

438696

23 JUN 1975

P.- 60.689

692/75

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA
RECHERCHE (ANVAR)

entidad francesa

establecida en 13, rue Madeleine Michelis, 92522
Neully sur Seine, Francia

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE VARIANTES DE
PLANTAS QUE PRESENTAN CARACTERISTICAS MEJORADAS".

25.6.75

- 1 -

El presente invento se refiere a la mejora de las plantas por creación de caracteres fenotípicos enteramente nuevos, conservados en el caso de la multiplicación vegetativa y fijados inmediatamente en el caso de la multiplicación genética, sin perder la ganancia de las selecciones genéticas características anteriores.

En un vegetal, se puede considerar que el funcionamiento celular está determinado por un potencial genético "bruto" idéntico en cada uno de los núcleos del individuo y por el sistema o entorno epigenético que modula este funcionamiento fijo en su regulación. En la presente descripción, la expresión "sistema o entorno epigenético" designa un conjunto de variables que intervienen en el funcionamiento celular, a saber:

1) el gel citoplásmico que contiene los elementos del metabolismo, sometido a equilibrios bioquímicos y biofísicos particulares en cada instante,

2) las estructuras membranosas e intracitoplásmicas, tales como los cloroplastos y los mitocondrios,

3) los efectos a los cuales se superponen los de la posición de cada una de las células, con relación al conjunto del vegetal, que originan un funcionamiento orientado en una dirección particular, y con relación a las otras células que originan un funcionamiento coordinado de éstas,

4) el medio circundante fluctuante, en el cual crece la planta.

5 Sometida a este conjunto de factores cuya expresión se repite de manera idéntica en cada generación, la información genética se puede expresar de maneras diversas, como lo muestra la heterofilia de ciertas plantas, tales como, por ejemplo, Sagittaria sagittifolia, Salvinia, etc.

10 Se ha descubierto, según el presente invento, que era posible obtener, a partir de una información genética única y constante, expresiones diversas de ésta únicamente por modificación del entorno epigenético, siendo realizada dicha modificación bajo la influencia de presiones impresas a las células por el cultivo de "tejidos" in vitro.

15

Se ha estudiado ya la variabilidad de plantas regeneradas obtenidas por cultivo in vitro de tejidos. Se pueden citar, a este efecto, los trabajos de Lutz (Rev. Gén. Bot., 1969, 76, 309-359) relativos al estudio de las aptitudes morfogénicas de los cultivos de tejidos; Se enseña en este artículo que la cepa normal de tabaco exige para su entretenimiento, además de un medio de base, tal como el medio de "KNOP" [véase a este efecto "el cultivo de los tejidos vegetales" GAUTHERET R.J. 1959-Ed. Masson et Cie] o el medio de "MURASHIGE J. et SKOOG F.

20

25

[1962- Revue Physiologia Plantarum 15 p 473], Kinetina y AIA (ácido indolacético) o kinetina y 2-4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

5 J. Mousseau ha estudiado igualmente la variabilidad de una población de plantas procedentes de neoformaciones de brotes de tabaco in vitro [coloquio internacional del C.N.R.S. 293 - cultivo de los tejidos de plantas - Estrasburgo, 234 - 239].

10 Se han hecho igualmente estudios sobre otras plantas; se pueden citar, por ejemplo, los trabajos de Pelletier et al [Ann. Amélior. Plantes 1971; 21, (2) 221-233] sobre el cultivo in vitro de tejidos de trébol blanco.

15 El procedimiento según el presente invento, que será descrito con más detalle a continuación, permite obtener, a partir de una planta que pose características génicas únicas y fijas, "variantes" por modificación del entorno epigenético, cuyas características se mantienen después de varias autofecundaciones. Por
20 cruce entre estas variantes, se obtiene, sin aporte génico exterior, una planta más vigorosa. La expresión "más vigorosa", utilizada en la presente descripción, caracteriza una planta que crece más deprisa y mejor, que es más resistente, especialmente a la intemperie, a
25 los organismos, tales como, por ejemplo, los virus y los

hongos, y a los otros factores que perturban normalmente el crecimiento de una planta, con relación a una planta testigo de la misma variedad obtenida por reproducción normal.

En la presente descripción, el término "planta" engloba las plantas agronómicas y las plantas hortícolas. A título de ejemplo de plantas agronómicas a las cuales se puede aplicar el procedimiento del invento, se citará el trigo, cebada, soja, colza, maíz, especialmente los F_1 de descendientes homocigotos de los híbridos de maíz, etc.; como ejemplo de plantas hortícolas utilizables según el invento, se pueden mencionar las lechugas, guisantes, judías y plantas análogas.

El procedimiento según el presente invento consiste:

- 1) En plantar y cultivar, en medio nutricional sintético, los tejidos que resultan de la germinación de semillas de una planta madre única, estando constituido el medio de cultivo nutricional, por una parte, por un medio de base formado por sales minerales, vitaminas, hierro y sacarosa y, por otra parte, por sustancias de crecimiento, en cantidad suficiente para asegurar la formación de callos.

- 2) en transplantar los callos así formados a

un medio morfogénico constituido por el medio de base citado, cuyo contenido en sacarosa es diferente y por sustancias de crecimiento, y

5 3) en poner las plantas así obtenidas en tiestos.

Por autofecundación de las plantas que resulta de las etapas precedentes, se obtienen, de manera sorprendente e inesperada, familias de descendientes que presentan características génicas fijas sin aporte génico exterior. Por cruce entre estas familias aparece un vigor suplementario.

10 Así, según un modo de realización preferido del invento, el procedimiento para la obtención de variantes de plantas que presentan características mejoradas, consiste:

15 1) en plantar y cultivar, en el medio nutricio definido anteriormente, los cotiledones o tejidos que resultan de la germinación de semillas de una planta madre única para formar callos,

20 2) en transplantar los callos así formados al medio morfogénico definido anteriormente,

3) en poner en tiestos las plantas obtenidas,

4) en multiplicar las plantas por vía sexual.

25 Según el invento, las semillas que proceden de una sola variedad de planta, es decir, de una planta que

posee características génicas fijas, o en otros términos, de una planta homocigoto, son gérmenes en condiciones estériles. Un ejemplo de modo operativo para la germinación de las semillas en condiciones estériles, se dará a continuación respecto a las lechugas.

El medio nutricio sintético empleado en la primera etapa del procedimiento del invento, es un medio no morfogénico que está constituido, como se ha indicado anteriormente, por una parte, por un medio de base formado por sales minerales, vitaminas, hierro y sacarosa y, por otra parte, por sustancias de crecimiento apropiadas.

En el procedimiento según el presente invento, se emplea un conjunto de sales minerales constituido por macroelementos y microelementos; ejemplos de macroelementos y de microelementos que convienen a los fines del invento serán dados en lo que sigue de la presente descripción.

Entre las sustancias de crecimiento que convienen a los fines del presente invento, se pueden citar, por ejemplo, el ácido alfa-indolbutírico (ALB), el ácido alfa-naftalénacético (ANA), la 6-furfurilaminopurina (kinetina), el ácido 2,4-diclorrofenoxiacético o (2,4 D), el ácido indolacético (AIA), la bencilanenina (BA) o cualquier otra sustancia de crecimiento análoga

corrientemente utilizada por el especialista en este terreno; los nombres o las abreviaciones indicadas anteriormente son utilizadas corrientemente para denominar dichas sustancias de crecimiento y serán utilizados en lo que sigue de la presente descripción. Será fácil para el especialista determinar por medio de ensayos de rutina las concentraciones de las sustancias de crecimiento que convienen a los fines del invento.

El cultivo medio nutricio sintético se realiza ventajosamente según el presente invento a una temperatura comprendida entre aproximadamente 18 y 23°C, con duraciones de iluminación de 0 a 18 horas, en las condiciones de iluminación más eficaces para favorecer la asimilación clorofílica; estas condiciones son fáciles de determinar por el especialista.

El medio nutricio contiene eventualmente una sustancia gelificante, tal como el agar. Se pueden utilizar hidrolizado de caseína y leche de coco en el caso de medios de cultivo líquidos.

El pH de los medios empleados según el invento puede variar dentro de amplios límites, sin perturbar el crecimiento del callo. Sin embargo, por razones debidas a la solidificación de la gelosa, se prefiere utilizar un pH del orden de 5,7 a 6,5. En el caso de los medios líquidos, pH convenientes están comprendidos en la

gama de 5,5 a 6,5.

El hierro es añadido ventajosamente al medio nutricional en presencia de un agente quelatador, por ejemplo en presencia de ácido etilén-diamintetraacético (EDTA).

Es particularmente ventajoso según el invento mantener los callos en condiciones no morfogénicas durante un mínimo de dos o tres trasplantes sucesivos.

Los callos así formados son trasplantados a continuación a un medio morfogénico. El medio morfogénico empleado según el invento está constituido por el medio de base utilizado en la etapa de cultivo no morfogénica, medio de base en el cual el contenido en sacarosa es diferente del contenido en el medio no morfogénico y por una o varias sustancias de crecimiento. Se efectúa un solo trasplante y se deja que el callo se regenere.

Las concentraciones en sustancias de crecimiento en el medio morfogénico son diferentes de las del medio no morfogénico; serán fáciles para el especialista determinar, por ensayos de rutina, estas concentraciones; se puede indicar, sin embargo, que de manera general, el medio morfogénico no contendrá 2,4 D cuando esta sustancia esté presente en el medio no morfogénico.

Las plantas así obtenidas son puestas a conti-

5 nuación en tiestos y cultivadas, en primer lugar, en condiciones sensiblemente idénticas a las utilizadas para el cultivo morfogénico y que serán definidas a continuación en el caso de las lechugas y progresivamente llevadas a las condiciones atmosféricas normales (cultivo en el exterior).

El procedimiento según el invento se ilustra esquemáticamente en la figura 1 aneja a la presente descripción.

10 El presente invento se describirá ahora con más detalles haciendo referencia a las lechugas, sin que esto constituya, no obstante, una limitación.

15 En la presente descripción, la expresión "lechuga" se utiliza en su sentido botánico más amplio. Es sinónima de la definición botánica más precisa "Lactuca sativa L". Una referencia bibliográfica pertinente sobre el conjunto de esta especie es: "Cultivos hortícolas" de Laumonnier R-1962 [J.B. Baillière -Nelle Encycl. Agricole 2º volumen].

20 Como se ha indicado anteriormente, las semillas son germinadas en condiciones estériles; se efectúa ventajosamente la germinación de las semillas de lechuga según el modo operativo siguiente:

25 Después de haber sido remojadas en un agente humectante, tal como, por ejemplo, en el producto conoci

do bajo la denominación comercial "Teepol", las semillas son esterilizadas en alcohol absoluto y luego en el hipoclorito de calcio a 8% durante 20 minutos. A continuación son lavadas tres veces con agua estéril. Una vez depositadas estérilmente sobre un papel filtro húmedo, en caja de Pétri, son depositadas durante 48 horas en el refrigerador a 4°C, con el fin de regularizar la germinación y de alzar una dormancia eventual.

La germinación tiene lugar en invernadero o en estufa, a una temperatura comprendida entre 20°C y 23°C, aproximadamente; puede ser realizada en la oscuridad, en cuyo caso se obtiene una fuerte elongación del tallo, o incluso a la luz del día, por ejemplo con entre, aproximadamente, 8 y 12 horas de iluminación, lo que proporciona una germinación más rápida y un tallo más corto.

Después de un lapso de tiempo de cuatro a cinco días, se produce la aparición de una radícula blanca y cubierta de pelos, y luego de cotiledones verde oscuro, que son puestos a continuación en cultivo in vitro en condiciones estériles según el procedimiento del invento.

El medio de cultivo utilizado en el procedimiento del invento está formado, como se ha indicado anteriormente

A) por un medio de base que contiene:

1) un conjunto de sales minerales consti-

tuído por macroelementos y microelementos,

2) vitaminas,

3) hierro en presencia de un agente quelatador, tal como el ácido etilén-diaminatetraacético (DTA) y

4) sacarosa

y B) por sustancias de crecimiento elegidas entre una de las sustancias citadas anteriormente y que son, de preferencia:

El ácido alfa-naftalenacético (ANA) y/o la 6-furfuril-aminopurina (kinetina).

El medio nutricio contiene eventualmente, como se ha dicho anteriormente, una sustancia gelificante, tal como el agar. Se pueden utilizar hidrolizado de caseína y leche de coco en el caso de medios de cultivo líquidos.

El pH de los medios empleados según el invento puede variar dentro de amplios límites, sin perturbar el crecimiento del callo. Sin embargo, por razones debidas a la solidificación de la gelosa, se prefiere utilizar un pH del orden de 5,7 a 6,5. En el caso de los medios líquidos, pH convenientes están comprendidos en la gama de 5,5 a 6,5.

Los macroelementos contenidos en el medio nutricio empleados en el procedimiento del invento son los

compuestos siguientes: los nitratos de potasio y de amonio, el sulfato de magnesio ($MgSO_4, 7H_2O$), el cloruro de calcio ($CaCl_2, 2H_2O$) y el fosfato monopotásico. Este conjunto de sales minerales constituye lo que el especialista llama corrientemente "macroelementos de MURASHIGE y SKOOG" [Revue Physiologia Plantarum 15, p.473].

Los microelementos contenidos en el medio de cultivo son los sulfatos de manganeso, de cinc y de cobre, el yoduro de potasio, el ácido bórico, el cloruro de calcio y el óxido doble de molibdeno y de sodio; este conjunto de elementos constituye "los microelementos de MURASHIGE y SKOOG". Según una variante del invento el cloruro de calcio y el óxido doble de molibdeno y de sodio pueden ser sustituidos en el conjunto descrito más arriba por cloruro de aluminio ($AlCl_3, 6H_2O$) y cloruro de níquel ($NiCl_2, 6H_2O$); este otro conjunto de microelementos es denominado corrientemente "microelementos de HELLER" [véase a este efecto "La Culture de tissus végétaux" de GEAUTHERET, citado anteriormente].

Las cantidades de macroelementos y de microelementos a utilizar para preparar un litro de medio cultivo según el invento, son las siguientes:

25

Macroelementos SKOOG		Microelementos SKOOG	
Sal	peso en mg/l de medio	Sal	peso en mg/l de medio
NH ₄ NO ₃	1650	MnSO ₄ , (4 H ₂ O)	22,300
KNO ₃	1900	ZnSO ₄ , (7 H ₂ O)	8,600
CaCl ₂ , (2 H ₂ O)	440	H ₃ BO ₃	6,200
MgSO ₄ , (7 H ₂ O)	370	KI	0,830
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ , (2 H ₂ O)	0,350
		CuSO ₄ , (5 H ₂ O)	0,025
		CaCl ₂ , (6 H ₂ O)	0,025

o, según la variante descrita más arriba:

Macroelementos SKOOG		Microelementos HELLER	
Sal	peso en mg/l de medio	Sal	peso en mg/l de medio
NH ₄ NO ₃	1650	H ₃ BO ₃	1,000
KNO ₃	1900	ZnSO ₄ , (7 H ₂ O)	1,000
CaCl ₂ , (2 H ₂ O)	440	MnSO ₄ , (H ₂ O)	0,076
MgSO ₄ , (7 H ₂ O)	370	CuSO ₄ , (5 H ₂ O)	0,030
KH ₂ PO ₄	170	AlCl ₃ , (6 H ₂ O)	0,050
		KI	0,010
		NiCl ₂ , (6 H ₂ O)	0,030

Como se ha indicado anteriormente, el medio de cultivo contiene igualmente las vitaminas citadas a continuación en las proporciones siguientes para un litro de medio de cultivo:

5	Meso-inositol	100,00 mg
	Patotenato de calcio	1,00 mg
	Acido nicotínico	1,00 mg
	Vitamina B6-piridoxina-	1,00 mg
	Vitamina B1-tiamina-	1,00 mg
10	Biotina	0,01 mg

Este conjunto de vitaminas se denomina corrientemente "Vitaminas de Morel" [véase a este efecto la obra de GAUTHERET citada anteriormente] 7.

15 El hierro se añade ventajosamente al medio nutricional en presencia de un agente quelatador, por ejemplo en presencia de ácido etiléndiamintetracético (EDTA). Se utilizan, por ejemplo, para un litro de medio nutricional, 37,2 mg de Na₂ EDTA y 27,8 mg de FeSO₄ (7 H₂O) lo que corresponde a una concentración en hierro de 5,6 mg/l.

20 Ensayos efectuados han mostrado que cada sustancia de crecimiento, presente en el medio de cultivo, debía ser utilizada según el procedimiento conforme al invento, en el caso de las lechugas, a una concentración que no debe ser superior a 1 mg/l (10⁻³ g/l) de medio nutricional; una concentración superior a 1 mg/l impide el de

25

desarrollo de la cepa. Será fácil, por otra parte, para el especialista, determinar la cantidad de sustancia de crecimiento mínima a emplear.

5 Según el invento, una concentración de cada
sustancia de crecimiento presente en el medio de cultivo
de 1 mg/l es eficaz para el comienzo del crecimiento de
los callos, y una cantidad de 2 a 5 veces menor es, en
general, suficiente para mantener el desarrollo de callos
secundarios a partir de los callos primarios. Se ha mos-
10 trado igualmente que la sustancia de crecimiento ANA uti-
lizada en cantidades convenientes con el medio de base
según el invento inducía la formación de raíces, que la
mezcla ANA-kinetina favorecía la formación de brotes y
que la sustancia de crecimiento kinetina permitía mante-
15 ner el callo en condiciones no morfogénicas. Será fácil
para el especialistas determinar la función de la fase
de crecimiento considerada la sustancia a utilizar y su
concentración.

20 Por otra parte, ensayos comparativos efectua-
dos sobre medios nutricios sintéticos diferentes de los
empleados en el procedimiento según el invento, por la
composición de su medio de base o por la naturaleza de
la sustancia de crecimiento, han mostrado que los medios
de cultivo según el presente invento eran específicos
25 para el desarrollo de los callos por cultivo de tejidos

in vitro en el caso de las lechugas.

5 El cultivo sobre el medio nutricio sintético, se realiza ventajosamente según el presente invento a una temperatura comprendida entre aproximadamente 18 y 23°C con duraciones de iluminación de 0 a 18 horas, en condiciones de iluminación más eficaces para favorecer la asimilación clorofílica, siendo estas últimas fáciles de determinar por el especialista. Los cultivos en medio líquido, se hacen, en general, a 20°C y 15 horas de iluminación.

10 En el caso de las lechugas, la formación de las raíces no es simultánea al desarrollo de la plántula sobre el callo. La rizogénesis puede tener lugar sin adición de sustancias de crecimiento, pero el tiempo de latencia es con frecuencia superior a un mes. Según 15 el procedimiento del invento, se transplantan los callos a un medio morfogénico que contiene una sustancia de crecimiento que induce la formación de plántulas y se toman, una vez que existen regeneraciones visibles en 20 el callo, las plántulas, cuando tienen un tamaño suficiente, y se ponen en un medio morfogénico que contiene una sustancia de crecimiento que induce la rizogénesis: tal medio será denominado en adelante medio rizogénico; este medio rizogénico está constituido por el medio de 25 base definido más arriba, al que se ha añadido sacarosa

5 y una sustancia de crecimiento, que es el ácido alfa-naftalenacético (ANA) o el ácido alfa-indolbutírico (AIB) y agar, siendo utilizado el agar en cantidad su-
ficiente para mantener las plántulas en su sitio y no
10 estorbar la emisión de las raíces. Se ha hallado, se-
gún el invento, que la sacarosa es indispensable para
la supervivencia de las plántulas mientras que la au-
sencia total de agar no favorece la formación de raíces.
El pH del medio rizogénico está comprendido ventajosa-
mente entre 5,7 y 6,5.

15 Un medio rizogénico que conviene particular-
mente a los fines del invento, comprende el medio de
base definido más arriba, al cual se ha añadido por
litro, aproximadamente, 20 a 35 g, especialmente 30g,
de sacarosa, y la sustancia de crecimiento. La sustan-
cia ANA rizogénica para los callos induce la regenera-
ción de raíces, gruesas y nudosas. Por otra parte, im-
20 pide su emisión a partir de la concentración de 10^{-4}
g/l. Por el contrario, la sustancia AIB, eficaz a do-
sis diez veces menores, origina una presencia menos
frecuente de estas raíces anormales. La sustancia de
crecimiento particularmente preferida para la rizogé-
nesis de las plántulas según el invento es, por consi-
guiente, el AIB. Esta segunda etapa del procedimiento
25 según el invento se realiza, de preferencia, a una tem

peratura comprendida entre aproximadamente 5 y 20°C,
de preferencia a 15°C aproximadamente, con 8 horas de
iluminación aproximadamente; al cabo de un periodo que
va de 7 a 21 días aproximadamente, las plántulas pue-
den ser puestas en tiestos.

5

La realización del procedimiento según el
invento permite la obtención de variantes de lechugas,
como lo mostrarán los resultados de ensayos presenta-
dos a continuación, que son diferentes de todas las va-
riantes obtenidas por los métodos clásicos de mutación.
Las variaciones inducidas durante el cultivo de "teji-
dos" in vitro modifican el entorno epigenético de la
célula; estas variaciones epigenéticas no provocan cam-
bios en el genoma, sino en la secuencia y la intensidad
de la expresión del programa, o incluso solicitan la re-
depresión de genes redundantes.

10

15

El fenotipo de cada planta regenerada obteni-
do según el procedimiento del invento, resulta de las
interacciones entre una información genética intacta,
la perturbación citoplásmica inducida durante el cul-
tivo de "tejido" al nivel del callo de que ha salido,
y de las condiciones ambientales en las cuales la plan-
ta se desarrolla.

20

25

La perturbación citoplásmica inducida durante
el cultivo de "tejido" in vitro del callo será tanto más

acentuada cuando los callos sean mantenidos durante un cierto número de trasplantes en condiciones no morfogénicas. En tales condiciones, cada célula está muy poco "especializada"; su nivel o estado citoplásmico varía poco. El funcionamiento del genoma puede tener, por consiguiente, un campo muy amplio de variación:

- en primer lugar, porque pequeños atractores podrán actuar sobre la célula y "desviarla" en su regulación, es decir, en la modulación de la expresión del conjunto del genoma, ligada al estado epigenético,

- a continuación, porque la célula "variante" que aparece en el seno del callo sobrevive fácilmente, puesto que le son exigidos pocos rendimientos.

En resumen, las variaciones serán inducidas preferentemente durante el cultivo de los callos amorfos, y es solo a partir de la morfogénesis de las plántulas cuando se observa eventualmente su expresión. Así, la información hereditaria de las plantas neoformadas podrá ser utilizada o "liberada" según una programación particular, diferente de la de las plantas testigos.

Así, es particularmente preferido, según el presente invento, mantener los callos en condiciones no morfogénicas durante un mínimo de dos o tres trasplantes sucesivos. Un número superior de trasplantes, que

llegue, por ejemplo, hasta seis o más, no es obligatorio para obtener variantes pero, en ciertos casos, puede ser utilizado sin inconveniente; tales condiciones son obtenidas, manteniendo los cultivos en la oscuridad, a partir del callo primario o utilizando únicamente kinetina
5 no acoplada al ANA, o incluso por acción mecánica dissociando los cúmulos celulares por cultivo en medio líquido agitado; los cultivos son mantenidos, de preferencia, en la oscuridad a partir del callo primario durante dos
10 a tres trasplantes.

El procedimiento según el presente invento es aplicable a todas las variantes de lechuga, variedades de invernadero, de invierno, etc. ... tales como, por ejemplo, las variedades "Val d'Orge", "Gallèga", "Averya
15 E₂₇", "Batavia".

En el medio nutricio sintético según el invento, existe formación de un callo primario que se adapta a este medio, a la vez que lo empobrece y lo libera de nuevas sustancias. El trasplante a un medio nuevo idéntico al medio inicial, perturba los equilibrios anterior
20 mente establecidos en el callo y origina su necrosis rápida. A este nivel, la toxicidad es evitada disminuyendo el grado de sustancias de crecimiento del medio. Ensayos efectuados han mostrado que los fenómenos de caulogénesis, proliferación o regeneración de raíces inducidos por
25

el medio nutricio utilizado para la formación de callos primarios, son conservados cuando estos callos son transplantados en el mismo medio de base que contiene aproximadamente de 2 a 5 veces menos sustancias de crecimiento.

5 Los callos primarios pueden servir para la siembra del medio líquido. Un mes después de la puesta en cultivo, se ha comprobado que los callos se han dividido y que los cúmulos celulares han proliferado activamente, constituyendo un cultivo espeso de color amarillo, 10 amarillo ocre o verde claro, según los callos. La multiplicación celular en medio líquido agitado es mucho más rápida que la que se produce en medio gelosado; esto debe al hecho de que las sustancias de crecimiento 15 llegan más rápidamente a todas las células de los callos, mientras que en un medio gelosado, existe un cierto tiempo de latencia, que corresponde a la difusión de las sustancias de crecimiento para pasar a las células interiores del callo; el cultivo en medio líquido constituye una variante del invento, en particular para la obtención de 20 condiciones morfogénicas; sin embargo, el hidrolizado de caseína y la leche de coco utilizados para formar el medio líquido no permiten, debido a que son sustancias naturales, la obtención de medios rigurosamente idénticos; la forma particularmente preferida del medio nutricio sinté 25 tico según el invento es, sin embargo, la forma gelosada.

Se obtiene por cultivo in vitro, según el in
vento, una gama de variabilidad de neoformaciones muy
amplia; ésta contempla el campo de expresión de una es
tructura homocigoto. Existen todos los intermediarios
5 de formas entre los esbozos de estructura organizada y
la plántula, o sea:

- nódulos verdes que forman excrescencias;
- hojas directamente salidas del callo:

10 de textura particular, transparente, con as
pecto "confitado", de contorno irregular mal definido,
sin ejes ni nervios, bien estructurada
gruesas, de color oscuro y de forma redondea
da o muy recortada

más finas, verde tierno y de forma cónica

- 15 - brotes con hojas muy estrechas.

No es observable ninguna rizogénesis en estas
diferentes formas que están destinadas a la letalidad.

- además, se desarrollan diversos tipos de
plántulas:

20 1) en roseta, con hojas bastante anchas y de
forma redondeada,

2) con entrenudos bastante largos y brotes
axilares "breñosos" y mal formados,

25 3) que presentan fasciaciones que se conservan
durante todo el ciclo de crecimiento,

4) con hojas de tipo diferente de una planta a otra, pero también en un mismo individuo:

5 Hojas de corte irregular, con el cono petiolado, gofrados anormales. Estos órganos no aparecen más que al comienzo de la morfogénesis. A continuación, los procesos de la diferenciación se regularizan y la plántula adopta un aspecto normal.

10 Las plántulas son a continuación transplantadas, como se ha indicado anteriormente, a un medio rizogénico.

En esta etapa, una primera selección de las plántulas se realiza de modo natural.

15 Solo los individuos que se enraízan podrán ser puestos en tiestos y proseguir su ciclo. Esto muestra la importancia de la misión desempeñada por el medio rizogénico.

20 Cuando las raíces se han formado, el agarre en tierra crea una segunda barrera de contra-selección. Las plántulas salen de los tubos estériles de alto grado higrométrico, las hojas muy delgadas, así como las raíces, son muy frágiles, deben ser manipuladas con precaución y son tan sensibles a la desecación como a la putrefacción.

25 Para permitir que las plantas se desarrollen en las mejores condiciones, los tiestos son colocados en un "mini invernadero" y reciben una iluminación de 18

horas al día; en el espacio de una semana, se pasa de la atmósfera saturada al grado higrométrico exterior levantando progresivamente la cubierta del invernadero.

5 Recuentos cromosómicos efectuados sobre las plantas "Po" así obtenidas han mostrado que cada planta poseía un número normal de cromosomas, o sea $2n = 18$, idéntico al de la planta madre única de la que derivan. Este resultado muestra, por consiguiente, que no ha habido pérdida cromosómica en la célula inicial.

10 Sin embargo, se ha comprobado que las plantas Po obtenidas presentaban, tanto desde el punto de vista morfológico como en la expresión fisiológica, diferencias con relación a plantas testigos obtenidas por reproducción normal a partir de semillas de la lechuga, planta madre única. Como diferencias observadas, se pueden indicar especialmente:

- el crecimiento más rápido de las plantas Po que la de los testigos cultivados simultáneamente en las condiciones de invernadero y de laboratorio,

20 - en cada uno de los casos el "cogollo" se forma poco o nada, y a temperatura demasiado elevada, la emigración es casi inmediata,

- el desarrollo del bohordo floral,

25 - el tamaño y la altura de la planta, que son inferiores a los de los individuos cultivados normalmen

te al exterior.

Se ha comprobado, por otra parte, que había varias modalidades de desarrollo ligadas a la estación en la cual se desarrollan las plantas Po.

5 Es bien sabido que la lechuga es una planta autógama, y la autofecundación es, por consiguiente, fácil. Basta proteger el conjunto de las inflorescencias por medio de un gran saco bien cerrado. Esto evita la polinización por los insectos, y la pérdida de
10 las semillas de las primeras cabezuelas maduras.

Las semillas salidas de cada planta regenerada Po representan la generación de planta P_1 . La autofecundación de los individuos P_1 da la generación P_2 , etc. Cada una de ellas es analizada genéticamente por
15 cultivo en cajonera.

En la generación P_1 , el análisis muestra que pueden aparecer segregaciones entre ciertas familias. Una vez que se han retenido las variantes que no se de
20 ban a este nivel P_1 , no aparece segregación génica ulteriormente, y el número de cromosomas de los individuos es siempre anormal ($2n = 18$). Por otra parte, se ha comprobado, para el conjunto de las variantes, diferencias morfológicas con relación a los testigos, especialmente una disminución del peso de las plantas, un
25 aumento del número de brotes axilares desarrollados,

ligado en la mayoría de los casos al crecimiento de un gran número de hojas axilares, mientras que el número de hojas del "cogollo" parece haber sido raramente modificado. Se ha comprobado igualmente que había una
5 tendencia a la creación de un tipo de planta en que la anchura y a veces la longitud de la hoja más grande son menores que en el testigo.

Aparte de los diferentes puntos ya señalados en cultivo de tejidos, es preciso igualmente señalar la
10 presencia de fenómenos, que se corresponde a una deriva o desviación, acompañada de "memorias" y de "contagios", con relación al funcionamiento celular.

Esto conduce a pensar que zonas celulares situadas en un mismo nivel de un brote neoformado, pueden
15 tener un estado citoplásmico que les es propio, si las células que han engendrado cada uno de estos ámbitos estaban, a su vez, en un estado epigenético diferente.

Estos hechos permiten explicar la presencia de diversos tipos de hojas en una misma planta regenerada.

Además, se ha comprobado que aparecen, para
20 una misma cepa, diferentes tipos de variantes:

- a partir de callos diferentes; y
- a partir de un mismo callo.

Así, dos células de un callo dado no tienen
25 un funcionamiento idéntico, incluso cuando están próximas,

y son tanto más independientes cuanto más distantes es-
tán una de otra.

5 En el curso de la morfogénesis de las plantas
 P_1 y P_2 , se ha comprobado, por análisis del número de
hojas en diversas etapas, que el comportamiento de la
familia de variantes o de testigos no es estático. Exis-
te una evolución propia de cada familia durante todo el
ciclo de crecimiento, constituyendo cada una de ellas
un sistema que posee su propio ritmo y sus propios pará-
10 metros reguladores.

No proporcionando la autofecundación de las
variantes segregación de tipo Mendeliano, se han estudia-
do igualmente los resultados de los crecimientos recí-
procos de las variantes con los testigos y de las varian-
tes entre sí. El análisis dialéctico efectuado en los tes-
15 tigos t y en variantes de lechuga obtenidas después de
cultivo in vitro y luego autofecundación, ha mostrado
que había transmisión de un vigor, cuando se comparan
los descendientes procedentes de cruce y los que proceden
de las autofecundaciones.
20

Así, según el presente invento, se pueden obte-
ner a partir de una sola variante de lechuga y por cruce
en esta misma variedad, una planta homocigoto más vigoro-
sa, únicamente por modificación del entorno epigenético.
25 • Esta nueva planta puede ser obtenida en el espacio de tres

meses aproximadamente; esto presenta una ventaja considerable con relación a la técnica anterior, dado que hasta ahora la obtención de una planta homocigoto implicaba el cruce de una planta de una variedad considerada con otra variedad y ocho o nueve generaciones antes que la planta sea fijada, es decir, antes de obtener una planta homocigoto.

5

Como se ha indicado anteriormente, el procedimiento del invento es aplicable a plantas agronómicas, tales como el trigo, la soja, el maíz, la cebada, el colza, etc. y otras plantas hortícolas.

10

En lo que concierne al trigo, se dará a continuación la composición de un medio que conviene para el cultivo no morfogénico de los tejidos que resultan de la germinación de una planta madre única de trigo; este medio está constituido:

15

1) Por un medio de base que comprende:

- Macroelementos y microelementos de MILLER

- Vitaminas de FUJII (x 1 ó x 10)

y glicina $2 \cdot 10^{-6}$ kg/l

20

- Fe EDTA 10^{-4} M ó $0,5 \cdot 10^{-4}$ M

- Agar 1%

- Sacarosa 12%

2) Una sustancia de crecimiento que es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) (concentración: $2 \cdot 10^{-6}$ kg/l).

25

Un medio morfogénico que conviene a los fines del

invento igualmente en el caso del trigo, está constituido por el medio de base definido más arriba, en el cual el contenido en sacarosa es de 2% solamente y de una sustancia de crecimiento que es el ácido indolacético (AIA) a la concentración de 10^{-6} .

Se indicarán igualmente a continuación ejemplos de medios que convienen para el cultivo no morfogénico de los tejidos que resultan de la germinación del maíz y de la soja.

Medio no morfogénico que conviene para el maíz

a) Medio de base

Microelementos y macroelementos de MILLER definidos a continuación.

Sacarosa 30 g/l

Hierro EDTA $5 \cdot 10^{-5}$ kg/l

Vitaminas de FUJII 1 ml/l

b) Sustancias de crecimiento

2,4 D $5 \cdot 10^{-6}$ kg/l

AIA $5 \cdot 10^{-7}$ kg/l

Kinetina 10^{-7} kg/l

Según una variante particularmente ventajosa, se añaden a este medio otros ácidos aminados, tales como la serina y el inositol.

Medios no morfogénico que conviene para la soja

a) Medio de base

	Macroelementos de GAMBORG	100 ml/l
	Microelementos de GAMBORG	1 ml/l
	Fe-EDTA	10 ml/l
	Vitaminas de MOREL	2 ml/l
5	Sacarosa	20 g/l
	Agar	7 g/l

b) Sustancia de crecimiento

	2,4 D	10^{-6} kg/l
	BA	$2,10^{-7}$ kg/l
10	pH del medio 5,8	

Medios morfogénicos que convienen en el caso del maíz y de la soja pueden ser obtenidos a partir de los medios no morfogénicos citados más arriba por modificación de los contenidos en sacarosa y en sustancias de crecimiento.

Los microelementos y los macroelementos de MILLER y de GAMBORG, así como las vitaminas de FUJII, son bien conocidos del especialista. Para más detalles, se puede hacer referencia a los artículos siguientes:

20 "In vitro development of callus the pollen of Lolium and Hordeum de Clapham D. 1971. Z-Pflanzenzuchtg. 69,2 142-155 para las vitaminas de FUJII,

25 "Cellulle Induction and organ redifferenciation of Triticum Aegilops and Agropyron by anther culture" de KIMATIA y SAKAMOTO S.-1971 - Japanese Journal of Palynology.

	NH_4NO_3	1.650
	KNO_3	1.900
	$\text{CaCl}_2 (2 \text{H}_2\text{O})$	440
	$\text{MgSO}_4 (7 \text{H}_2\text{O})$	370
5	KH_2PO_4	170
	2) Microelementos	
	Sal	Peso en mg/l
	$\text{MnSO}_4 (4\text{H}_2\text{O})$	22,300
	$\text{ZnSO}_4 (7 \text{H}_2\text{O})$	8,600
10	H_3BO_3	6,200
	KI	0,830
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 (2 \text{H}_2\text{O})$	0,350
	$\text{CuSO}_4 (5 \text{H}_2\text{O})$	0,025
	$\text{CaCl}_2 (6 \text{H}_2\text{O})$	0,025
15	3) Vitaminas	
	Meso-inositol	100,00
	Pantotenato de calcio	1,00
	Acido nicotínico	1,00
	Vitamina B6--piridoxina-	1,00
20	Vitamina B1-tiamina-	1,00
	Biotina	0,01
	4) Fe-EDTA	
	Na_2EDTA	37,2 mg
	$\text{FeO}_4 (7 \text{H}_2\text{A})$	27,8 mg
25	5) Sacarosa	20 g

Agar 8 g

siendo añadidos el agar y la sacarosa después de ajuste del medio a un litro

B) Sustancia de crecimiento

5 -ANA 1 mg/l
 -Kinetina 1 mg/l

10 Con tal medio, se obtiene una proliferación celular a nivel de la cicatriz de los cotiledones y, en un mes aproximadamente, los callos son suficientemente importantes para ser transplantados. Los callos son de color verde claro, bastante compactos. La germinación de los cotiledones en la oscuridad favorece la formación de brotes una vez que los callos son cultivados a la luz.

15 EJEMPLO 2 - Ensayos comparativos con diferentes medios nutricios

En este ejemplo, se ha comparado el medio nutricional según el invento con diferentes medios nutricios, operando según el medio operativo descrito en el ejemplo 1.

20 Los medios nutricios utilizados estaban constituidos, como el medio según el invento, por un medio de base, y contenían una o dos sustancias de crecimiento. Las composiciones de los medios de base están indicadas en la tabla I siguiente:

25

TABLA I

Constitución de los diferentes medios de base

Medio nº constituyentes	I	II	III	IV
5 Macroelementos	SKOOG	SKOOG	SKOOG 1/2	HELLER
Microelementos	SKOOG	HELLER	HELLER	HELLER
Vitaminas	MOREL	MOREL	MOREL	MOREL
Hierro	Fe EDTA	Fe EDTA	Fe EDTA	Fe Cl ₃
10 Hidrolizado de caseína	/	/	/	/
Leche de coco	/	/	/	/
Sacarosa	20 g	20 g	20 g	20 g
Agar	8 g	8 g	8 g	8 g
15 pH	5,9	5,9	5,9	5,9

Los macroelementos de HELLER citados en la Tabla I están cons
tituidos por las sales minerales siguientes, cuya cantidad
utilizada está indicada a continuación:

20

Macroelemento de HELLER

Sal cantidad en mg/l

NaSO₃ 600

MgSO₄, (7 H₂O) 250

PO₄H₂Na, (H₂O) 125

25

CaCl₂, (2 H₂O) 75

KCl 750

El medio IV contenía hierro bajo la forma $\text{FeCl}_3 \cdot (6 \text{H}_2\text{O})$ a la concentración de 1 mg/l.

Cada uno de los medios de base I, II, III y IV ha sido acoplado con sustancias o un grupo de sustancias de crecimiento, a saber:

5

- El ácido alfa-naftalenacético (ANA) "A"
- El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) "D"
- El ácido furfurilamino-purina (kinetina) "K"

Siendo utilizadas las sustancias de crecimiento A, D y K solas, respectivamente, a las concentraciones de 1 mg/l y 0,5 mg/l ó acopladas de dos en dos, siendo la concentración de cada sustancia de crecimiento, respectivamente, de 1 mg/l ó 0,5 mg/l, se han estudiado, por lo tanto, en total, 48 medios diferentes, con los cuales se ha comparado la velocidad de formación de los callos, estando representado cada medio por doce tubos.

15

El material vegetal estaba constituido, para cada tubo, por el par cotiledónico de una plántula. La homocigotía de la lechuga justifica el número relativamente pequeño de repeticiones. El medio que conviene mejor para la puesta en cultivo ha sido determinado de acuerdo con el aumento de tamaño de la implantación.

20

Tres o cuatro semanas después de la siembra, los callos presentaban todos una forma aproximadamente

25

cilíndrica, de grosores comprendidos entre 1 y 2 milímetros. Sin embargo, su distribución en la superficie de la gelosa variaba considerablemente de un medio de cultivo a otro. Unicamente el volumen del callo ha sido considerado en este análisis.

5

Se ha estudiado el efecto medio sobre el desarrollo de los callos del conjunto de las sustancias de crecimiento con relación a cada uno de los medios de base utilizados, y del conjunto de los medios de base con relación a cada combinación de sustancias de crecimiento.

10

Este análisis de los medios ha sido realizado por la prueba de DUNCAN citada por RIVES M. en Ann. Amél. de las plantas, 1959, ⁹p.357-376.

15

Se ha aplicado el método de "new range test" de DUNCAN. Luego se han reagrupado los promedios por el método de SCHEFFE igualmente citado por RIVES M. en la revista citada.

20

Estas pruebas consisten en comparar la diferencia "D observada" calculada entre los promedios tomados de dos en dos, con cada término "D teórico":

$$D_{th} = t(n_r, k, \alpha) \cdot \frac{s_r^2}{e \cdot b}$$

25

D_{th} = valor teórico calculado

$t(n_r, k, \alpha) =$ valor leído en la tabla "Studentized range t_m "

en el umbral α , n_r grados de libertad; representando k el número de promedios que separan los dos promedios considerados

5

$s_r^2 =$ cuadrado medio residual o variancia residual

$c \cdot b =$ efectivo de cada bloque X número de bloques = número de los representantes utilizados en el cálculo de cada promedio

10

a) Análisis medio para cada uno de los medios de base

Según este método, se ha encontrado que, por término medio, el medio II era menos eficaz, mientras que los otros medios parecen sensiblemente equivalentes.

15

Medios	I	II	III	IV
Promedios según Duncan	10,43	8,75	10,72	10,57

20

b) Análisis medio para las diferentes combinaciones de sustancias de crecimiento

Los resultados obtenidos según el método descrito más arriba son los siguientes:

25

	Sustancias de crecimiento	K - D		A - D		A - K	
	Concentración en g/l	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-3}	5×10^{-4}
5	Promedio según la prueba de DUNCAN	6,72	7,79	8,35	9,43	9,20	11,58
	Sustancias de crecimiento	A		K		D	
	Concentración en g/l	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-3}	5×10^{-4}
10	Promedio según la prueba de DUNCAN	11,52	11,33	14,70	11,91	8,45	10,37

En la tabla anterior, así como en el ejemplo de la descripción, las concentraciones indicadas para los pares de sustancias de crecimiento A-D, A-K, y K-D son las concentraciones de cada sustancia.

Los resultados anteriores indican que, por término medio, la kinetina y el A.N.A. utilizados a las concentraciones de este experimento, así como el par "A.N.A. - kinetina" a la dosis menor, son buenos inductores de crecimiento; mientras que la sustancia D (2-4 D) utilizada sola o en presencia de A.N.A. o de kinetina, lo mismo que el par "A.N.A.-kinetina" a fuerte dosis, parece impedir el desarrollo de la cepa.

Para cada uno de los cuatro medios de base, ha sido efectuado igualmente un estudio comparativo por la prueba de DUNCAN de

crita más arriba, de los valores medios de desarrollo en función de cada combinación de sustancias de crecimiento; los resultados consignados en la tabla II que sigue, indican que el mejor inductor de crecimiento es la kinetina utilizada a la concentración 10^{-3} g/l ó $5 \cdot 10^{-4}$ g/l según el medio de base, siendo obtenido el desarrollo más importante sobre el medio III.

El A.N.A. tiene sobre el crecimiento una eficacia próxima a la de la kinetina cuando se emplea con el medio I, o a pequeña dosis con los medios III y IV.

Hay que señalar que el par "ANA - KINETINA" utilizado en pequeña dosis no da lugar a un desarrollo muy importante, pero este emparejamiento favorece una constancia de respuesta sobre los cuatro medios de base.

Se ha observado igualmente el aspecto histológico; después de un tratamiento apropiado, se han coloreado sucesivamente los cortes por la hematoxilina, el azul alcian, y luego la eosina.

Los cortes seriados en los callos blandos que presentaban puntos verdes compactos, han mostrado que la consistencia y el color del callo estaban ligados al tipo de organización celular que lo componía; así, las partículas blandas y beige estaban constituidas por un conjunto de células de volumen variable, frecuentemente grande, y dispuesto de manera anárquica. Las paredes celulares

que parecían poco rígidas eran de color azul alcian, mientras que el contenido celular ha sido destruido.

5 Por otra parte, los puntos verdes compactos estaban mejor estructurados. Las células pequeñas y regulares tenían un citoplasma de aspecto meristemático, muy coloreado de rosa por la eosina. Aparecían vasos entremezclados, hilos celulares, células dispuestas en semicírculo alrededor de uno o varios vasos, grupos celulares organizados en glóbulos regulares con aspecto de embrioides y también, en la superficie del callo, formaciones más evolucionadas de ápice, de raíces, de brotes o de hojas que comenzaban a desarrollarse.

10 Una primera observación a las tres o cuatro semanas, ha mostrado que sobre el medio IV, así como sobre los medios que contienen 2-4 D, había formación de callos blandos, que ofrecían formaciones duras clorofílicas de tamaño reducido poco frecuentes o nulas.

15 Dejando aparte estos medios, así como los medios I con adición de kinetina y III que contienen ANA en fuerte dosis, se ha comprobado que las formaciones clorofílicas estaban presentes de manera homogénea. Se ha comprobado igualmente que la intensidad de coloración variaba con el medio de cultivo; la más viva y compacta se ha obtenido sobre los medios I y II, que contienen el par ANA-kinetina a la concentración de 5×10^{-4} g/l.

25

Se ha observado después, a las seis semanas aproximadamente, que los medios proporcionaban formaciones clorofólicas, es decir, los medios II y III que contienen las sustancias de crecimiento ANA, kinetina, y ANA-kinetina, respectivamente, a las concentraciones de 10^{-3} y 5×10^{-4} g/l.

5
10

15

20

25

TABLA II

Análisis de los promedios por la prueba de Duncan

Sustancias de crecimiento concentracion g/l medio	A		K		D		A-K.		A-D		K-D	
	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$
I	13,66	12,16	14,83	11,00	10,16	11,58	9,00	10,50	8,41	8,41	7,50	8,00
II	9,36	8,70	12,41	10,50	6,58	8,35	8,41	10,25	7,75	9,66	7,58	5,25
III	14,00	11,66	17,91	12,41	9,66	10,91	9,40	12,00	7,90	9,58	7,00	6,25
IV	9,08	12,81	$13,60^6$	13,75	7,41	10,66	10,00	13,58	9,33	10,08	7,41	7,41

La tabla III que sigue, esquematiza los resultados de las notaciones para los medios que proporcionan formaciones clorofílicas. Cualquiera que sea el medio de base, se ha comprobado que el ANA inducía la formación de raíces y que la kinetina provocaba una proliferación blanda de color verde claro, muy raramente caulógena.

Por el contrario, se ha comprobado que la asociación "ANA+kinetina", en función del medio de base y de la concentración de estas sustancias, estaba estrechamente ligado al desarrollo de hojas de aspecto normal o aberrante, a veces directamente salidas del callo, y también a la formación de brotes o de plántulas, permaneciendo, sin embargo el tamaño de los callos, relativamente pequeño.

Las fuertes dosis de ANA y de kinetina parecían impedir el desarrollo de los brotes después de su iniciación, mientras que a la concentración de 5×10^{-4} g/l, las plántulas crecían bien y parecían viables de aspecto.

Así, según los resultados precedentes, la kinetina es una sustancia de crecimiento que permite el desarrollo rápido de callos, sin que exista caulogénesis, mientras que el par ANA-kinetina induce la formación de brotes y el ANA induce la formación de raíces; por otra parte, los medios de base I y II son los más apropiados.

EJEMPLO 3: Transplante de los callos primarios

Los callos primarios de la variedad Averya E 27 obtenidos en el ejemplo 2 sobre los medios I, II y III en presencia de sustancias de crecimiento A, K ó de su mezcla, han sido transplantados, respectivamente, en el mismo medio de base con adición de las mismas sustancias de crecimiento que en los medios de comienzo utilizados en el ejemplo 2, pero estos últimos han sido utilizados a las concentraciones indicadas a continuación.

10

Sustancias de crecimiento	A		K		A-K	
Concentración para el comienzo de los callos en g/l	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}
Concentración en el primer trasplante en g/l	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$

15

20

Las observaciones al cabo de una semana, y luego a las seis semanas después del trasplante, están esquematizadas en las tablas IV y V siguientes, en las cuales las coloraciones de los callos y los tipos de diferenciación son idénticos a los dados para la tabla III que sigue.

25

Los fenómenos de caulogénesis, proliferación o regeneración de raíces, inducidos por el medio precedente,

han sido conservados.

Sin embargo, ciertas cepas, después del dese
quilibrio inducido por la transferencia, no han tenido
éxito en readaptar su funcionamiento y se produce su
5 necrosis más o menos rápida.

Es así que:

1)- la cepa sobre medio III que contiene la
sustancia de crecimiento a la concentración de $5 \cdot 10^{-4}$
g/l ha muerto a partir de la primera semana después del
10 trasplante

2)- las cepas sobre los medios I y II que con
tienen las sustancias de crecimiento K a la concentración
de 10^{-4} g/l, presentaban varios callos oscuros y en ne-
crosis cerca de la sexta semana, mientras que los otros
15 callos se han desarrollado cambiando progresivamente de
coloración, y se estabilizan, lo que se puede comprobar
comparando las tablas III, IV y V.

Los callos que estaban verdes en su mayor parte,
pasan a tomar con frecuencia un color beige, sean morfo-
20 génicos o no, salvo para los medios I y II que contienen
la sustancia K a la concentración de $5 \cdot 10^{-4}$ g/l.

Las plántulas mejor desarrolladas se obtienen
con el medio I que contiene A-K (10^{-4} g/l) y el medio II
que contiene A-K ($5 \cdot 10^{-4}$ g/l), pero la frecuencia de rege
25 neración mayor ha sido dada por los medios I y II que con

tienen la mezcla A-K a la concentración de $5 \cdot 10^{-4}$ g/l.

Por lo demás, solo I y II que contienen la sustancia K a razón de 10^{-4} g/l; convien para el desarrollo homogéneo de callos no regenerantes.

5

EJEMPLO 4

Cultivo en medio líquido

Los callos primarios obtenidos según los ejemplos 1 ó 2, a partir de las variedades Val de cebada y Averya E 27, han servido para sembrar un medio líquido. Para esto, se han utilizado erlones de cuello ancho de 250 ml en los cuales se han puesto 30 ml de medio de cultivo. Una agitación a razón de cien rotaciones por minuto ha mantenido los grupos celulares disociados. El medio nutricio líquido utilizado tenía la misma composición que el medio II utilizado en los ejemplos 2 y 3 con la excepción de que el agar ha sido suprimido y sustituido por 20 g de hidrolizado de caseína y 100 g de leche de coco.

10

15

Un mes después de la puesta en cultivo, se ha comprobado que los callos se habían divididos y que los cúmulos celulares proliferaban activamente, constituyendo un cultivo espeso de color amarillo, amarillo ocre o verde claro según los callos.

20

Se ha comprobado que la multiplicación celular en medio líquido agitado era más rápida que la efectuada

en medio gelosado.

EJEMPLO 5

Rizogénesis de las plántulas regeneradas

5 En este ejemplo, se ha comparado la acción de las sustancias ANA y AIB sobre la rizogénesis de plántulas procedentes de la cepa Averya E 27 cultivada sobre el medio de base I que contiene el par A-K como sustancia de crecimiento a la concentración de $5 \cdot 10^{-4}$ g/l.

10 El medio rizogénico estaba constituido, por una parte, por el medio de la base I definido anteriormente (ejemplo 1), por 30 g de sacarosa por litro de medio y 6 g de agar y contenía, por otra parte, el ANA o el AIB a las concentraciones indicadas en la tabla VI
15 siguiente, en la cual están recogidos los resultados obtenidos después de tres semanas sobre uno de los medios rizogénicos citados.

20 La sustancia de crecimiento B es activa a dosis menores que la sustancia A y la formación de raíces normales, sobre todas las plántulas, no es observable más que a las concentraciones de 20 y 30 μ g.

25 La sustancia B utilizada a las dosis indicadas más arriba permite, por consiguiente, obtener una rizogénesis más rápida y sobre un mayor número de plántulas.

EJEMPLO 6

Desarrollo en condiciones no estériles - cultivo en tiestos

Las plántulas colocadas en tiestos en este ejemplo han sido tomadas de las cepas Val de cebada y Aveyra E 27, cuyos callos cultivados según el invento han sido puestos en condiciones no morfogénicas durante una decena de trasplantes sucesivos y luego inducidos a regenerarse.

5

10

15

20

25

TABLA VI

Número de plantas enriazadas/número de plantas probadas
Observación a las tres semanas

5	t°C Sub.Cce		Pieza de cultivo 23°C		Estufa 15°C		Total	
	Tipo de raíces		N	E	N	E	N	E
	Testigo		1/6		1/6		2/12	
10	Sustancia de crecimiento	Concen- tración en ug/l						
	A	10		3/5	7/7		7/12	5/12
	B	10		5/5	4/7		4/12	5/12
15	A	20		1/6	0/6		1/12	
	B	20	5/6		5/6		10/12	
	A	30	2/6		6/6		8/12	
	B	30	5/6		5/7		10/13	
20	A	40	2/6	1/6	3/6		5/12	1/12
	B	40	1/6	3/6	3/6		4/12	3/12
	A	50		4/6		3/6		7/12
25	B	50	3/6		3/6		6/12	
	A	60	2/6	2/6	0/6		2/12	2/12
	B	60	2/5	1/5	3/6		5/11	1/11

N = raíces normales

E = raíces gruesas

A = ANA

B = AIB

Los tiestos han sido colocados, en primer lugar, en un mini-invernadero con 18 horas de iluminación; en una semana aproximadamente se ha pasado de la atmósfera saturada del invernadero al grado higrométrico exterior levantando progresivamente la cubierta del invernadero.

Una vez que las plantas han resultado bastante vigorosas, se han efectuado los recuentos cromosómicos después de la fijación y coloración según un procedimiento clásico conocido por el especialista. Cada planta Po ha mostrado un número normal de cromosomas $2n = 18$.

Se ha observado que el crecimiento de las plantas Po en las condiciones de invernadero o de laboratorio era más rápido que el de los testigos cultivados simultáneamente. En cada uno de los casos, el "cogollo" se ha formado poco o no se ha formado y, en condición de temperatura demasiado elevada, la emigración ha sido casi inmediata. El bohordo floral se ha desarrollado. El tamaño y la altura total de la planta eran inferiores a los de los individuos cultivados normalmente en el exterior.

Así, en las plantas Po de la variedad Val de cebada, se han comprobado tres modalidades de desarrollo ligadas a un periodo fresco, más o menos largo, relativo a las diferentes estaciones; se indican a continuación estas modalidades de desarrollo observadas:

1- Morfogénesis comparable a la del testigo

La floración ha sido inducida después de formación de un comienzo de cogollo. La autofecundación, asegurada por un saquito, ha dado una cosecha conveniente de 200 semillas maduras aproximadamente.

5 2- Plantas inducidas a florecer en el momento de la rizogénesis

10 A pesar del tamaño reducido de las hojas, el bohordo floral se ha desarrollado y se ha producido una recuperación de vigor paralelamente al crecimiento. La floración menos importante que la de los testigos ha dado un número apreciable de semillas fértiles, al mismo tiempo que de semillas estériles.

15 3 - Plantas inducidas demasiado pronto a la floración, como las precedentes, pero cuyo vigor permanece reducido

20 En este caso, el número reducido de las inflorescencias ha ido acompañado de una esterilidad prácticamente total de las cabezuelas, y las semillas permanecen inmaduras o germinan en la cabezuela antes de la desecación del porta-semillas.

25 La cosecha de las semillas procedentes de las plantas Po ha tenido lugar después de la desecación del porta-semillas. Los resultados observados están consignados en la tabla VII siguiente.

TABLA VII
Cosecha de las semillas

5	Po, nº de planta	Número de cabezuelas	Número de semillas			Semillas fértiles	
			Fértiles	Estériles	Total	No. medio por inflo- rescencia	Índice
	25	12	59	(65 (5 gm	129	4,91	0,45
10	27	13	48	152	200	3,69	0,24
	24	18	57	157	214	8,72	0,36
	26	20	94	(112 27gm	233	4,70	0,40
	28	29	177	(14 (19gm	210	9,31	0,84
15	4	40	118	198	316	2,95	0,37
	9+11	46	214	441	655	4,60	0,32
	22	46	24	421	445	0,52	0,053
	19	152	6	890	896	0,03	0,006
20	t2	10	262	-	-	6,55	# 1,00
	t4	11	355	-	-	8,65	# 1,00

25

25.6.75

gm: germinadas en la cabezuela

"9" y "11" corresponden a la cosecha "precoz" y "tardía" de una misma planta.

5 Para esta muestra de individuos, las plantas regeneradas son significativamente menos fértiles que los testigos. Hay que señalar, además, la variabilidad del número de cabezuelas en las diferentes plantas cultivadas en condiciones análogas. Este conjunto de resultados muestra la presencia de una respuesta diferente al entorno, a la vez para las plantas regeneradas Po y frente a los testigos.

10 Además, la esterilidad más o menos fuerte debida, por una parte, a la falta de vigor de la planta y, por otra parte, a la necesidad de una fuerte iluminación, muestra la importancia energética exigida en esta etapa para la realización de la floración y la maduración de las semillas.

15 Las semillas procedentes de cada planta regenerada Po representan la regeneración de plantas P_1 : la autofecundación de los individuos P_1 ha dado la generación P_2 . Las generaciones P_1 a P_4 han sido estudiadas y las observaciones anotadas han sido tratadas estadísticamente según el método citado por DAGNELLE P. / Teoría y métodos estadísticos (2 vol.) Presses Agronomiques de Gembloux

20 Ed. J. Duculot - 1970 /, especialmente por análisis de la

25

5 variancia con dos criterios de clasificación con repetición, modelo cruzado y muestra de igual efectivo, por la prueba de SNEDECOR citada por Dagnélie y por el método del "new range test" de DUNCAN citado anteriormente.

10 Se ha comprobado en la generación P_1 que una familia de plantas tenía pocos cogollos con relación a la planta testigo; las hojas estaban dispuestas en "roseta", eran mates, de aspecto aterciopelado, poco cortadas; no estaban ni gofradas, ni avejigadas, lo que da al conjunto del vegetal la apariencia de estar "aplanado" (a).

15 En la generación P_2 se han observado de nuevo descendencias homogéneas variantes por comparación con el testigo.

20 Además, se ha comprobado la aparición de familias cuya coloración era particular y no segregaba en el conjunto de las plantas analizadas. Se han observado especialmente plantas que presentan hojas centrales muy claras y nervios verde oscuro (c) y otras de un tono homogéneo más pálido y dorado que el testigo y que se han denominado "rubias" (b).

25 Se han observado igualmente diferencias entre los testigos y las plantas P_1 en lo que concierne al número de hojas del cogollo, el peso de la materia ver

de, el número de hojas de los brotes axilares desarrollados, el número de brotes axilares desarrollados, la longitud y la anchura de la hoja más ancha.

5 Las particularidades observadas para las plantas (a),(b), (c) en la generación P_2 presentaban las mismas características en la generación P_3 procedente de la autofecundación de uno de los representantes tomados al azar en cada familia.

10 Las familias P_3 anotadas a, b, c así como el testigo t cuyos fenotipos son muy distintos, han sido elegidas para estudiar la transmisión de su carácter en cruce según la técnica de hibridación.

15 El análisis dialélico ha mostrado que el pariente "a" posee el carácter "hoja aplanada" y que lo transmitía preferentemente por vía materna. Diferentes niveles de expresión de este carácter se han manifestado en función del compañero elegido; se puede considerar que todo sucede como si hubiera una "aceptación" más o menos buena del citoplasma del pariente "a" por los diferentes
20 granos de polen.

Por análisis de la superficie foliar, se ha comprobado que cada pariente, aunque cruzado con un genotipo, isógono, transmite por cruce un "vigor" tanto por vía paterna como materna y cualquiera que sea el compañero considerado.
25

Un análisis detallado ha mostrado sin embargo que la intensidad de este efecto muy particular " de vi gor" es muy específico de los compañeros y del sentido de cruce. Se subrayará que la característica esencial y ventajosa del invento es que se obtiene por cruce sobre una planta homocigótica plantas más vigorosas.

EJEMPLO 7

1) Cultivo de tejidos in vitro

En este ejemplo se han puesto en cultivo in vi- tro los tejidos que resultan de la germinación de semilla de una planta madre única de trigo, variedad César.

El medio de cultivo utilizado tenía la composi ción siguiente

A) med. de base

- microelementos y macroelementos de MILLER
- Vitaminas de FUJII (x1)
- glicina $2 \cdot 10^{-6}$ kg/l
- Fe EDTA 10^{-4} M
- Agar 1%
- Sacarosa 12%

B) Sustancia de crecimiento

2,4 D $2 \cdot 10^{-6}$ kg/l

Con tal medio se ha obtenido una prolifera ción celular y en un mes aproximadamente, los callos eran suficientemente importantes para ser trasplantados.

2) morfogénesis de los callos

Los callos obtenidos anteriormente han sido colocados en el medio morfogénico constituido por el medio de base citado, pero con un contenido en sacarosa de 2% y por ácido indolacético (10^{-6}) como sustancia de crecimiento, estando suprimido el 2,4 D.

3) Colocación en tiestos

Se han puesto las plantas en tiestos, manteniéndolas en primer lugar en las condiciones de entorno utilizadas en la fase de cultivo morfogénico y poniéndolas progresivamente en las condiciones normales (cultivo en el exterior).








Entre las plantas puestas en tiestos, cierto número mostraban características de variantes, especialmente al nivel del vigor y del rendimiento.


Es bien evidente que se pueden introducir modificaciones al alcance del especialista en el procedimiento según el invento, sin salir por ello del marco de éste.

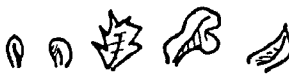
TABLA III

Coloración de los callos:

Tipo de diferenciación

	Verde intenso
	Verde claro
	Verde opalescente
	Amarillo
	Beige
	Ocre
	Necrosado




















Nódulos, raíces o pelos absorbentes


Hojas anormales o "foliolos"


Plantas neoformadas con hojas grandes o "filiformes"

Observación al cabo de 6 semanas

CALLOS PRIMARIOS - AVERYA E 27

Medio de sus tancias base de crecimiento g/l	I	II	III
A 5 10 ⁻⁴			
A 10 ⁻³			
K 5 10 ⁻⁴			
K 10 ⁻³			
A-K 5 10 ⁻⁴			
A-K 10 ⁻³			

Observación
al cabo de
una semana

TABLA IV
PRIMER TRASPLANTE - AVERYA E 27

Medio Sus- tancia base de creci- miento g/l	I	II	III
A 10 ⁻⁴			
5 10 ⁻⁴			
K 10 ⁻⁴			
5 10 ⁻⁴			Necrosado
AK 10 ⁻⁴			
5 10 ⁻⁴			

Observación al
cabo de 6 semanas

TABLA V

Medio Sus- tancia base de creci- miento g/l	I	II	III
A 10 ⁻⁴			
5 10 ⁻⁴			
K 10 ⁻⁴	Necrosado	Comienzo de necrosis	 Necrosado
5 10 ⁻⁴	Trasplante nº 2		Necrosado
AK 10 ⁻⁴			
5 10 ⁻⁴			

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Francia, el 20 de Junio de 1974, bajo el Nº 7421.535, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

- REIVINDICACIONES -

10

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15

20

25

1ª.- Procedimiento para la obtención de variantes de plantas que presentan características mejoradas, caracterizado porque comprende las etapas siguientes: colocar y cultivar, en un medio nutritivo sintético no morfogénico, los tejidos que resultan de la germinación de granos de una planta madre única, estando constituido dicho medio de cultivo, por una parte, por un medio de base formado de sales minerales, vitaminas, hierro y sacarosa y, por otra parte, por sustancias de crecimiento en cantidad suficiente para asegurar la formación de callos; transplantar los callos así formados a un medio morfogénico constituido por el medio de base citado, cuyo contenido en sacarosa es diferente, y por sustancias de crecimiento; poner las plantas así obtenidas en tiestos.

30

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la planta madre única es una planta

agronómica elegida entre el trigo, la soja, la colza, la cebada y el maíz.

5 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la planta madre única es una planta hortícola elegida entre las lechugas, las judías y los guisantes.

10 4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque las semillas son germinadas en condiciones estériles y el cultivo en dichos medios se realiza en condiciones estériles.

5ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la germinación tiene lugar a una temperatura comprendida entre 20 y 23°C.

15 6ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la germinación tiene lugar en la oscuridad o a la luz del día con aproximadamente 8 a 12 horas de iluminación.

20 7ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el medio de base contiene el hierro en la forma de quelato.

8ª.- Procedimiento según la reivindicación 7ª, caracterizado porque el agente formador de quelato es el ácido etileno-diamina-tetracético.

25 9ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el cultivo en dicho medio nutritivo

sintético se realiza a una temperatura comprendida entre aproximadamente 18 y 23°C con duraciones de iluminación de 0 a 18 h.

5 10ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque dicho medio nutritivo contiene además una sustancia gelificante, tal como el agar.

11ª.- Procedimiento según la reivindicación 10ª, caracterizado porque el pH de dicho medio está comprendido entre 5,7 y 6,5.

10 12ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque los callos son mantenidos en condiciones no morfogénicas durante un mínimo de 2 a 3 trasplantes sucesivos antes del trasplante al medio morfogénico.

13 13ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el pH del medio morfogénico está comprendido entre 5,7 y 6,5.

20 14ª.- Procedimiento para la obtención de plantas que presentan características mejoradas, caracterizado porque consiste en: plantar y cultivar, en un medio nutritivo sintético o no morfogénico, los tejidos que resultan de la germinación de semillas de una planta madre única, estando constituido dicho medio de cultivo, por una parte, por un medio de base formado por sales minerales, vitaminas, hierro, sacarosa y, por

25

otra parte, por sustancias de crecimiento en cantidad suficiente para asegurar la formación de callos; tras plantar los callos así formados a un medio morfogénico constituido por el medio de base mencionado cuyo contenido en sacarosa es diferente, y sustancias de crecimiento; poner las plantas así obtenidas en tiestos; multiplicar las plantas así obtenidas por vía sexuada.

5
10
15
15ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la planta madre única es la lechuga y porque las sales minerales contenidas en dicho medio de base están constituidas por macroelementos y microelementos, siendo los macroelementos los nitratos de potasio y de amonio, el sulfato de magnesio, el cloruro de calcio y el fosfato monopotásico, siendo elegidos los microelementos entre los sulfatos de manganeso, de cinc, y de cobre, el yoduro de potasio, el ácido bórico, el cloruro de calcio, el óxido doble de molibdeno y de sodio, el cloruro de aluminio y el cloruro de níquel.

20
16ª.- Procedimiento según la reivindicación 15ª, caracterizado porque las sales minerales son los macroelementos y los microelementos de MURASHIGE ET SKOOG.

25
17ª.- Procedimiento según la reivindicación 15ª, caracterizado porque las sales minerales son los macroelementos de MURASHIGE ET SKOOG y los microelementos de HELLER.

18a.- Procedimiento según la reivindicación 15a, caracterizado porque el hierro contenido en el medio de base es quelatado por el ácido etilendiaminotetraacético y porque la cantidad de hierro quelatada expresada en hierro es de aproximadamente 5,6 mg/l.

19a.- Procedimiento según la reivindicación 15a, caracterizado porque las sustancias de crecimiento se eligen entre el ácido alfa-naftalénacético y la 6-furfurilamino-purina, y porque la concentración de cada sustancia de crecimiento presente en dicho medio nutritivo es inferior o igual a aproximadamente 1 mg/l de medio nutritivo

20a.- Procedimiento según la reivindicación 1a, caracterizado porque la planta madre única es la lechuga y porque los callos obtenidos en la primera etapa del procedimiento son trasplantados a un primer medio morfogénico que contiene una sustancia de crecimiento que induce la formación de plántulas y porque las plántulas formadas son trasplantadas a continuación a un segundo medio morfogénico que contiene una sustancia de crecimiento que induce la formación de las raíces, llamado medio rizogénico.

21a.- Procedimiento según la reivindicación 20a, caracterizado porque dicho medio rizogénico está formado por el medio de base tal como se ha definido en

la reivindicación 1ª, de sacarosa a razón de aproximadamente 20 a 35 g, especialmente 30 g por litro, y por una sustancia de crecimiento elegida entre el ácido alfa-naftalénacético y el ácido alfa-indolbutírico.

5

22ª.- Procedimiento según la reivindicación 20ª, caracterizado porque el cultivo en medio rizogénico se realiza a una temperatura comprendida entre aproximadamente 5 y 20°C, especialmente 15°C, durante aproximadamente 7 a 21 días con aproximadamente 8 horas de iluminación.

10

23ª.- Procedimiento según la reivindicación 15ª, caracterizado porque dicho medio nutritivo en un medio líquido que contiene, además, hidrolizado de caseína y leche de coco, estando comprendido el pH del medio líquido entre 5,5 y 6,5.

15

24ª.- Procedimiento según la reivindicación 21ª, caracterizado porque la concentración en sustancia de crecimiento en dicho medio rizogénico es inferior a 0,1 mg/l.

20

25ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la planta madre única es el trigo y porque el medio de base está constituido por los macroelementos y microelementos de MILLER, vitaminas de FUJII, glicina, hierro quelatado por el ácido etiléntia minotetraacético, agar, sacarosa, y porque la sustancia

25

de crecimiento es el ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético.

26ª.- Procedimiento según la reivindicación 25ª, caracterizado porque el medio morfológico está constituido por el medio de base según la reivindicación 25ª con un contenido inferior en sacarosa y porque la sustancia de crecimiento es el ácido alfa-indolacético.

27ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la planta madre única es la soja y porque el medio nutricio sintético está constituido por

a) Medio de base

Macroelementos de GAMBORG	100 ml/l
Microelementos de GAMBORG	1 ml/l
Fe-EDTA	10 ml/l
Vitaminas de MORELL	2 ml/l
Sacarosa	20 g/l
Agar	1 g/l

b) Sustancia de crecimiento

2,4 D	10^{-6} kg/l
BA	$2 \cdot 10^{-7}$ kg/l
PH del medio	5,8

28ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la planta madre única es un F₁ de descendencia homocigótica de los híbridos de maíz

y porque el medio nutricio sintético está constituido:

a) Por un medio de base que contiene los microelementos y macroelementos de MILLER,

Sacarosa	30 g/l
Hierro EDTA	$5 \cdot 10^{-5}$ kg/l
Vitaminas de FUJII	1 ml/l

y b) por sustancias de crecimiento

2,4 D	$5 \cdot 10^{-6}$ kg/l
AIA	$5 \cdot 10^{-7}$ kg/l
Kinetina	10^{-7} kg/l.

29ª.- PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE VARIANTES DE PLANTAS QUE PRESENTAN CARACTERISTICAS MEJORADAS.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representando en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

Esta memoria consta de sesenta y ocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid 29 SET. 1975

P.A.

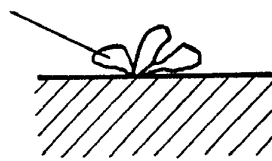
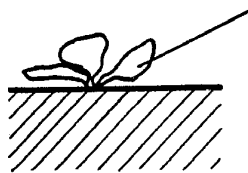
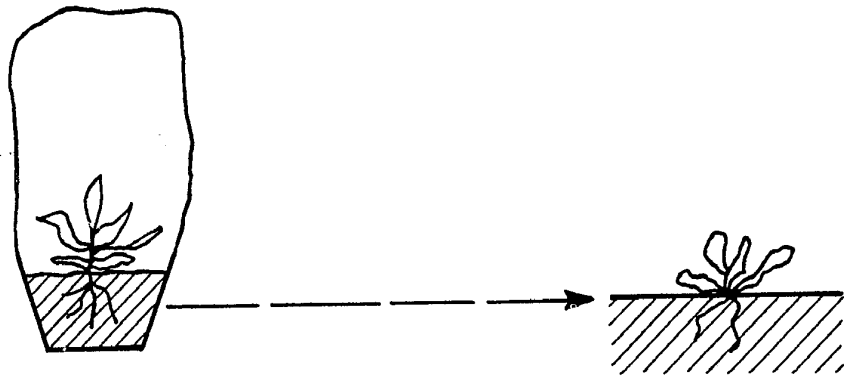
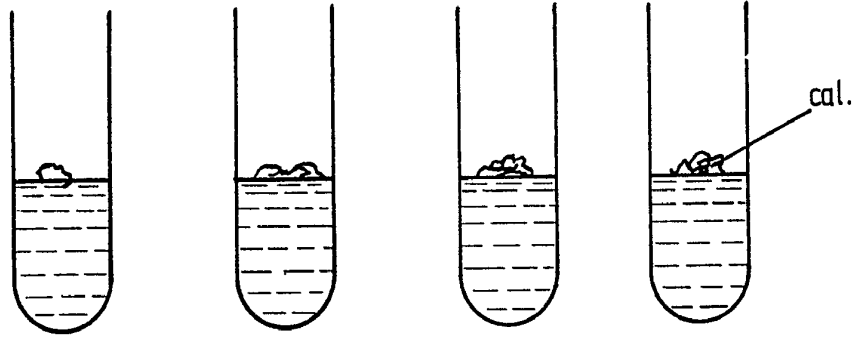
Fernando de Elizaburu
Por Poder.

25.6.75

R.R.R.

- 68 -

FIG.1



Amr