta cochinilla conocida como Margarodes habita frecuentemente en los suelos de la provincia de Misiones. No existen investigaciones publicadas sobre el grado de daño que provoca este insecto ya que los cultivos de vid en la provincia son recientes, pero se lo considera una de las principales plagas que afectan el sistema radical.

Este insecto se encuentra principalmente en el sur de Brasil, en donde es considerado la principal plaga de la vid, siendo responsable de grandes pérdidas productivas (7, 13, 24).

El Margarodes no tiene un control químico efectivo. Una alternativa para evitar los daños es la utilización de portainjertos resistentes o tolerantes como el 39-16, Vr 04343 (8) y Paulsen 1103, conjuntamente con prácticas culturales para minimizar el problema e impedir su diseminación (control de hormigas, eliminación de hospederos alternativos).

La propagación comercial de portainjertos de vid es efectuada generalmente por vía vegetativa. El método más utilizado para su obtención es el de enraizamiento de estacas. Esta técnica no ha cambiado durante siglos, ya que es económica y eficiente, pero posee una desventaja, la cual no permite una rápida multiplicación. Esta multiplicación es lenta y altamente dependiente de la época del año. Un método eficiente es la propagación *in vitro*. Existen numerosos trabajos publicados que describen esta técnica en vid.

Biasi *et al.* (2), quienes realizaron comparaciones entre pies de injertos de vid obtenidos por micropropagación y propagación convencional, encontraron que aquellos provenientes de micropropagación en su primer año no presentaban el diámetro

necesario para ser injertados. Posteriormente Biasi *et al.* (3, 4) utilizaron ápices y segmentos uninodales para sus experimentos, informando la influencia de diferentes medios basales de cultivo, presencia de hojas en el explanto multiplicado y efecto de la topóffisis.

Hartl y Males (11) trabajaron con cultivares Vugava y Plavac mali, y diferentes concentraciones de benciladenina (BA) y ácido indol-3-acético (AIA): concluyeron que comercialmente el protocolo de micropropagación está fuertemente limitado por el crecimiento inconstante de los vástagos. Otros trabajos realizados -como el de Silva *et al.* (23)- afirman que la micropropagación de portainjertos de vid (Paulsen 1103, Gravesac y Vr 04343) puede ser realizada a partir de yemas axilares en el medio basal propuesto por Silva y Doazan -DSD1- (22).

Otros investigadores como Borghezán *et al.* (5) realizaron estudios sobre la densidad de estomas de plantas *in vitro*, las cuales fueron comparables con plantas *ex vitro*, indicando que no es un parámetro limitante para la fase de aclimatación; esta fase realizada en cajas de plástico cubiertas con vidrio (formando una atmósfera saturada) aumentó el porcentaje de plantas vivas. Utilizando el medio basal MS ½ (18) en forma líquida y semisólida, Guiñazú *et al.* (10) micropropagaron ápices meristemáticos y segmentos uninodales de variedades criollas. En trabajos locales, Stolar (25), micropropagando las variedades Ora y Niágara, registró formación de callos en la base de los segmentos uninodales (utilizados como explantos) en la fase de establecimiento y multiplicación.

Bernd *et al.* (1) concluyeron que la micropropagación *in vitro* de híbridos (*Vitis labrusca* x *V. rotundifolia*) debe ser realizada, en un primer período en el medio basal Galzy, para inducir brotes, realizando subcultivos cada 30 días, intercalando con el medio basal MS y adicionando ácido naftalenacético (ANA) para mejorar el enraizamiento. Machado *et al.* (15), sin embargo, multiplicaron las microestacas en el medio basal propuesto por Quorin y Lepoivre -QL- (21) con adición de bencilaminopurina (BAP) para promover la brotación de las yemas axilares de los segmentos uninodales.

Objetivo

Desarrollar procedimientos que permitan la micropropagación a partir de segmentos nodales y ápices de plantas de vid resistentes a Margarodes, utilizadas como portainjertos en la provincia de Misiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas madre utilizadas pertenecientes a los portainjertos Paulsen 1103 (*Vitis berlandieri* x *V. rupestris*) y Vr 04343 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) se encontraban en macetas de polietileno (28 cm de alto x 12 cm de diámetro) conteniendo una relación de 4/1 de tierra colorada y arena, en un invernadero situado en la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Cerro Azul. Estas

plantas fueron fertilizadas cada 45 días con Nitrofosca (10-2-6) y Kemifosfito (0-20-30) y se hallaban en óptimas condiciones sanitarias, debido a que fueron semanalmente pulverizadas con Captan, Carabendacin, Mancozeb y Sulfato de estreptomycin. El riego de las mismas siempre se realizó sobre el suelo teniendo precaución de no mojar el follaje. Las ramas dadoras de explantos comenzaron a cortarse a partir de la sexta semana de haber comenzado el tratamiento sanitario.

Los explantos que se cultivaron *in vitro* fueron segmentos uninodales (porción de tallo de 1 cm de longitud con una yema axilar, extraído de ramas apicales del año, contemplando hasta la yema N° 4 contado desde el meristema apical) y ápices meristemáticos.

El medio de cultivo utilizado en los experimentos estuvo compuesto por el medio basal propuesto por Murashige y Skoog (18) -MS- suplementado con 30 g.L⁻¹ de sacarosa. Para la gelificación de los medios de cultivos se utilizó Agar Britania® (código B011406) al 0,6%. En los experimentos relacionados con el establecimiento o iniciación de los explantos se emplearon tubos de vidrio (11,5 cm de alto x 2,5 cm de diámetro) conteniendo 10 cc de medio de cultivo. Los tubos con los explantos fueron obturados con Resinite® e incubados en un cuarto climatizado, a una temperatura de 25°C ± 2, fotoperíodo de 16 horas de luz y una intensidad lumínica de 40 µE m⁻² s⁻¹.

Los explantos fueron desinfectados mediante inmersión en etanol al 70% durante 20 segundos, seguido de inmersión en NaOCl al 28% (durante 10 minutos) y finalmente lavados, tres veces con agua destilada estéril.

Etapas de establecimiento

Se realizaron los siguientes experimentos para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de medio basal (MS) (18), distintos reguladores de crecimiento, nivel de dormición de las yemas y la ubicación del segmento nodal en la planta madre, sobre la brotación del explanto.

Para el primer experimento se empleó el medio de cultivo MS en diferentes concentraciones, suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (BAP -bencilaminopurina- y ANA -ácido naftalenacético-) (tabla 1, pág. 147).

A los 35 días del cultivo se evaluaron las siguientes variables: número de segmentos uninodales contaminados, número de segmentos uninodales oxidados, porcentaje de segmentos uninodales con formación de callos, número de segmentos uninodales con regeneración de vástagos y/o yemas (y en este caso, número de vástagos y/o yemas por segmento uninodal), porcentaje de segmentos uninodales con raíces adventicias.

Para el segundo experimento se consideraron los datos obtenidos en el ensayo anterior: se empleó la misma metodología de desinfección e incubación, utilizando como medio de cultivo MS ¼ (18) sin adición de reguladores de crecimiento. Se utilizaron dos tipos de yemas: yema dormida (fecha de cultivo: 01 de junio) y yema

despierta (fecha de cultivo: 11 de septiembre). Las evaluaciones se realizaron a los 35 días de cultivo, momento en el cual se registraron los siguientes indicadores: número de segmentos uninodales contaminados, número de segmentos uninodales con regeneración de vástagos y/o yemas (y en este caso número de vástagos y/o yemas por segmento uninodal), número de hojas por vástago.

Tabla 1. Tratamientos evaluados en la fase de establecimiento *in vitro* de los portainjertos Paulsen 1103 y Vr 04343 utilizando como medio basal Murashige y Skoog (18).

Table 1. Treatments evaluated in the *in vitro* establishment phase of rootstocks Paulsen 1103 and Vr 04343 using as basal medium Murashige and Skoog (18).

Tratamientos	MS	BAP mg.L ⁻¹	ANA mg.L ⁻¹
1	1	0	0
2	½	0	0
3	¼	0	0
4	1	1	0
5	1	3	0
6	1	5	0
7	½	1	0
8	½	3	0
9	½	5	0
10	¼	1	0
11	¼	3	0
12	¼	5	0
13	1	1	0,01
14	1	3	0,01
15	1	5	0,01
16	½	1	0,01
17	½	3	0,01
18	½	5	0,01
19	¼	1	0,01
20	¼	3	0,01
21	¼	5	0,01

Para el desarrollo del tercer experimento se utilizaron ramas de las plantas madre diferenciando la ubicación de los tres segmentos uninodales por debajo del ápice, nombrando como yema 1 a aquella que se encontraba de forma inmediata al ápice. El medio de cultivo utilizado fue MS ¼ sin adición de reguladores de crecimiento. Las evaluaciones fueron realizadas a las cuatro semanas de cultivo y fueron registradas las siguientes variables: número de segmentos uninodales contaminados, número de segmentos uninodales con regeneración de vástagos y/o yemas (y en este caso número de vástagos y/o yemas por segmento uninodal), número de hojas por vástago.

Etapa de multiplicación

Con el objeto de inducir la fase de multiplicación, los vástagos y/o yemas regenerados *in vitro* fueron subcultivados en frascos de vidrio (10 cm de alto x 7 cm de diámetro) conteniendo 50 cc de medio de cultivo MS ¼, sin adición de reguladores de crecimiento.

Se cultivaron ápices, segmentos nodales con 1 y 2 nudos con y sin hoja desplegada, previamente establecidos conformando los siguientes tratamientos. 1) segmento uninodal con un nudo sin hoja, 2) segmento nodal con dos nudos sin hoja, 3) ápice sin hoja, 4) ápice con una hoja, 5) segmento nodal con un nudo y una hoja, 6) segmento nodal con dos nudos y una hoja. Una vez transcurrido un período de 35 días, se evaluaron las siguientes variables: número de segmentos nodales con regeneración de vástagos y/o yemas (y en este caso número de vástagos y/o yemas por segmento nodal), porcentaje de cultivos contaminados, número de hojas del vástago resultante.

En esta etapa también se cultivaron ápices meristemáticos de 2 mm; con este explanto se utilizó el medio MS $\frac{1}{2}$, suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹ y adicionados con distintas concentraciones de bencilaminopurina BAP (0; 0,5; 1 y 2 mg.L⁻¹). En todos los casos se utilizaron medios semisólidos (solidificados con agar Britania® 0,6%). Una vez transcurridos 40 días se procedió a la toma de datos de las siguientes variables: número de ápices meristemáticos con regeneración de vástagos, número de hojas regeneradas por vástago, explantos que alcanzaron a duplicar su tamaño.

Etapa de enraizamiento

La etapa de enraizamiento de los vástagos se realizó en las mismas condiciones (medio de cultivo e incubación) que la etapa de multiplicación.

Etapa de aclimatación

Esta etapa fue iniciada en la cámara de cría, en la cual se realizaron cuatro perforaciones semanales en el Resinite® que cubría los frascos, durante dos semanas; esto permitió un mayor intercambio gaseoso (vitroplanta-ambiente); luego las plantas fueron retiradas de los frascos, lavadas y podadas sus raíces, para extraer todo resto de medio de cultivo que pudiera existir. Una vez terminado este proceso se llevaron a un invernáculo. Las vitroplantas provenientes de los frascos con aproximadamente 5 cm de altura fueron plantadas en bandejas de plástico de 40 celdas, el sustrato utilizado fue cáscara de pino compostada, conteniendo un fertilizante de liberación lenta -Osmocote Plus- (5 a 6 meses). En esta etapa se estudió la supervivencia de los portainjertos en la fase de aclimatación, para lo cual se utilizaron 100 plantas (50 de cada portainjerto) con el objeto de comparar, entre ellos, el porcentaje de plantas aclimatadas después de un período de treinta días.

Para todos los ensayos se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con un mínimo de tres repeticiones por tratamiento. Los dos primeros ensayos se resolvieron utilizando un arreglo factorial. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente un test de comparación múltiple de medias Duncan y LSD de Fisher, con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Etapa de establecimiento

Los organismos contaminantes (bacterias y hongos) comenzaron a observarse a partir del quinto día de establecimiento. A los 35 días, el porcentaje de explantos

establecidos en el portainjerto Paulsen 1103 fue 50,8%, y los valores parciales se encontraron entre 26,7 y 66,7%. Para el portainjerto Vr 04343 se observó 57,9% de explantos establecidos, y los valores parciales en este pie variaron entre 30 y 76,7% en los diferentes tratamientos (tabla 2).

Tabla 2. Cultivos contaminados, oxidados y establecidos, expresados en porcentaje para el portainjerto Paulsen 1103 y Vr 04343 utilizando el medio basal propuesto por Murashige y Skoog (18).

Table 2. Plants contaminated, oxidized and established for Paulsen 1103 and Vr 04343 rootstock expressed as percentage, using the basal medium proposed by Murashige and Skoog (18).

Trat.	MS	BAP mg.L ⁻¹	ANA mg.L ⁻¹	Paulsen 1103			Vr 04343		
				% Cont.	% Oxid.	% Estab.	% Cont.	% Oxid.	% Estab.
1	1	0	0	36,7	0	63,3	30	0	70
2	½	0	0	60	0	40	36,7	0	63,3
3	¼	0	0	50	0	50	33,3	0	66,7
4	1	1	0	66,7	0	33,3	33,3	3,3	63,3
5	1	3	0	46,7	0	53,3	30	6,7	63,3
6	1	5	0	43,3	0	56,7	40	0	60
7	½	1	0	43,3	0	56,7	30	0	70
8	½	3	0	50	0	50	23,3	0	76,7
9	½	5	0	56,7	0	43,3	56,7	0	43,3
10	¼	1	0	40	0	60	36,7	0	63,3
11	¼	3	0	53,3	0	46,7	56,7	13,3	30
12	¼	5	0	53,3	0	46,7	63,3	0	36,7
13	1	1	0,01	43,3	0	56,7	40	0	60
14	1	3	0,01	43,3	0	56,7	23,3	6,7	70
15	1	5	0,01	33,3	0	66,7	36,7	0	63,3
16	½	1	0,01	36,7	0	63,3	43,3	0	56,7
17	½	3	0,01	56,7	16,7	26,7	40	0	60
18	½	5	0,01	36,7	0	63,3	30	0	70
19	¼	1	0,01	53,3	0	46,7	46,7	23,3	30
20	¼	3	0,01	46,7	13,3	40	56,7	3,3	40
21	¼	5	0,01	53,3	0	46,7	40	0	60
Porcentajes totales				47,8	1,4	50,8	39,4	2,7	57,9

Estos resultados muestran que el porcentaje de establecimiento fue menor que el informado por Silva *et al.* (23) quienes utilizaron tres portainjertos y obtuvieron un total de 65% de explantos vivos, mostrando los mejores resultados con el pie Paulsen 1103 (73%), Gravesac (69%) y Vr 04343 (53%). En cambio, Borghezán *et al.* (5) registraron menores porcentajes que los informados en este trabajo: obtuvieron 42% de explantos establecidos mostrando valores para 6 portainjertos (Vr 3916, R110 y SO₄ 50%, Kober 5BB 40%, Paulsen 1103 35%, Vr 04343 25%).

Biasi *et al.* (4), trabajando con el portainjerto de vid Jales, registraron una pérdida por contaminación de 7,1%. Este porcentaje puede ser considerado bajo comparado

con los datos registrados en este experimento, donde el portainjerto Paulsen 1103 registró un porcentaje de contaminación total de 47,8%; en cambio, el portainjerto Vr 04343 fue de 39,4%. En la mayoría de los casos la contaminación de los cultivos se debió a hongos y en menor medida a bacterias.

La tabla 2 (pág. 149) muestra baja oxidación existente en esta fase de establecimiento (1,4% para el pie Paulsen 1103 y 2,7% para el pie Vr 04343). El mayor número de explantos oxidados se encuentra en los tratamientos 17, 19 y 20. Estos tratamientos contienen como medio basal MS al $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$ y concentraciones de 1 y 3 mg.L⁻¹ de BAP (bencilaminopurina). Estos valores de oxidación son menores a los informados por Biasi *et al.* (4) para la variedad Jales.

En la tabla 3 (pág. 151) se observa que en la variedad Paulsen 1103, para la variable número de nudos (los valores oscilaron entre 0,33 y 1,07 por vástago), no se encontraron diferencias significativas al nivel del 5% entre los tratamientos; éstas fueron encontradas para la variable presencia de raíces, donde los tratamientos MS $\frac{1}{2}$ y MS $\frac{1}{4}$ sin reguladores de crecimiento posibilitaron la formación de raíces en 6,7 y 10% de los vástagos, respectivamente. La formación de callos se puede observar a partir del tratamiento 6 hasta el 21. El tratamiento 16 presentó el mayor porcentaje de formación de callos, difiriendo estadísticamente con los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5 en los cuales no se encontró presencia de callos.

El mayor número de hojas se observó en el tratamiento 13 encontrando diferencias significativas al nivel del 5% con los demás tratamientos, exceptuando el tratamiento 16.

Los resultados obtenidos con el portainjerto Vr 04343 mostraron que la formación de raíces se comportó de igual forma que para el portainjerto anterior. Únicamente hubo formación de raíces en los tratamientos 2 y 3. La formación de callos en la base del explanto comenzó a manifestarse a partir de la adición de BAP como regulador de crecimiento (tratamiento 4), encontrándose para esta variable hasta un 70%, (tratamientos 7, 8, 14). Las variables número de nudos y hojas también presentaron diferencias entre tratamientos. Para la primera (número de nudos), los mayores valores se observaron en los tratamientos 4 y 7; no se encontraron diferencias significativas entre ellos ni difirieron con los tratamientos 5, 13 y 14. Para la segunda variable (número de hojas), los mayores valores se encontraron en los tratamientos 13, 4, 3 y 2: éstos presentaron diferencias significativas con los restantes tratamientos, excepto los tratamientos 2 y 3 que fueron similares al 7.

Biasi *et al.* (3) obtuvieron resultados similares para la variable porcentaje de formación de callos. Dichos autores, trabajando con portainjertos de vid Jales y Campinas, observaron un 100% de formación de callos en la base de los segmentos cuando se utilizaron concentraciones de 2,27 mg.L⁻¹ de BAP. La misma tendencia fue observada en trabajos locales por Stolar (25) trabajando con las variedades Ora y Niágara. La presencia de vástagos y raíces en el medio basal DSD1 -medio basal propuesto por Silva y Doazan (22)- y NN -medio basal propuesto por Nitsch y Nitsch (19)- sin la

adición de reguladores de crecimiento, fue informada por varios autores (3, 5, 15, 23); utilizando el portainjerto Vr 04343 en diferentes medios basales (MS, NN, WPM -medio basal propuesto por Lloyd y McCown 14-, QL, C2D -medio propuesto por Chee y Pool -6-) obtuvieron porcentajes de enraizamientos que variaron entre 35 a 60%.

Tabla 3. Efecto de diferentes concentraciones del medio basal propuesto por Murashige y Skoog (18) y diferentes dosis de reguladores de crecimiento sobre el N° de hojas, nudos, callos y raíces en vástagos de Paulsen 1103 y Vr 04343 regenerados durante la fase de establecimiento.

Table 3. Effect of different concentrations of the basal medium proposed by Murashige and Skoog (18) and different doses of growth regulators on the number of leaf, nodes, callus and roots in stems of Paulsen 1103 and Vr 04343 regenerated during the establishment phase.

Trat.	MS	BAP mg.L ⁻¹	ANA mg.L ⁻¹	Paulsen 1103				Vr 04343			
				N° hojas	N° nudos	Formac. de callos %	Pres. de raíces %	N° hojas	N° nudos	Formac. de callos %	Pres. de raíces %
1	1	0	0	1,5 bcde	1	0 c	0 b	1,19 d	1 bcd	0 c	0 b
2	½	0	0	1,13 chef	0,67	0 c	6,7 a	4,05 ab	1,08 bc	0 c	9 a
3	¼	0	0	2,04 bc	1	0 c	10 a	4,05 ab	1,08 bc	0 c	10 a
4	1	1	0	2,12 bc	1	0 c	0 b	4,52 a	1,83 a	63,3 a	0 b
5	1	3	0	1,72 bcd	1,07	0 c	0 b	0,89 d	1,22 abc	63,3 a	0 b
6	1	5	0	1 chef	1	53,3 a	0 b	0,33 d	1 bcd	46,7ab	0 b
7	½	1	0	1,55 bcde	0,67	23,3 ab	0 b	3,11 bc	1,8 a	70 a	0 b
8	½	3	0	1,22 chef	1	13,3 ab	0 b	1,83 cd	1 bcd	70 a	0 b
9	½	5	0	0,33 ef	0,33	46,7 a	0 b	0,67 d	0,67 cd	23,3 ab	0 b
10	¼	1	0	1,64 bcde	1	30 ab	0 b	1,44 d	1 bcd	46,7 ab	0 b
11	¼	3	0	1,5 bcde	1	50 a	0 b	0,5 d	0,33 d	13,3 b	0 b
12	¼	5	0	0,67 def	0,67	46,7 a	0 b	0,33 d	0,33 d	0 c	0 b
13	1	1	0,01	3,35 a	1	40 ab	0 b	4,93 a	1,58 ab	63,3 a	0 b
14	1	3	0,01	1,74 bcd	1	56,7 a	0 b	1,78 cd	1,33 abc	70 a	0 b
15	1	5	0,01	0,8 chef	0,67	56,7 a	0 b	1,58 d	1 bcd	60 ab	0 b
16	½	1	0,01	2,57 ab	1	66,7 a	0 b	1,75 cd	1 bcd	43,3 ab	0 b
17	½	3	0,01	0 f	0,33	40 ab	0 b	1 d	1 bcd	56,7 ab	0 b
18	½	5	0,01	1 cdef	1	26,7 ab	0 b	1 d	1 bcd	36,7 ab	0 b
19	¼	1	0,01	1,73 bcd	1	50 a	0 b	0,73 d	0,33 d	26,7 ab	0 b
20	¼	3	0,01	0,83 cdef	0,67	40 ab	0 b	1 d	0,67 cd	40 ab	0 b
21	¼	5	0,01	0,33 ef	0,33	46,7 ab	0 b	1,33 d	1 bcd	50 ab	0 b

Medias con letras desiguales en las columnas difieren para p < 0,05 de acuerdo con Duncan.

El medio basal seleccionado para ambos portainjertos en esta fase fue el que contenía MS ¼ (tratamiento 3), porque se observó una planta con una estructura morfológica completa (tallos, nudos, hojas y raíces) -comparando con los tratamientos que arrojaron mayores valores para las variables-; no presentó formación de callos en la base de los explantos. Asimismo, al no adicionarse reguladores de crecimiento y disminuyendo el contenido del MS, su costo de producción es menor.

Las tablas 4 y 5 muestran las diferencias entre dos condiciones fisiológicas de la yema vegetativa, dormida (junio) y despierta (septiembre), para dos portainjertos de vid (Paulsen 1103 y Vr 04343).

Tabla 4. Efecto del tipo de yema sobre el número de hojas y nudos de vástagos de Paulsen 1103 regenerados *in vitro* utilizando como medio basal el propuesto por Murashige y Skoog (18).

Table 4. Effect of bud type on the number of leaves and nodes of Paulsen 1103 shoots regenerated *in vitro* using the basal medium proposed by Murashige and Skoog (18).

Tratamientos	N° nudos	N° hojas	% yemas con formación de vástagos	% contaminados
Yema despierta	4,3	3,9	73,3	10
Yema dormida	0	0	0	100

Tabla 5. Efecto del tipo de yema sobre el número de hojas y nudos de vástagos de Vr 04343 regenerados *in vitro* utilizando como medio basal el propuesto por Murashige y Skoog (18).

Table 5. Effect of bud type on the number of leaves and nodes of *in vitro* regenerated Vr 04343 shoots using the basal medium proposed by Murashige and Skoog (18).

Tratamientos	N° nudos	N° hojas	% yemas con formación de vástagos	% contaminados
Yema despierta	3,2	3	63,3	17
Yema dormida	0	0	0	100

En las tablas 4 y 5 se observa un porcentaje de 100% de contaminación (fúngica) para el tratamiento designado como yema dormida. A causa de la presencia de agentes contaminantes a la fecha de toma de datos no se registraron valores para las variables número de nudos y hojas. Sin embargo, para el tratamiento yema despierta, en la tabla 4 se presentan los datos registrados a los 35 días (4,3 nudos y 3,9 hojas promedio para el tratamiento "yema despierta"). En la tabla 5 para el portainjeto Vr 04343 se registraron 3,2 nudos y 3 hojas promedio para el tratamiento "yema despierta". En vid no se encontraron antecedentes sobre el efecto de la época del año en el establecimiento y brotación de segmentos uninodales. Sin embargo, González *et al.* (9), trabajando con café en Colombia (donde las temperaturas anuales no tienen grandes fluctuaciones), mostraron valores inferiores a 10% de contaminación para junio y valores superiores en septiembre. Vianna *et al.* (27) también mostraron en *Carica papaya* L. la influencia de la época en la recolección de explantos, ya que aquellos explantos recolectados en agosto presentaron un 100% de contaminantes visibles, obteniendo a partir de octubre a enero valores progresivos de explantos establecidos (hasta 69%) sin la presencia de agentes contaminantes visibles. El establecimiento de segmentos uninodales de portainjertos de vid Paulsen 1103 y Vr 04343 debe ser realizado a partir de la pérdida de dormancia de la yema vegetativa hasta que ésta vuelva al período de letargo.

Los resultados obtenidos en el experimento de topófisis mostraron que en el portainjerto Paulsen 1103, el porcentaje de contaminación se encontró entre 0 y 3% (figura 1). En el caso del portainjerto Vr 04343 (figura 2), alcanzaron cifras que se encontraron entre 13 y 23%. Los resultados obtenidos para ambos portainjertos no concuerdan con lo observado por Maldonado *et al.* (16) en *Annona muricata* L., donde la contaminación por hongos era mayor al alejarse del ápice.

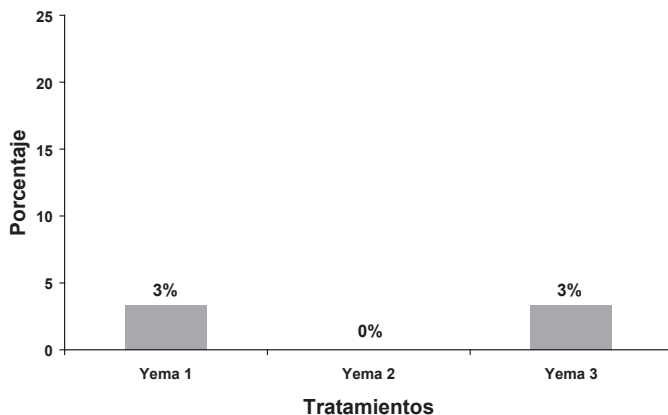


Figura 1. Porcentaje de contaminación dependiendo de la ubicación del segmento nodal en la planta madre (yema 1 ubicada inmediatamente debajo del ápice) -Paulsen 1103-.

Figure 1. Contamination percentage of nodal segments according to the location on the mother plant -Paulsen 1103-.

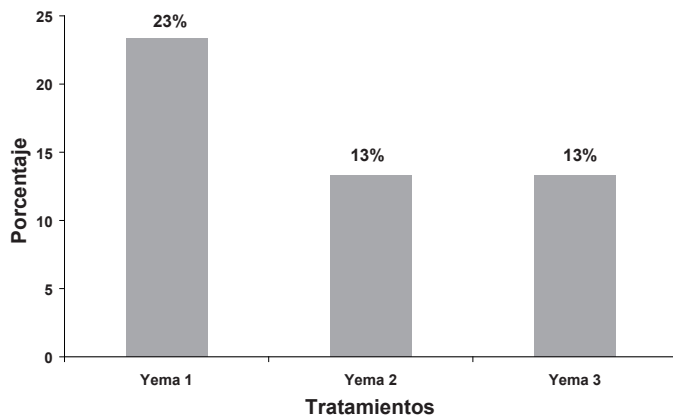


Figura 2. Porcentaje de contaminación dependiendo de la ubicación del segmento nodal en la planta madre (yema 1 ubicada inmediatamente debajo del ápice) -Vr 04343-.

Figure 2. Contamination percentage of nodal segments according to the location on the mother plant -Vr 04343-.

Del análisis de este experimento surgió que en el portainjerto Paulsen 1103 no existieron diferencias significativa al nivel del 5% entre los tratamientos para las dos variables estudiadas (número de nudos y hojas por vástagos regenerados) (tabla 6).

Tabla 6. Efecto de la topófisis de los segmentos uninodales de Paulsen 1103 sobre el número de hojas y nudos de los vástagos regenerados utilizando como medio basal el propuesto por Murashige y Skoog (18).

Table 6. Effect of one-node segments topofisis of Paulsen 1103 in the number of leaves and nodes of the regenerated shoot using the basal medium proposed by Murashige and Skoog (18).

Posición	Nº hojas	Nº nudos
Yema 1	1,82 a	1,99 a
Yema 2	2,3 a	2,47 a
Yema 3	2,58 a	2,82 a

Medias con letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ de acuerdo con LSD Fisher.

Sin embargo, el pie Vr 04343 sí presentó diferencias significativas al nivel del 5%, para la variable número de hojas, entre la yema 3 y las dos restantes, y entre estas dos no se encontraron diferencias significativas. Para la variable número de nudos hubo diferencias entre el tratamiento 3 y el 1 (tabla 7). Similares resultados fueron obtenidos por Biasi *et al.* (4) en el portainjerto de vid Jales. Maldonado *et al.* (16), trabajando con guanábano, obtuvieron los mayores resultados en la tercera y cuarta posición a partir del ápice; estos autores en sus estudios mostraron un elevado porcentaje de oxidación, la cual no fue observada en el presente ensayo en ninguno de los tratamientos.

Tabla 7. Efecto de la topófisis de los segmentos uninodales de Vr 04343 sobre el número de hojas y nudos de los vástagos regenerados, utilizando como medio basal el propuesto por Murashige y Skoog (18).

Table 7. Effect of nodal segments topofisis of Vr 04343 in the number of leaves and nodes of the regenerated shoot using the basal medium proposed by Murashige and Skoog (18).

Posición	Nº hojas	Nº nudos
Yema 1	0,42 b	0,42 b
Yema 2	0,84 b	0,96 ab
Yema 3	1,4 a	1,44 a

Medias con letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ de acuerdo con LSD Fisher.

Las mejores respuestas logradas pueden deberse a la mayor concentración de reservas que se encuentran en los segmentos más alejados al ápice ya que éstos tienen un mayor tamaño.

Multiplicación

En ambos portainjertos (Paulsen 1103 y Vr 04343), luego de 35 días de cultivo, se regeneró un solo vástago con cualquiera de los explantos cultivados y no se observó contaminación. La falta de múltiples vástagos podría deberse a que el medio

de cultivo utilizado no contenía reguladores de crecimiento. Esto fue registrado por Silva *et al.* (23), Borghezán *et al.* (5) utilizando el medio basal DSD1 (medio basal propuesto por Silva y Doazan -22-) sin adición de reguladores. En cambio, Mhatre *et al.* (17) obtuvieron múltiples vástagos con la adición de BAP (bencilaminopurina) IBA (ácido indolbutírico).

La tabla 8 muestra para la variable número de hojas, en el portainjerto Paulsen 1103, diferencias significativas entre los tratamientos propuestos. Los mayores valores se encuentran en los tratamientos 6 y 4, no difiriendo estadísticamente entre ellos. Seguidamente se encuentran los tratamientos 2, 1, 5, y el valor más bajo se observó en el tratamiento 3.

Tabla 8. Efecto del tipo de explanto sobre el número de hojas durante la multiplicación del portainjerto Paulsen 1103, utilizando como medio basal el propuesto por Murashige y Skoog (18).

Table 8. Effect of the explant type in the number of leaves during the multiplication stage of Paulsen 1103 rootstocks using the basal medium proposed by Murashige and Skoog (18).

Tratamientos	Nudos	Hoja	N° hojas
1	1	0	5,13 c
2	2	0	5,79 b
3	ápice	0	4,33 d
4	ápice	1	6,6 a
5	1	1	4,77 cd
6	2	1	7,03 a

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0,05$ de acuerdo con Duncan.

Sin embargo, para el portainjerto Vr 04343 (tabla 9) el mayor número de hojas se obtuvo en los tratamientos 5 y 4 no difiriendo estadísticamente entre ellos. Valores intermedios son observados en los tratamientos 6, 1 y 2. Al igual que lo reportado en el portainjerto Paulsen 1103, el tratamiento 3 obtuvo los menores valores.

Tabla 9. Efecto del tipo de explanto sobre el número de hojas durante la multiplicación del portainjerto Vr 04343, utilizando como medio basal el propuesto por Murashige y Skoog (18).

Table 9. Effect of the explant type in the number of leaves during the multiplication stage of Vr 04343 rootstocks using the basal medium proposed by Murashige and Skoog (18).

Tratamientos	Nudos	Hoja	N° hojas
1	1	0	4,43 bc
2	2	0	4,42 bc
3	ápice	0	3,87 c
4	ápice	1	5,67 a
5	1	1	6,17 a
6	2	1	4,83 b

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0,05$ de acuerdo con Duncan.

Igualmente que en el presente experimento, Thomas (26), trabajando con *Vitis vinifera* Arka Neelamani y Thompson Seedless, encontró valores superiores en aquellos explantos que mantenían sus hojas enteras. En el portainjeto Jales, Biasi *et al.* (4) mostraron la influencia de la presencia de la hoja en el segmento uninodal al momento de multiplicarlo. La extracción de las hojas del explanto presentó un efecto perjudicial, disminuyendo el número de brotaciones (20). Para los portainjertos de vid, Paulsen 1103 y Vr 04343, la presencia de una hoja en el segmento nodal aumentó el coeficiente en la fase de multiplicación.

Todos los ápices meristemáticos cultivados presentaron a la fecha de toma de datos un tamaño superior al doble establecido en la etapa de establecimiento.

Del análisis de la tabla 10 surge que existieron diferencias significativas al nivel del 5%, para la variable número de vástagos entre el tratamiento 2 con respecto a los demás tratamientos (1, 3 y 4). Para la segunda variable (N° hojas), también existieron diferencias significativas: el mayor valor fue obtenido en el tratamiento 2, luego el 4 y no difirieron entre ellos el tratamiento 3 y 1 para el portainjerto Paulsen 1103.

En cambio, el portainjerto Vr 04343 no muestra diferencias al nivel del 5% en el número de vástagos entre los tratamientos 2, 3 y 4, pero sí entre éstos y el tratamiento 1. Las diferencias son más marcadas para el número de hojas: el tratamiento 2 presentó 4,97 hojas difiriendo con los demás tratamientos. El tratamiento 3 obtuvo valores intermedios y el tratamiento 4 y 1 no difirieron al nivel del 5% entre ellos.

Tabla 10. Efecto de diferentes concentraciones de BAP (bencilaminopurina) sobre el número de hojas y vástagos obtenidos con el cultivo de ápices del portainjerto Paulsen 1103 y Vr 04343, utilizando el medio basal propuesto por Murashige y Skoog (18).

Table 10. Effect of BAP on the number of leaves and shoots obtained by cultivation of Paulsen 1103 and Vr 04343 shoot tips using the basal medium proposed by Murashige and Skoog (18).

Tratamientos	Concentraciones	Paulsen 1103		Vr 04343	
		N° vástagos	N° hojas	N° vástagos	N° hojas
1	½ MS + 0 mg/l BAP	0 b	0 b	0 b	0 c
2	½ MS + 0,5 mg/l BAP	0,47 a	0,47 a	1 a	4,97 a
3	½ MS + 1 mg/l BAP	0,03 b	0,07 b	0,97 a	2,2 b
4	½ MS + 2 mg/l BAP	0,2 b	0,27 ab	1 a	1 c

Medias con letras desiguales difieren para $p < 0,05$ de acuerdo con Duncan.

Contrariamente con este trabajo, Biasi *et al.* (3), trabajando con ápices de vid Jales y Campinas, informaron los mejores resultados de crecimiento a los 30 días en concentraciones de 2 mg.L⁻¹ de BAP. Guiñazú *et al.* (10), trabajando con variedades criollas, obtuvieron una media de 7 nudos por explanto (como explantos utilizaron ápices conteniendo la primera hoja desplegada).

Para el establecimiento de ápices meristemáticos de los portainjertos de vid Paulsen 1103 y Vr 04343, es necesaria la adición de BAP, ya que en MS, sin el contenido del regulador, no se presentaron vástagos ni hojas. En concentraciones superiores a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP se produjo una disminución en el número de hojas.

Enraizamiento

En esta etapa las vitroplantas presentaban un número promedio de raíces de 4,3 para el pie Paulsen 1103 y 3,5 para Vr 04343 y un tamaño de 6 cm para el primero y 5,5 cm para el segundo. Silva *et al.* (23) y Borghezan *et al.* (5), trabajando con el medio basal DSD1 (22) sin adición de reguladores de crecimiento, obtuvieron valores superiores para el tamaño de raíces en cm, pero inferiores para la variable número de raíces por explanto. Similares resultados fueron obtenidos por Guiñazú *et al.* (10).

Una vez finalizada esta etapa las plantas que contienen raíces pueden ser utilizadas para la fase de aclimatación.

Aclimatación

El pie de injerto Paulsen 1103 obtuvo un 80% de plantas vivas, mientras que el pie Vr 04343, 90%.

Estos resultados son similares a los reportados por Borghezan *et al.* (5) y Silva *et al.* (23), quienes obtuvieron valores de 95% de plantas vivas en etapa de aclimatación. Otro trabajo con un porcentaje de 100% de plantas vivas fue publicado por Biasi *et al.* (4). Estos valores fueron obtenidos en el portainjerto de vid Jales y la aclimatación de las plantas se realizó en recipientes cerrados dentro de una cámara de aclimatación. El porcentaje de plantas vivas de los portainjertos Paulsen 1103 y Vr 04343, en la etapa de aclimatación, puede estar relacionado con el control de la pérdida de agua en invernáculo. También se puede relacionar con el tamaño de la parte aérea y raíces (en el momento del pasaje a sustrato), las cuales poseen las reservas necesarias para superar esta etapa.

CONCLUSIÓN

Para micropropagar portainjertos de vid (Paulsen 1103 y Vr 04343) utilizados en la provincia de Misiones, se debe utilizar como medio de cultivo en la fase de establecimiento MS $\frac{1}{4}$ (18) sin adición de reguladores de crecimiento y segmentos uninodales con su yema despierta como explanto. En la etapa de multiplicación, la presencia de una hoja en el segmento nodal aumenta el coeficiente de multiplicación; sin embargo, también se logra la multiplicación de vástagos partiendo de un explanto conformado por 1 ó 2 nudos con o sin presencia de una hoja.

Para el establecimiento de ápices meristemáticos es necesaria la adición de BAP (bencilaminopurina), ya que en el medio conteniendo MS $\frac{1}{2}$ sin el adición del regulador de crecimiento no se registraron vástagos y en concentraciones superiores a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP se produjo disminución en el número de hojas.

Al finalizar la etapa de multiplicación, las vitroplantas con presencia de raíces pueden ser utilizadas en la fase de aclimatación.

Las plantas de ambos portainjertos, llevadas a la fase de aclimatación, presentaron un alto porcentaje de supervivencia (80 a 90%).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bernd, R. B.; Trivilin, A. P.; Camargo, U. A.; Czermainski, A. B. C. 2007. Micropropagation of hybrids of *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia* rootstocks with resistance to perolada-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* Hempel, Hemiptera: Margarodidae. Revista Brasileira de Fruticultura. 29: 350-354.
2. Biasi, L. A.; Pommer, C. V.; Da Silva Passos, I. R. 1997. Comparação do desenvolvimento de porta enxertos de videira obtidos por estaquia e por micropropagação. Agrárias, Curitiba. 16: 153-158.
3. ———; Da Silva Passos, I. R.; Pommer, C. V. 1998. Estabelecimento *in vitro* de porta enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. Scientia. agricola. Piracicaba. 55: 196-202.
4. ———; Da Silva Passos, I. R.; Pommer, C. V. 1998. Micropropagação do porta enxerto de videira Jales. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília. 33: 1587-1594.
5. Borghezán, M.; Antunes de Moraes, K. L.; Moreira, M. F.; Silva, A. 2003. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília. 38: 783-789.
6. Chee, R.; Pool, R. M. 1983. *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*; Application of previously defined culture conditions to a selection of genotype. Vitis. 22: 363-374.
7. Gassen, D. N. 1989. Insetos subterrâneos prejudiciais às culturas no sul do Brasil. Passo Fundo, EMBRAPA/ CNPT. 72.
8. Giovannini, E. 1999. Produção de uvas para vinho, suco e mesa. Porto Alegre. (ed). Renascença. 84-95.
9. González, M. E.; Hernández, M. M.; Mazorra, L. M.; Santana, N.; Rodríguez, Y.; Cabrera, M. 2005. Influencia de la época del año en la respuesta *in vitro* del cafeto *Coffea canephora* P. Var. Robusta. Revista colombiana de biotecnología. 7: 5-14.
10. Guiñazú, E. M.; Ponce, M. T.; Guzmán, J.; Juárez, D. E.; Cirrincione, M. A. 2005. Micropropagación de vid. Protocolo para variedades "criollas". Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 37(2): 93-103.
11. Hartl, D.; Males, P. 2000. Factors affecting of grapevine cultivars, Vugava and Plavac mali micropropagation from *in vitro* cultured minicuttings. Biología Bratislava. 55: 121-129.
12. Hennig, H. 2008. La vid en Misiones. Guía práctica para el cultivo de la vid. 15.
13. Hickel, E. R. 1998. Pragas de fruteiras tropicais de importância agroindustrial. En Braga Sobrinho, R.; Cardoso, J. E.; Freire, F. C. O (eds.), Brasília, EMBRAPA. 191-209.
14. Lloyd, G.; McCown, B. 1986. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalma latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proceeding Interactional Plant Propagator's Society, Ashville. 30: 421-427.
15. Machado, P. M.; Biasi, L. A.; Ritter, M.; Ribas, L. L. F.; Koehler, S. H.; Zanette, F. 2007. Meios de cultura na micropropagação de porta-enxerto de videira "Vr 04343" (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). Ciencia Rural. 37: 277-280.
16. Maldonado, C. G.; Ramírez Villalobos, C. M.; Sierralta, L. S. 2001. Tipo de explanto en el establecimiento *in vitro* del guanábano (*Annona muricata* L.). Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela. 18: 258-265.

17. Mhatre, M.; Salunkhe, C. K.; Rao, P. S. 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: towards an improved protocol. *Scientia Horticulturae* 84: 357-363.
18. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
19. Nitsch, J. P.; Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
20. Novák, F. J.; Juvová, Z. 1983. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. *Scientia Horticulturae*. 18: 231-240.
21. Quorin, M. ; Lepoivre, P. 1977. Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de Prunas. *Acta Horticulturae*. 78: 437-442.
22. Silva, A. L.; Doazan. J. P. 1995. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliqué á des portegreffes de vigne *in vitro*. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, Bordeaux*. 29: 1-9.
23. _____; Schuk, E.; Borges, R.; Moreira, M. F.; Borghezán, M.; Antunes de Moraes, K. L.; Mikulski, C. A.; Velloso, C. Q. 2003. Propagação de videira *in vitro*: produção de plantas matrizes básicas de porta-enxertos. *Agropecuaria Catarinense*. 16: 74-78.
24. Soria, S. J. V.; Gallotti, B. J. 1986. O margarodes da videira *Eurhizococcus brasiliensis* (Homoptera:Margarodidae): biología, ecología e controle no sul do Brasil. Bento Gonçalves, EMBRAPA/CNPUV. 22.
25. Stolar, C. E. 2007. Propagación *in vitro* de *Vitis labrusca* L. cv. *Niágara* y *Vitis vinifera* L. cv. *Ora*. Tesis de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. Universidad de Santa Clara. 23-26.
26. Thomas, P. 1998. Contribution of leaf lamina of grape nodal microcuttings to rooting, root vigour and plantlet growth *in vitro*. *Journal Plant Physiology*. 153: 727-732.
27. Vianna, R. G.; Couto, F. A. A.; Oliveira, A. B.; Zambolim, L.; Maria, J. A. 1997. Rimfampicina na descontaminação bacteriana de explantos de mamoeiro provenientes do campo. *Bragantia*. 56: 249-254.