

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 780**

51 Int. Cl.:

**A01H 5/10** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2008 E 08848502 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2217055**

54 Título: **Plantas de ricino poliploides, composiciones derivadas de las mismas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**06.11.2007 US 996214 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.09.2015**

73 Titular/es:

**KAIIMA BIO AGRITECH LTD. (100.0%)  
10 HARIMONIM STREET P.O. BOX 508  
15241 KFAR-TAVOR, IL**

72 Inventor/es:

**AVIDOV, AMIT y  
LERNER, ALON**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 545 780 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Plantas de ricino poliploides, composiciones derivadas de las mismas y usos de las mismas

### 5 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a plantas de ricino tetraploides como se define por las reivindicaciones y usos de las mismas.

10 El ricino (*Ricinus communis* L.) es un cultivo importante de la familia *Euphorbiaceae*. Es una especie monotípica del género *Ricinus* y tiene un valor económico considerable debido a sus semillas ricas en aceite, que producen aceite de ricino, un aceite estratégicamente importante con numerosos usos industriales. Su origen está en el Mediterráneo suroccidental y África occidental, pero es común ahora en muchas partes del planeta.

15 La semilla de ricino contiene hasta 40-50 % de aceite de combustión única. Químicamente, el ricino es un triglicérido (éster) de ácidos grasos. Hasta el 90 % del contenido de ácidos grasos del aceite es ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxioléico), un ácido de 18 carbonos que tiene un doble enlace en la posición 9-10 y un grupo hidroxilo en el 12º carbono. El color del aceite de ricino varía de incoloro a amarillento o verdoso. Las características adicionales incluyen viscosidad relativamente alta, no secante, olor suave pero característico, sabor ligeramente acre y un sabor  
20 de regusto.

Pueden producirse muchos derivados que tienen una composición química similar a aceites basados en petróleo. El aceite de ricino cocido es un derivado que tiene una mayor viscosidad y gravedad específica en comparación con el aceite de ricino natural. Estas propiedades se inducen burbujeando aire a través de él a temperaturas elevadas. Su  
25 uso principal es como un plastificante para tintas, lacas, y adhesivos. El aceite de ricino hidrogenado (HCO) o cera de ricino es una cera dura, frágil que es insoluble. Se produce añadiendo hidrógeno en presencia de un catalizador de níquel. Se usa principalmente para recubrimientos y grasas cuando se requiera resistencia a humedad, aceites y otros productos petroquímicos.

30 Como resultado, el aceite de ricino y productos derivados del mismo se usan para numerosos productos industriales, incluyendo lubricantes de base biológica, combustible, pinturas y recubrimientos, plásticos, compuestos antifúngicos y cosméticos. El mercado global para aceite de ricino es de aproximadamente 750 millones de dólares al año.

35 Un problema en años recientes ha sido la inestabilidad en el abastecimiento de aceite de ricino. Los proveedores principales, India, China y Brasil, han experimentado problemas de producción en años recientes.

El aceite de ricino es una materia prima candidata para la industria emergente de los biocombustibles, pero es en la actualidad demasiado caro para competir con el gasóleo basado en petróleo. Producciones crecientes de ricino en todo el mundo puede hacer al biocombustible de ricino más competitivo en el futuro.

40 Se han producido autotetraploides usando colchicina, además se han presentado haploides, pero en la naturaleza, el ricino se encuentra principalmente en la forma diploide (Moshkin y Doryadinka, 1986).

### SUMARIO DE LA INVENCIÓN

45 La presente invención se define por las reivindicaciones.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una planta de ricino tetraploide como se define en las reivindicaciones que es al menos tan fértil como una planta de ricino diploide  
50 isogénica para la planta de ricino poliploide cuando se cultiva en condiciones similares.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la fertilidad se determina por al menos uno de:

55 número de semillas por planta;  
ensayo de fertilidad de gametos; y  
tinción de polen con acetocarmín.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la planta muestra estabilidad genómica durante al menos 5  
60 pases.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la planta tiene una producción de semillas al menos similar a las de la planta de ricino diploide.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la planta tiene un área de superficie mayor de una hoja que la  
65 de la planta de ricino diploide.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la planta tiene mayor superficie de estomas que la de la planta de ricino diploide.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la planta tiene una producción de aceite al menos similar a la de la planta de ricino diploide.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la planta es que puede cruzarse con una planta diploide.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la planta es endogámica.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una planta de ricino como se deposita según el tratado de Budapest en NCIMB Ltd. y que tiene el número de referencia NCIMB 41593 *Ricinus communis* B2-20-4N.

15 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una parte de planta de la planta de ricino como se define en las reivindicaciones.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una torta de ricino producida a partir de las semillas.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención la parte de planta es una semilla.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona el uso de semillas para producir aceite de ricino.

25 También se describe en el presente documento un método para generar una semilla de ricino poliploide, comprendiendo el método poner en contacto la semilla de ricino con un inhibidor del ciclo celular G2/M bajo un campo magnético generando de este modo la semilla de ricino poliploide.

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención el inhibidor del ciclo celular G2/M comprende un inhibidor de polimerización de microtúbulos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención el inhibidor de polimerización de microtúbulos se selecciona del grupo que consiste en colchicina, nocodazol, orizalina, trifluralina y sulfato de vinblastina.

35 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tiene el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de realizaciones de la invención, se describen posteriormente métodos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones, tendrá prevalencia.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, solamente como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. En referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se subraya que los detalles mostrados son como ejemplo y para fines de análisis ilustrativo de realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la materia cómo pueden practicarse realizaciones de la invención.

50 En los dibujos:

La figura 1 es una imagen de una planta de ricino poliploide generada de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención;

55 Las figuras 2A-B son imágenes de un sistema de control de fotosíntesis usado para evaluar la eficacia de la fotosíntesis de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

Las figuras 3A-B son imágenes que muestran una planta de ricino diploide (3A) y una planta de ricino tetraploide (3B). Las cámaras de hojas (LC) se proporcionan como una referencia para el tamaño de las hojas. Obsérvese que las hojas de la planta diploide eran muchos más pequeñas que las hojas de las tetraploides;

60 La figura 4 es una imagen microfotográfica de estomas tomada por un microscopio computarizado. Parte superior: planta tetraploide. Parte inferior: planta diploide (el ejemplo de estoma está rodeado con una línea blanca).

Las figuras 5A-B son imágenes de las venas principales y secundarias de plantas tetraploides (A) y diploides (B). La figura 6 es una fotografía que muestra semillas de ricino de una variedad china (izquierda), variedad brasileña (centro) y una tetraploide que se generó aplicando las presentes enseñanzas a la variedad brasileña (derecha).

65

## DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES DE LA INVENCION

La presente invención se define por las reivindicaciones. En algunas realizaciones de la misma, se refiere a plantas de ricino tetraploides como se define por las reivindicaciones y usos de la misma.

5 La producción de ricino (*Ricinus communis* L., *Euphorbiaceae*) es necesaria para proporcionar aceite de ricino para los cientos de productos que usan esta materia prima quimiúrgica versátil. Se importan cada año de 40 a 45 mil toneladas de aceite de ricino y derivados (Roetheli *et al.* 1991) a los Estados Unidos para satisfacer las necesidades crecientes.

10 Para cumplir estas necesidades, los presentes inventores han identificado condiciones para la multiplicación del genoma en semillas de plantas de ricino. Las semillas de ricino multiplicadas genómicamente generadas de acuerdo con las presentes enseñanzas posibilitan plantas descendientes caracterizadas por una producción (por ejemplo, producción de semillas, producción de aceite) y fertilidad tan altas como sus progenitores de ricino diploide isogénico. Esto está en claro contraste con informes previos de plantas de ricino tetraploides que mostraban baja productividad en comparación con diploides (véase el trabajo de Efremov 1972; Evstafeva Fedorenko 1972, presentado en Moshkin y Doryadinka, 1986).

20 Como se ilustra posteriormente en el presente documento y en la sección de ejemplos a continuación, una planta de ricino tetraploide generada de acuerdo con las presentes enseñanzas se calificó tanto para rendimiento como para fertilidad. Los parámetros ensayados incluyeron área de estomas, número de estomas por unidad de área, análisis estadístico, fotografías a escala de los estomas, tamaño de las venas foliares típicas y análisis químico del aceite de las semillas. El tamaño promedio de los estomas de la planta de ricino diploide fue de  $150 \mu^2 \pm 32$  y la del tetraploide fue de  $221 \mu^2 \pm 96$ . La diferencia fue significativa a un nivel de 0,001. El número de estomas fue respectivamente para tetra y diploides 54 y 105 estomas por  $\text{mm}^2$ . Basándose en estos hallazgos y el mayor tamaño de la planta tetraploide, se sugiere que las plantas tetraploides muestran mayor eficacia fotosintética por unidad de área que la planta diploide. El tamaño de las venas de los petiolos principales y secundarias fue mayor para la planta tetraploide que para la diploide, de acuerdo con un fenotipo poliploide. El número de semillas por planta fue similar en la planta tetraploide a la planta de ricino diploide isogénica. La dimensión de las semillas (es decir, longitud, anchura y peso húmedo) fue mayor en las plantas tetraploides que en las diploides, lo que indica una producción aún mayor en la planta tetraploide que en la diploide. El contenido de aceite volumétrico fue al menos similar al de la planta diploide isogénica. Todo esto apunta a la superioridad de las plantas poliploides frente a las plantas de ricino de tipo silvestre.

35 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una planta de ricino tetraploide como se define por las reivindicaciones que es al menos tan fértil como una planta de ricino diploide isogénica para la planta de ricino tetraploide cuando se cultiva en condiciones similares.

40 Como se usa en el presente documento la expresión "planta de ricino" también denominada "planta de aceite de ricino" y "*Ricinus communis*", se refiere a la especie vegetal de las *Euphorbiaceae*.

La planta de ricino de algunas realizaciones de la presente invención se refiere a una planta completa o parte de la misma, procesada o no procesada (por ejemplo, semillas, aceite, tejido seco, harina, torta, etc.), cultivo de tejido regenerable o células aisladas de los mismos.

45 Como se usa en el presente documento, el término "poliploide" se refiere a una planta con tres o más conjuntos de cromosomas (por ejemplo, 3N, 4N, 5N, 6N y más).

50 Como se usa en el presente documento el término "diploide" se refiere a una planta de ricino típica que tiene dos conjuntos (2N) de cromosomas, en los que cada conjunto comprende 20 cromosomas. La planta de ricino diploide, como se usa en el presente documento es isogénica para la planta poliploide multiplicada, es decir, ambos conjuntos de cromosomas contienen alelos esencialmente idénticos en todas las localizaciones. La planta diploide puede ser de origen natural modificada genéticamente o un producto de cultivo.

55 Como se usa en el presente documento el término "fértil" se refiere a la capacidad para reproducirse sexualmente. La fertilidad puede ensayarse usando métodos que se conocen bien en la técnica. Los siguientes parámetros pueden ensayarse para determinar la fertilidad: el número de semillas, la fertilidad de los gametos puede determinarse por germinación de polen tal como en un sustrato de sacarosa; y como alternativa o adicionalmente tinción con acetocarmín, por el que se tiñe un polen fértil.

60 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, una planta de ricino tetraploide madura tiene al menos aproximadamente el mismo número (+/- 10 %) de semillas que su progenitor diploide isogénico cultivado en las mismas condiciones; como alternativa o adicionalmente la planta tetraploide tiene al menos 90 % de polen fértil que se tiñe por acetocarmín; y como alternativa o adicionalmente al menos el 90 % de las semillas germinan en sacarosa.

65

Se efectúan típicamente ensayos de comparación realizados para caracterizar rasgos (por ejemplo, fertilidad, producción, biomasa y vigor) de las plantas tetraploides de la presente invención en comparación con su progenitor isogénico (en lo sucesivo en el presente documento, "la planta diploide") cuando ambos están en el mismo estadio del desarrollo o ambos se cultivan en condiciones de cultivo similares.

5 Por lo tanto, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la planta tetraploide tiene una mayor área de superficie de una hoja que la de la planta de ricino diploide. En realizaciones ejemplares el área de hoja es 30 %-100 % mayor que la de la planta diploide y el grosor de la hoja es al menos 1,5-2,5 veces mayor que el de una planta diploide.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la planta tetraploide tiene una mayor superficie de estomas que la de la planta de ricino diploide. En una realización ejemplar el área de superficie de estomas es al menos 1,5-2,5 veces mayor que de la planta diploide.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la planta tetraploide puede cruzarse con una planta diploide.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la planta tetraploide es estable durante al menos 4, 5, 7, 9 o 10 generaciones.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la planta tetraploide tiene una producción de semillas (como se determina por al menos uno de: número de semillas, dimensiones de las semillas y contenido de aceite volumétrico) al menos similar al ricino diploide cultivado. De acuerdo con realizaciones adicionales de la presente invención, la producción de semilla excede la de la planta diploide en al menos aproximadamente 1, 1,5, 1,75, 2, 2,5, 3 o 5 veces.

Como se usa en el presente documento el término "estable" se refiere al número de cromosomas y copias de cromosomas, que permanecen constantes durante varias generaciones, mientras que la planta no muestra deterioro sustancial en al menos uno de los siguientes parámetros: producción, fertilidad, biomasa, vigor.

30 Pueden generarse plantas tetraploides de la presente invención usando un método mejorado de colchicinación, como se describe posteriormente.

35 Germinación de las semillas durante 12 horas a una temperatura de 25 °C en agua destilada. A continuación inmersión de las semillas en una solución de multiplicación que comprende: colchicina 0,5 %, DMSO 0,5 %, Triton x 100 0,03 % durante 20 horas. Finalmente, las semillas se lavan y se siembran en un lecho de germinación apropiado.

40 Se generan plantas de ricino tetraploides de la presente invención usando colchicina o cualquier otro inhibidor del ciclo celular (por ejemplo, inhibidores de la fase G2/M, tales como inhibidores del ensamblaje de microtúbulos, por ejemplo, colchicina, vinblastina, nocodazol, orizalina y trifluralina), en el que el agente de dirección es un campo magnético para suministro dirigido del inhibidor a las fibras de cromatina. Una realización específica de dicho método se proporciona a continuación en el presente documento. Debe observarse que las medidas se toman para mantener los valores de pH indicados en cada fase (tal como como HCL o NaOH).

45 Estadio uno - 3 horas:

50 Se incuban semillas en una placa de Petri a una temperatura de 26 °C en la oscuridad en una solución de sulfato de vinblastina (0,1 % v/v) que comprende DMSO 0,5 % valorado a pH 5,6. Las condiciones de pH se controlan para mantener el pH constante (5,6) durante toda esta fase. El recipiente se sitúa en un campo magnético de 1300 Gauss, en el que los imanes se localizan 10,5 cm entre sí.

Estadio dos - 3 horas:

55 Las semillas se incuban en la solución anterior en condiciones de luz diurna a 4 °C y el pH se valora a 6.

Estadio tres - 6 horas

60 Las semillas se incuban en condiciones de luz diurna a 20 °C y el pH se valora a 5,4.

Estadio cuatro - 12 horas

Las semillas se incuban en condiciones de luz diurna a 26 °C y el pH se valora a 6. El campo magnético se retira y se añade Nocodazol a una concentración de 5 m/ml.

65 Estadio cinco - 12 horas:

Las semillas se incuban en luz diurna con condiciones de temperaturas constantes (26 °C).

Las semillas se lavan bien en agua para aumentar el pH a 7. A continuación, las semillas se siembran en lechos de cultivo apropiados en condiciones de luz diurna larga (16 horas) a 26 °C.

5 Usando estas enseñanzas los presentes inventores fueron capaces de generar plantas de ricino tetraploides tales como las depositadas según el tratado de Budapest en NCIMB Ltd. y que tienen el número de referencia NCIMB 41593 *Ricinus communis* B2-20-4N.

10 Una vez establecidas, las plantas de ricino de la presente invención pueden propagarse sexual o asexualmente tal como usando técnicas de cultivo tisular.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "cultivo tisular" se refiere a células vegetales o partes de plantas a partir de las que pueden generarse plantas de ricino, incluyendo protoplastos vegetales, callos vegetales, macollas vegetales y células vegetales que están intactas en plantas, o partes de plantas, tales como semillas, hojas, tallos, polen, raíces, puntas de raíces, anteras, óvulos, pétalos, flores, embriones, fibras y capullos.

Las células cultivadas pueden mostrar estabilidad genómica durante al menos 4, 5, 7, 9 o 10 pases en cultivo.

20 Se conocen bien en este campo técnicas para generar cultivo de tejido vegetal y regenerar plantas a partir de cultivo tisular. Por ejemplo, dichas técnicas se exponen en Vasil., 1984. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol I, II, III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press, Nueva York; Green *et al.*, 1987. *Plant Tissue and Cell Culture*, Academic Press, Nueva York; Weissbach y Weissbach. 1989. *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press; Gelvin *et al.*, 1990, *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers; Evans *et al.*, 1983, *Handbook of Plant Cell Culture*, MacMillian Publishing Company, Nueva York; y Klee *et al.*, 1987. *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38: 467 486.

25 El cultivo tisular puede generarse a partir de células o protoplastos de un tejido seleccionado del grupo que consiste en semillas, hojas, tallos, polen, raíces, puntas de raíces, anteras, óvulos, pétalos, flores, embriones, fibras y capullos.

30 Se apreciará que las plantas de la presente invención también pueden usarse en cultivo de plantas junto con otras plantas de ricino (es decir, auto-reproducción o cruce) para generar nuevas plantas o líneas vegetales que muestren al menos algunas de las características de las plantas de ricino de la presente invención.

35 Las plantas resultantes del cruce de cualquiera de estas con otra planta pueden utilizarse en cultivo de selección, transformación y/o retrocruzamiento para generar cultivares adicionales que muestren las características de las plantas de ricino de la presente invención y cualquier otro rasgo deseado. Pueden usarse técnicas de exploración que emplean procedimientos moleculares o bioquímicos bien conocidos en este campo para asegurar que las características comerciales importantes buscadas se conserven en cada generación de cultivo.

40 El objetivo del retrocruzamiento es alterar o sustituir un único rasgo o característica en una línea parental recurrente. Para conseguir esto, se sustituye un único gen de la línea parental recurrente o se complementa con el gen deseado de la línea no recurrente, conservando al mismo al tiempo esencialmente todos los demás genes deseados, y por lo tanto la constitución fisiológica y morfológica deseada de la línea original. La elección del parental no recurrente particular dependerá del fin del retrocruzamiento. Uno de los fines principales es añadir algún rasgo comercialmente deseable, agrícola importante a la planta. El protocolo de retrocruzamiento exacto dependerá de la característica o el rasgo que se altere o se añada para determinar un protocolo de ensayo apropiado. Aunque los métodos de retrocruzamiento se simplifican cuando la característica que se transfiere es un alelo dominante, también puede transferirse un alelo recesivo. En este caso, puede ser necesario introducir un ensayo de la descendencia para determinar si la característica deseada se ha transferido con éxito. De forma similar, puede introducirse transgenes en la planta usando cualquiera de una diversidad de métodos de transformación establecidos bien conocidos por los expertos en la materia, tales como: Gressel., 1985. *Biotechnologically Conferring Herbicide Resistance in Crops: The Present Realities*, En: *Molecular Form and Function of the plant Genome*, L van Vloten-Doting, (ed.), Plenum Press, Nueva York; Huftner, S. L., *et al.*, 1992, *Revising Oversight of Genetically Modified Plants*, Bio/Technology; Klee, H., *et al.*, 1989, *Plant Gene Vectors and Genetic Transformation: Plant Transformation Systems Based on the use of Agrobacterium tumefaciens*, *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*; y Koncz, C., *et al.* 1986, *Molecular and General Genetics*.

45 50 55 60 Se apreciará que las plantas de ricino de la presente invención pueden modificarse genéticamente tal como para introducir rasgos de interés, por ejemplo composición de aceite mejorada y resistencia a tensión (por ejemplo, biótica o abiótica) potenciada. Se describen ejemplos no limitantes de secuencias de ácido nucleico útiles para alterar la composición oleosa de las plantas de ricino y métodos de transformación de ricino, así como construcciones de ácido nucleico útiles para lo mismo en la Patente de Estados Unidos Número 6.974.893.

65

La composición de ácidos grasos del ricino tetraploide puede ser aproximadamente la misma que la de la planta de ricino diploide, aunque el nivel de los diferentes componentes puede variar.

Por lo tanto, la presente invención proporciona nuevas plantas de ricino y cultivares, y semillas para generarlas.

5 Las plantas de ricino generadas basándose en las presentes enseñanzas pueden procesarse adicionalmente para generar productos de planta de ricino que se usan habitualmente para numerosas aplicaciones industriales, incluyendo lubricantes de base biológica, ceras, pinturas y recubrimientos, plásticos, compuestos antifúngicos y cosméticos.

10 También se describe en el presente documento un método para producir aceite de ricino, comprendiendo el método: recoger semillas de la planta de ricino o parte de la planta como se define por las reivindicaciones; y procesar las semillas para producir el aceite de ricino.

15 A continuación hay una descripción no limitante de la recogida y el procesamiento de semillas.

Los frutos de ricino se recogen cuando están completamente maduros y las hojas están secas, en aproximadamente 95-180 días dependiendo del cultivar. La siembra y la recolección pueden realizarse por métodos manuales o pueden estar completamente mecanizados. La recolección debería comenzar antes de la estación lluviosa en regiones tropicales, pero en regiones secas es mejor recolectar cuando todos los frutos están maduros. Las espigas se cortan o se rompen y las cápsulas se retiran y se recogen. A no ser que las cápsulas estén secas, deben extenderse para secar rápidamente. Se seca al sol, se seca por congelación o mediante el uso de desfoliantes. Pueden usarse máquinas de recolección tales como cosechadoras de trigo modificadas que agitan las cápsulas de la plantas sacudiendo las plantas en su bases. Se requiere una humedad relativa del 45 % o menos para una operación eficaz con cosechadoras mecánicas. Algunas variedades indehiscentes se trillan por trilladoras de grano ordinarias a 400-800 r.p.m. de velocidad de cilindro. Después de recolectar, las semillas deben retirarse de las cápsulas o cáscaras, habitualmente con máquinas descascaradoras si las cápsulas están secas. El porcentaje de semilla con respecto a cáscara es un promedio de 65-75, dependiendo de la madurez de la semilla en el momento de recolección.

30 La extracción de aceite de semilla de ricino se realiza de una manera similar a la de la mayoría de las otras semillas oleaginosas. Las semillas se limpian, se cocinan y se secan antes de la extracción. El cocinado se realiza para coagular la proteína (necesario para permitir la extracción eficaz), y para liberar el aceite para un prensado eficaz.

35 El primer estadio de la extracción de aceite es el pre-prensado, usando una prensa de husillo continuo, denominada expulsor. El aceite extraído se filtra, y el material retirado del aceite se retroalimenta al flujo junto con material nuevo. El material finalmente expulsado de la prensa, denominado torta, contiene de 8 a 10 por ciento de aceite. Se tritura en una harina gruesa, y se somete a extracción de disolvente con hexano o heptano.

40 Una vez que se ha extraído el aceite de la semilla, es necesario retirar las impurezas del aceite. El aceite es esencialmente un triglicérido puro, y contiene casi el 90 % de gliceril tricinoleato, Es el triglicérido ricinoleico lo que se necesita para producir aceite de ricino de alta calidad.

Las etapas para refinar el aceite en bruto incluyen:

45 Sedimentar y desgomar el aceite - Realizado para retirar la fase acuosa de los líquidos, y para retirar fosfolípidos del aceite.

Blanqueado – El blanqueado da como resultado la retirada de materiales colorantes, fosfolípidos y productos de oxidación.

50 Neutralización – La etapa de neutralización es necesaria para retirar ácidos grasos libres del aceite. Esto puede realizarse de una de dos maneras: medios (a) Alcalinos (Químicos) o (b) Extracción por vapor (Físicos). Método Alcalino/Químico: Se mezcla sosa cáustica (álcali) en las cantidades apropiadas y se retira la solución acuosa, dejando el aceite neutro. Extracción por vapor: Esto se realiza al vacío, para retirar la humedad, ácidos grasos libres, cuerpos aromáticos, y otras impurezas del aceite. Como se realiza en condiciones de vacío, el aceite puede mantenerse a una temperatura baja, conservando su estructura química pero no sometiéndolo a temperaturas en las que puedan producirse reacciones de deshidratación indeseables.

Desodorización del aceite- La desodorización del aceite da como resultado la retirada de olor del aceite.

60 Pueden producirse muchos derivados a partir del aceite de ricino. Algunos de estos derivados tienen composiciones químicas similares a las de los aceites basados en petróleo.

Residuo de semilla de ricino, también denominado harina de ricino – La harina de ricino es el residuo obtenido de la torta de ricino por proceso de extracción de disolventes. Es uno de los abonos naturales más versátiles. Este abono potencia la fertilidad del suelo sin provocar ningún daño o degradación. Se enriquece con los tres elementos vitales y que conducen al crecimiento apropiado de cultivos, es decir, Nitrógeno, Fósforo y Potasio. También tiene trazas de nutrientes como Manganeso, Zinc y Cobre, lo que lo hace un fertilizante equilibrado. Además, ayuda a neutralizar los

efectos perjudiciales de fertilizantes químicos. Aparte de su contribución a los nutrientes, tienen varios beneficios en la agricultura, que ninguno de los fertilizantes o pesticidas sintéticos pueden ofrecer. Proporcionan nutrición lenta y estable, estimulación, protección de nematodos e insectos del suelo, mejora los rendimientos y la calidad del producto, como sabor, aroma, composición de aminoácidos, etc.

5 La torta prensada obtenida después de la expresión de la semilla de ricino. La torta con disolventes extraídos, aunque es rica en proteínas no puede usarse como forraje para ganado debido a su toxicidad. Sin embargo, se puede usar como fertilizante. El contenido de proteínas de la harina de semilla de ricino varía del 21-48 % dependiendo del grado de decorticación. Tiene un perfil de aminoácidos ideal con cistina, metionina e isoleucina moderadamente altas. No obstante sus sustancias antinutricionales, ricina, y un alérgeno restringen su uso en pienso para aves, e incluso a un nivel de inclusión muy bajo.

10 El aceite de ricino hidrogenado (HCO), también conocido como cera de ricino, es una cera dura, frágil e insoluble. Se produce añadiendo hidrógeno en presencia de un catalizador de níquel. Se usa principalmente para recubrimientos y grasas cuando se requiera resistencia a humedad, aceites y otros productos petroquímicos.

15 Se produce HCO por la hidrogenación de aceite de ricino con catalizador de níquel. Sus escamas blancas son extremadamente insolubles y son resistentes al agua. El uso principal es en la fabricación de grasas y en recubrimiento de papel para envasado de alimentos.

20 El aceite hidrogenado también se utiliza en la fabricación de ceras, lustres, papel carbón, velas y lápices de colores.

25 Ácido 12 hidroxisteárico (12 HSA) - 12 HSA es un ácido graso sólido blancuzco usado para fabricar grasas lubricantes basadas en litio y calcio. Cuando se hace reaccionar con un éster, 12 HSA, proporciona una terminación dura para las industrias automovilística y de electrodomésticos.

30 Metil 12 HSA (metil ácido 12 hidroxisteárico, metil 12 hidroxisteárate) - metil 12HSA se forma por esterificación directa del 12HSA con metanol. Se comercializa habitualmente en forma líquida y se usa ampliamente en el proceso de engrasado continuo. Tiene un punto de fusión más bajo que 12HSA y es, por lo tanto, más fácil de manipular en forma líquida. Las grasas realizadas con metil 12HSA pueden formularse a mayores puntos de goteo, y experimentar tanto menor pérdida como mejor estabilidad oxidativa.

35 Aceite de ricino cocido – El aceite de ricino cocido es un derivado del aceite de ricino que tiene una mayor viscosidad y gravedad específica que el aceite de ricino natural. Estas propiedades se inducen burbujeando aire a través de él a temperaturas elevadas. El aceite de ricino cocido encuentra uso como plastificante para tintas, lacas y adhesivos.

40 COLM, Uso en Uretano - COLM (aceite de ricino de baja humedad) es una clase refinada de aceite de ricino para aplicaciones específicas que requieren mínima humedad. Las aplicaciones típicas incluyen recubrimientos de uretano, adhesivos y tintas. COLM también encuentra uso en soplado de uretano y moldeo de uretano.

El aceite deshidratado es un agente de secado excelente mejor que el aceite de tung y se usa en pinturas y barnices.

45 Se espera que durante la vida de una patente que surja de la presente solicitud se desarrollen muchos derivados relevantes y se pretende que el alcance del término derivado incluya todas estas nuevas tecnologías a priori.

Como se usa en el presente documento el término "aproximadamente" se refiere a  $\pm 10\%$ .

50 Las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero sin limitación". Esta expresión abarca "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

55 La frase "consiste esencialmente en" significa que la composición de un método puede incluir ingredientes y/o etapas adicionales, pero solamente si los ingredientes y/o las etapas adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición o el método reivindicado.

60 Como se usa en el presente documento, la forma singular "un" y "el" incluye referencias plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

65 A lo largo de la presente solicitud, pueden presentarse diversas realizaciones de la presente mención en un formato de intervalo. Debería entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. En consecuencia, debería considerarse que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los sub-intervalos posibles así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha desvelado específicamente sub-intervalos tales



como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

5 Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, se entiende que incluye cualquier número (fraccional o entero) enumerado dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en el presente documento indistintamente y se entiende que incluyen el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionales y enteros entre ellos.

10 Como se usa en el presente documento el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea dada incluyendo, pero sin limitación, las maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por, o desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

15 Se apreciará que ciertas características de la invención, que se describen, para mayor claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que se describen, para mayor brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier sub-combinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de  
20 diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a no ser que la realización sea inoperante sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han definido anteriormente en el presente documento y como se reivindican en la sección de reivindicaciones posterior encuentran apoyo experimental en los  
25 siguientes ejemplos.

## EJEMPLOS

30 Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos que, junto con la descripción anterior, ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitante.

### EJEMPLO 1

35 Generación de plantas de ricino poliploides

Se recogieron plantas de ricino de diferentes fondos genéticos a partir de varias regiones en Israel (Alta Galilea, Baja Galilea, Llanura Costera y El Negev) así como de diferentes regiones del mundo (Sur de Brasil, Norte de Brasil, Argentina, Paraguay, Norte de China y China Central). Los genomas de estas plantas se multiplicaron usando Multiplicación de Genoma sin mutaciones (MFGM). La multiplicación en este experimento se ha realizado usando  
40 cualquiera de los protocolos anteriormente descritos.

Todas las fuentes se sometieron a un proceso de mutagénesis centrada para expandir la variabilidad genética pre-existente y localizar esterilidad masculina en diferentes fondos.

45 Las plantas que se sometieron al proceso de multiplicación de genoma se plantaron en el campo y se comprobó su nivel de ploidía usando un FACS (Clasificador de células activadas por Fluorescencia).

Brevemente, se liberaron núcleos de tejido foliar de 2 cm x 2 cm mediante inmersión en tampón de picado durante  
50 30 segundos.

El tampón de picado consistía en 4,575 gramos, MgCl<sub>2</sub>, 2,095 g. - MOPS, 4,4 g- de Citrato Sódico, 1 g - DTT, 1,65 g (10 gotas) Triton x 100 – todos por cada 500 ml de agua destilada. El picado se realizó con una cuchilla, en una dirección. El tejido picado se transfirió a una placa de Petri y se colocó en hielo.

55 La muestra se filtró antes de su uso (malla de 20). Se retiraron las muestras de núcleos (2 cc-6 cc) a un tubo de FACS y se añadieron 15 ml de yoduro de propidio (PI) a cada muestra. Después de 15 min, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo equipado con un láser de argón Cyonics (488 nm) que actuaba a 15 mW.

60 La fluorescencia que excede 635 nm se selecciona y los resultados se presentan como histogramas de un único parámetro del número de núcleos en cada uno de 1.024 canales. El control se fijó en el canal 300.

Las plantas poliploides se sometieron a un ensayo de fertilidad de polen por germinación en lecho de sacarosa y examen microscópico de los granos de polen (como se ha explicado anteriormente, se usa acetocarmín para teñir el polen fértil).

65

Todas las plantas que se determinó que no estaban dañadas tanto fenotípicamente como con respecto al aspecto y la estructura de los granos de polen en los que los niveles de fertilidad no eran menores que los de las plantas de control, se sometieron a autopolinizaciones (Figura 1).

- 5 La descendencia de las plantas multiplicadas genómicamente se plantó para comprobar la estabilidad y la fertilidad de los gametos. Las plantas que se seleccionaron actuaron como parentales en la producción de híbridos.

La población F2 se sometió a multiplicación del genoma usando la tecnología MFGM y se comprobó el nivel de ploidía de todas las plantas usando un FACS.

- 10 Las plantas que dieron un resultado verdadero para multiplicación del genoma y también eran fértiles e interesantes desde el punto de vista de cultivo de plantas se ensayaron para determinar el nivel de fertilidad de su polen y después se autopolinizaron.

- 15 Las plantas que dieron un resultado verdadero para multiplicación de genoma y eran estériles masculinas actuaron como parentales para híbridos y se polinizaron por dichas plantas multiplicadas genómicamente seleccionadas.

## EJEMPLO 2

- 20 Caracterización de estomas y marcadores de semillas de genotipos de plantas de aceite de ricino multiplicadas (*Ricinus communis*) y sus efectos en la captación de CO<sub>2</sub>, transpiración y producción

Materiales y procedimientos experimentales.

- 25 Región de estudio: El estudio se efectuó en un clima Mediterráneo típico con una temperatura media anual a largo plazo de 18-20 °C (las temperaturas al aire mínimas y máximas fueron de -8-10 °C en enero y 30-35 °C en agosto), precipitaciones de 600-700 mm durante el invierno (de noviembre a mayo), evapotranspiración de 1500-2000 mm y PAR incidente de 300-350 MJ m<sup>-2</sup>. La PAR incidente máxima se produce en agosto (410-420 MJ m<sup>-2</sup> mes<sup>-1</sup>) y la mínima en diciembre (1140-160 MJ m<sup>-2</sup> mes<sup>-1</sup>).

- 30 Los suelos de superficie (0-30 cm) con proporciones diferentes de fracciones de arena, limo y arcilla en las localizaciones del estudio fueron suelos predominantemente de textura fina, presentaron un intervalo estrecho de variación con respecto a la capacidad de campo y punto de marchitamiento permanente que correspondía a -0.03 MPa y -1,5 MPa, respectivamente, en potencial mátrico. Las densidades aparentes en seco del suelo variaron entre 1,22 y 1,35 g cm<sup>-3</sup>. Los suelos no tenían ningún problema de salinidad, y los contenidos de sales solubles totales fueron por debajo de 0,1 %. Los suelos de los sitios del estudio tenían valores de pH ligeramente alcalinos de 7,5 a 7,7 y se determinó que eran pobres en materia orgánica del suelo (1,18 a 2,37 %).

- 40 Métodos genéticos – La línea poliploide de semilla de ricino tratada con la tecnología de "MFGM" se comparó con su línea diploide isogénica con respecto a fertilidad y producción. Para esto, se recolectaron plantas individuales de cada línea, y se recogió el número de cápsulas y componentes de producción por cada planta.

- 45 Mediciones de fotosíntesis y transpiración: Se insertaron fracciones de hojas de los dos genotipos bajo un microscopio invertido Nikon TI equipado con un objetivo 20 X súper flúor y se manejó con software NIS elements. Se marcaron 30-50 estomas en cada tratamiento, su área se midió automáticamente y se analizó estadísticamente.

- 50 Se midió la dinámica acoplada de la tasa fotosintética meta (P<sub>N</sub>), tasa de transpiración (E<sub>T</sub>), eficacia en el uso del agua (WUE), radiación fotosintéticamente activa (PAR), temperatura del aire (T), humedad relativa (RH), y concentración de CO<sub>2</sub> atmosférica (C<sub>atm</sub>).

Para medir diversos parámetros ambientales y vegetales se usó el monitor de fotosíntesis PTM-48M (Figura 2A).

- 55 El sistema contiene: cuatro cámaras de hojas de autosujección LC-4A (Figura 2B) que se cierra sucesivamente durante dos minutos para controlar el intercambio de CO<sub>2</sub> de las hojas, analizador de CO<sub>2</sub> por infrarrojos y un registrador de datos incorporado. El monitor también tiene once entradas para sensores adicionales. Los sensores adicionales usados en el experimento actual incluyeron: sensor de radiación de fotosíntesis PIR -1, sensor de temperatura y humedad del aire ATH-2, se registraron automáticamente datos de fotosíntesis y transpiración de cuatro cámaras de hojas así como datos de los sensores adicionales cada 30 minutos durante todo el día.

- 60 Las plantas diploides y tetraploides en el experimento se muestran en la Figura 3. Las cámaras de hojas (LC) se proporcionan como una referencia para el tamaño de las hojas. Obsérvese que las hojas de la planta diploide fueron mucho más pequeñas que las hojas de las tetraploides.

- 65 Análisis de ácidos grasos – el aceite se transesterificó por reacción con una solución de hidróxido de potasio en metanol y se ensayó usando cromatografía líquida de gases (ISO 5509-1978).

Ensayo de germinación – las semillas se incubaron en lechos de sacarosa (sacarosa 2 % y H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2 mM) durante 12 horas a 26 °C. A continuación se evaluó la germinación.

Tinción con acetocarmín – el polen se tiñó con solución de acetocarmín 1 % durante 15 minutos y después se visualizó bajo el microscopio.

5 Análisis estadístico – El análisis de estomas se llevó a cabo con el software NIS. Incluyó distribución de frecuencias, desviación típica y ensayo de t con respecto a significación. La distribución de frecuencia de los estomas fue cercana a la normal, los resultados del ensayo de t tanto del número de estomas por unidad de área como del área de los estomas fueron significativos a un nivel de 0,001. Se usó el promedio de dos cámaras de hojas por planta  
10 diploide y dos cámaras para medir los genotipos de plantas de aceite de ricino multiplicados. Se detectó el CO<sub>2</sub> ambiental con cuatro sondas y se calculó la desviación típica del resultado. Un ensayo preliminar indicó que el coeficiente de variación era de 0,13 tanto para fotosíntesis como para transpiración.

15 Se espera que las plantas poliploides generadas de acuerdo con las presentes enseñanzas muestren una fotosíntesis similar o incluso mayor que las plantas diploides, como se demuestra por los ensayos de transpiración y fotosíntesis.

Área y densidad de los estomas – La Figura 4 muestra claramente que el tamaño de los estomas tetraploides es mayor que el de los diploides, mientras que el número de estomas (densidad) del diploide es mayor. Los datos estadísticos de las dos fotografías se resumen en la Tabla 1, a continuación. Las primeras 4 líneas (1-4) resumen las propiedades físicas de la imagen. La Línea nº 5 indica la densidad de estomas que es aproximadamente 6 veces mayor para el diploide que para el tetraploide.  
20

Tabla 1- Las propiedades físicas de los estomas en las hojas de plantas tetra y diploides

	Artículo	Unidades	Tetraploide	Diploide
1	Nº de píxeles del eje x	Nº	1.392,0	1.392,0
2	Nº de píxeles del eje y	Nº	1.040,0	1.040,0
3	Longitud de un pixel	μ	0,3	0,3
4	Área de un pixel	μ <sup>2</sup>	0,1	0,1
5	Nº promedio de estomas por portaobjeto	Nº	8,0	47,0
6	Área promedio por estoma	μ <sup>2</sup>	221,5	150,0
7	Área total de estomas por portaobjetos	μ <sup>2</sup>	1.772,0	7.050,0
8	Área del portaobjetos	μ <sup>2</sup>	148.242,4	148.242,4
9	Área del portaobjetos	mm <sup>2</sup>	0,1	0,1
10	Nº de estomas /mm <sup>2</sup>	Nº	54,0	317,0
11	Área de los estomas por mm <sup>2</sup>	μ <sup>2</sup>	11.953,4	47.557,2

25 La línea nº 6 muestra que el área de un solo estoma tetraploide es aproximadamente 50 % mayor que el del diploide. Sin embargo, el área de estoma específico (Línea 11) es aproximadamente 4 veces mayor que el del tetraploide (p=0,001).

30 Las Figuras 5A-B son imágenes de las venas de las plantas de ricino diploides (B) y tetraploides (A). Las venas medidas de las dos plantas se tomaron en la quinta vena secundaria encima del centro de la hoja. El diámetro de la vena tetraploide mayor es aproximadamente 1500 μ mientras que el diámetro de la vena diploide equivalente es solamente la mitad. Puede encontrarse una observación similar en las venas secundarias. Se descubrió 500 μ en el tetraploide y menos de 300 μ en el diploide.

35 Propiedades de las semillas – Se muestra la apariencia fenotípica de semillas de ricino multiplicadas en la Figura 6. La longitud, anchura y peso húmedo de las semillas fueron significativamente mayores en los genotipos tetraploides que en los diploides (Tabla 2, a continuación). Las diferencias dentro de cada grupo fueron insignificantes.

40 Tabla 2. Comparación<sup>a</sup> del tamaño y peso húmedo de las semillas entre un genotipo de ricino diploide (2n) y tetraploide (4n)

Genotipo	Obsr,	Longitud, cm (d.t.)	Anchura, cm (d.t.)	Peso, g (d.t.)
B2-74-1-2 2n	21	1,38 (0,06) be	0,83 (0,03) c	0,34 (0,06) c
B2-20(11)-11 4n	17	1,46 (0,05) a	0,985 (0,03) a	0,48 (0,04) a
B2-20(12)-7 4n	7	1,48 (0,035) a	1,01 (0,026) a	0,49 (0,07) a
B2(20)98-1 2n	13	1,37 (0,04) bc	0,85 (0,016) b	0,36 (0,08) bc
B2(20)52-1 2n	23	1,36 (0,04) c	0,85 (0,03) b	0,38 (0,035) b
B2(20)20 2n	32	1,39 (0,04) b	0,83 (0,03) c	0,33 (0,08) c
B2(20)29 2n	44	1,39 (0,07) b	0,85 (0,04) b	0,34 (0,07) c

Media		1,396	0,867	0,367
F		9,7	73	14,8
Pr>F		0,0001	0,0001	0,0001
<sup>a</sup> ANOVA y ensayo de intervalos de Tukey ( $\alpha = 0,05$ )				

5 Datos de fertilidad y producción: Los datos de la bibliografía sobre semillas de ricino poliploides muestran una reducción notable en la producción y fertilidad de los poliploides en comparación con la línea diploide isogénica o híbrido (Moshkin, V.A. y A.G. Dvoryadinka. *Castor Genetics*. In *Castor*. Ed. V.A. Moshkin. Amerind Publ. Co., Nueva Delhi. 1986. pág. 93-102).

Los resultados de la recogida de datos de líneas isogénicas 2N y 4N se presentan en la tabla 3, a continuación.

Tabla 3. Número de cápsulas y peso de semillas por planta en líneas isogénicas tetraploide (4n) y diploide (2n).

Líneas 2N	Número de cápsulas	Producción de semillas total (g)	Líneas 4N	Número de cápsulas	Producción de semillas total (g)
18-22(43)	551	220	B2(20)1	553	287
18-24(44)	530	213	B2(20)2	542	280
18-28(45)	542	217	B2(20)3	546	283
18-30(46)	548	220	B2(20)4	543	280
18-31(47)	572	229	B2(20)5	570	296
18-35(48)	546	218	B2(20)6	548	284
18-36(49)	554	219	B2(20)7	553	287
18-41(50)	538	214	B2(20)8	540	280
18-42(51)	541	218	B2(20)9	554	289
18-46(52)	540	215	B2(20)10	547	284
18-47(53)	547	218	B2(20)11	555	288
18-49(54)	543	215	B2(20)12	529	274
18-54(55)	551	220	B2(20)13	537	279
18-57(56)	546	218	B2(20)14	541	281

10 Por lo tanto, puede concluirse que no hay ninguna reducción de la fertilidad de las plantas poliploides de primera generación (y también de generaciones posteriores) en comparación con las plantas diploides. Sin embargo, se mostró una clara diferencia significativa (por análisis de pares coincidentes) en el nivel de producción de las plantas 4N en comparación con las plantas isogénicas 2N. La diferencia fue de un aumento de aproximadamente el 30 % en la producción de semillas de las plantas poliploides en comparación con las plantas diploides isogénicas principalmente debido al mayor peso de las semillas de las poliploides.

20 Perfil de ácidos grasos de las semillas: los principales ácidos grasos de semillas de ricino son oleico, ricinoleico y linoleico (tabla 4, a continuación). Los presentes resultados muestran que la diferencia en el contenido de ácidos entre las líneas tetraploides y diploides no es mayor que entre las plantas en cada línea. Esto indica fuertemente que la duplicación de plantas fuente no provocó mutaciones graves que pudieran interferir en las funciones básicas de las plantas.

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos de líneas de ricino diploides (2n) y tetraploides (4n).

Código de línea	B2 (807)	B2(11)20	I3(4)B	I(3)35	EXPR 20
nivel de ploidía	2N	4N	2N	4N	4N
Generación	F5	F5	F5	F5	F1
C 8:0	-	0,01	-	0,01	-
C10:0	-	-	-	0,01	-
C 12:0	-	-	-	-	-

ES 2 545 780 T3

C 14:0	-	0,01	0,01	0,02	-
C 14:1	-	-	-	-	-
C 15:0	0,02	0,02	0,01	0,01	-
C 16:0	1,46	1,68	1,52	1,70	1,85
C 16:1	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02
C 17:0	0,03	0,06	0,06	0,06	0,03
C 17:1	0,02	0,15	0,13	0,15	0,02
C 18:0	1,09	1,19	1,68	1,46	1,44
C 18:1 (ácido oleico)	4,78	4,39	4,91	5,90	5,63
C 18:1 OH (ácido ricinoleico)	83,56	83,94	83,75	83,37	82,90
C 18:2 (ácido linoleico)	7,02	6,68	5,93	5,58	6,54
C 18:3	0,68	0,64	0,59	0,56	0,60
C 19:1	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02
C 20:0	0,05	0,04	0,07	0,07	0,06
C 20:1	0,56	0,46	0,47	0,46	0,48
C 20:2	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10
C 20:3	0,02	-	-	-	-
C 20:4	0,02	-	0,07	-	0,02
C 20:5 n3	-	-	-	-	-
C 21:0	-	-	-	-	-
C 22:0	0,03	0,01	0,01	0,01	-
C 22:1	-	-	0,02	-	0,01
C 22:2	0,10	0,09	0,06	0,04	0,08
C 22:3	-	-	0,02	-	-
C 22:5 n3	-	-	-	-	-
C 22:6 n3	-	-	-	-	-
C23:0	-	-	-	-	-
C 24:0	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
C 24:1	-	-	-	-	-
Suma	99,59	99,51	99,46	99,53	99,82

Contenido de aceite volumétrico - la tabla 5 a continuación demuestra el contenido de aceite en plantas 3N. Los resultados indican que las plantas 3N tienen un contenido de aceite similar a las plantas 2N.

5

Tabla 5

1	Par - 21	42,40	Control	2N
2	B1 - 19	41,00	Control	2N
3	CH-2	41,70	Control	2N
4	C - 181	44,10	Control	2N
6	EXPR 10	47,40		2N
7	EXPR 11			2N
8	EXPR 12			2N
9	EXPR 13	47,10		2N
10	EXPR 14	42,80		2N
11	EXPR 15	41,80		2N
12	EXPR 16			2N
13	EXPR 17			2N
14	EXPR 18	43,10		2N
15	EXPR 19	44,50		2N
16	EXPR 26	46,00		3N
17	EXPR 27	44,10		3N

# ES 2 545 780 T3

18	EXPR 29	42,70		3N
19	EXPR 31			3N
20	EXPR 33			3N
21	EXPR 39			2N
22	EXPR 40	44,70		2N
23	EXPR 44	48,10		2N
24	EXPR 46	47,60		2N
25	EXPR 50	43,80		3N
26	EXPR 55	44,70		2N
27	EXPR 60			3N

**REIVINDICACIONES**

1. Una planta de ricino tetraploide que puede obtenerse por multiplicación del genoma en semillas de ricino de un progenitor de ricino diploide isogénico, en la que dicha multiplicación del genoma se efectúa poniendo en contacto una semilla de ricino con un inhibidor de fase G2/M y un agente de dirección que es un campo magnético para suministro dirigido de dicho inhibidor de fase G2/M a fibras de cromatina de dicha semilla de ricino, en la que dicha planta de ricino tetraploide es al menos tan fértil como dicho progenitor de ricino diploide cuando se cultiva en condiciones similares, y en la que dicha planta de ricino tetraploide tiene al menos 90 % de polen fértil que se tiñe por acetocarmín; y como alternativa o adicionalmente al menos 90 % de semillas que germinan sobre sacarosa.
2. La planta de la reivindicación 1, que tiene
- (i) producción de semillas al menos similar a la de dicha planta de ricino diploide;
  - (ii) producción de aceite al menos similar a la de dicha planta de ricino diploide;
  - (iii) un área de superficie de una hoja mayor que la de dicha planta de ricino diploide; o
  - (iv) una superficie de estomas mayor que la de dicha planta de ricino diploide.
3. La planta de la reivindicación 1, que puede cruzarse con una planta diploide.
4. Una parte de planta de la planta de ricino de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. La parte de planta de la reivindicación 4 que es una semilla.
6. Torta de ricino producida a partir de semillas de la reivindicación 5, en la que la longitud, anchura y peso húmedo de dichas semillas son mayores en comparación con las semillas de las plantas diploides.
7. Uso de semillas como se han definido en la reivindicación 5 para producir aceite de ricino.
8. La planta de la reivindicación 1, que tiene un área de superficie de una hoja mayor que la de dicha planta de ricino diploide.
9. La planta de la reivindicación 8, en la que dicha área de hoja es 30 % -100 % mayor que la de dicha planta de ricino diploide y el grosor de la hoja es al menos 1,5 - 2,5 veces mayor que el de dicha planta de ricino diploide.
10. La planta de la reivindicación 1, que tiene una superficie de estomas mayor que la de dicha planta de ricino diploide.
11. La planta de la reivindicación 10, en la que dicha área de superficie de estomas es al menos 1,5 - 2,5 veces mayor que la de dicha planta de ricino diploide.
12. La planta de la reivindicación 1, que muestra una eficacia fotosintética mayor por unidad de área que la planta isogénica diploide.



FIG. 1



FIG. 2A

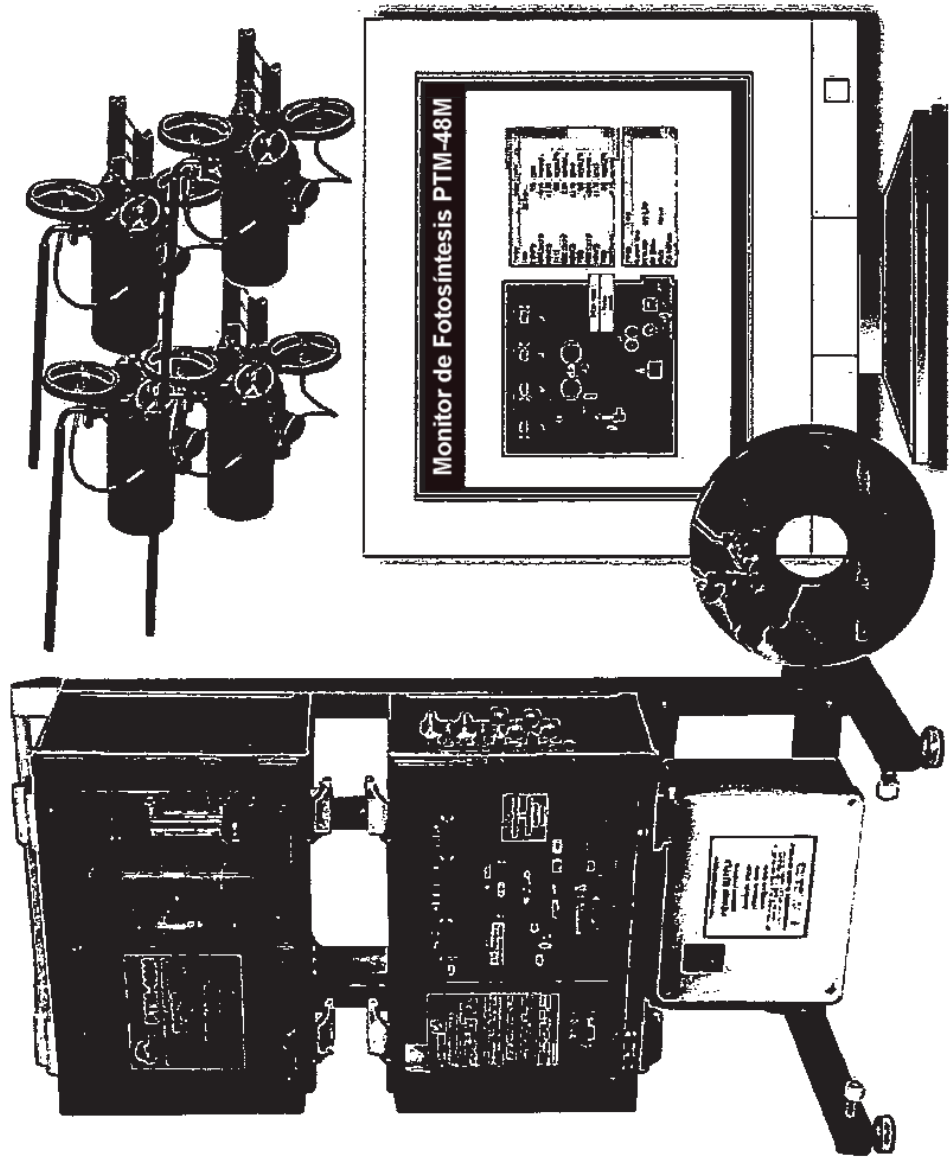




FIG. 2B

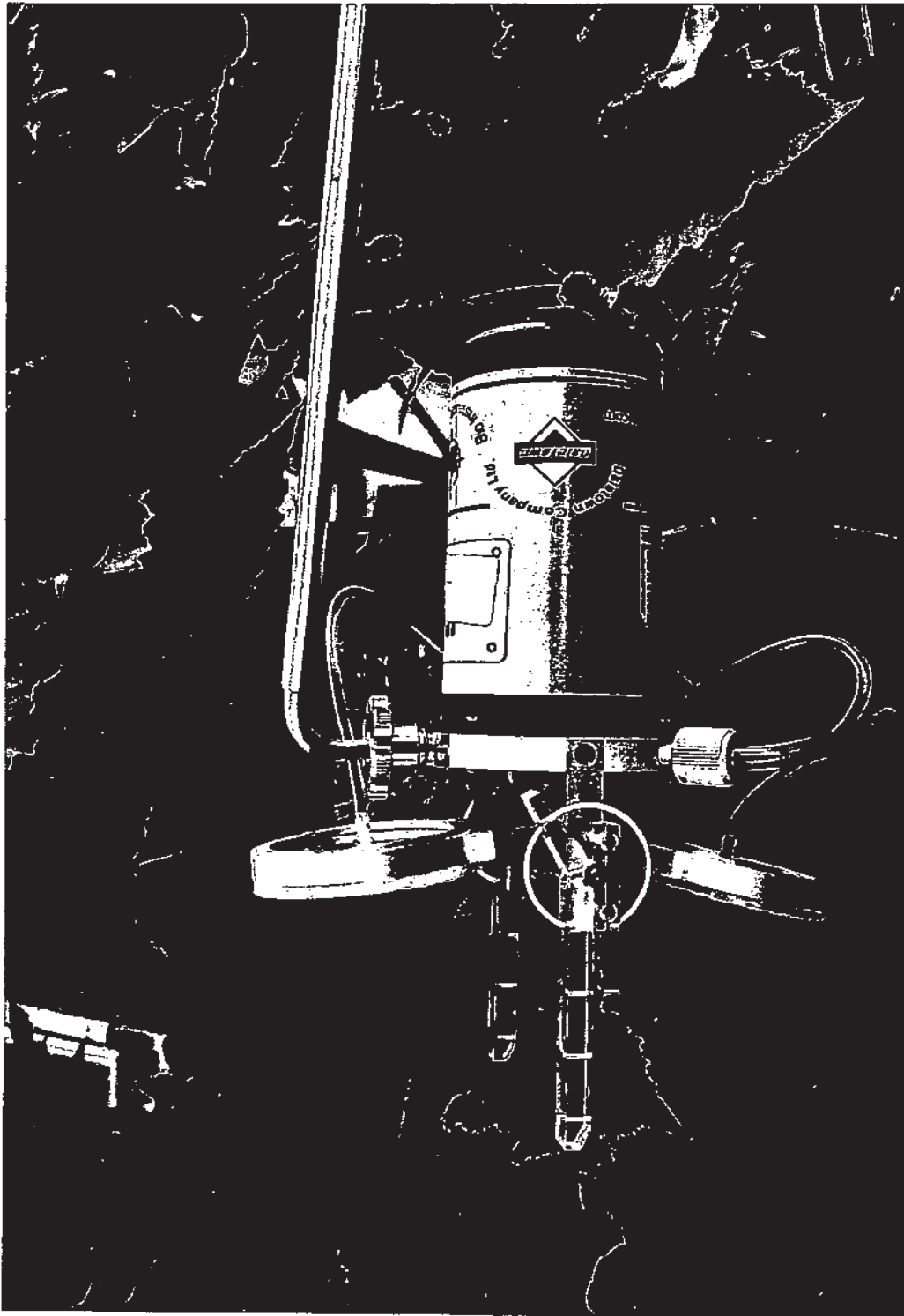


FIG. 3A



FIG. 3B

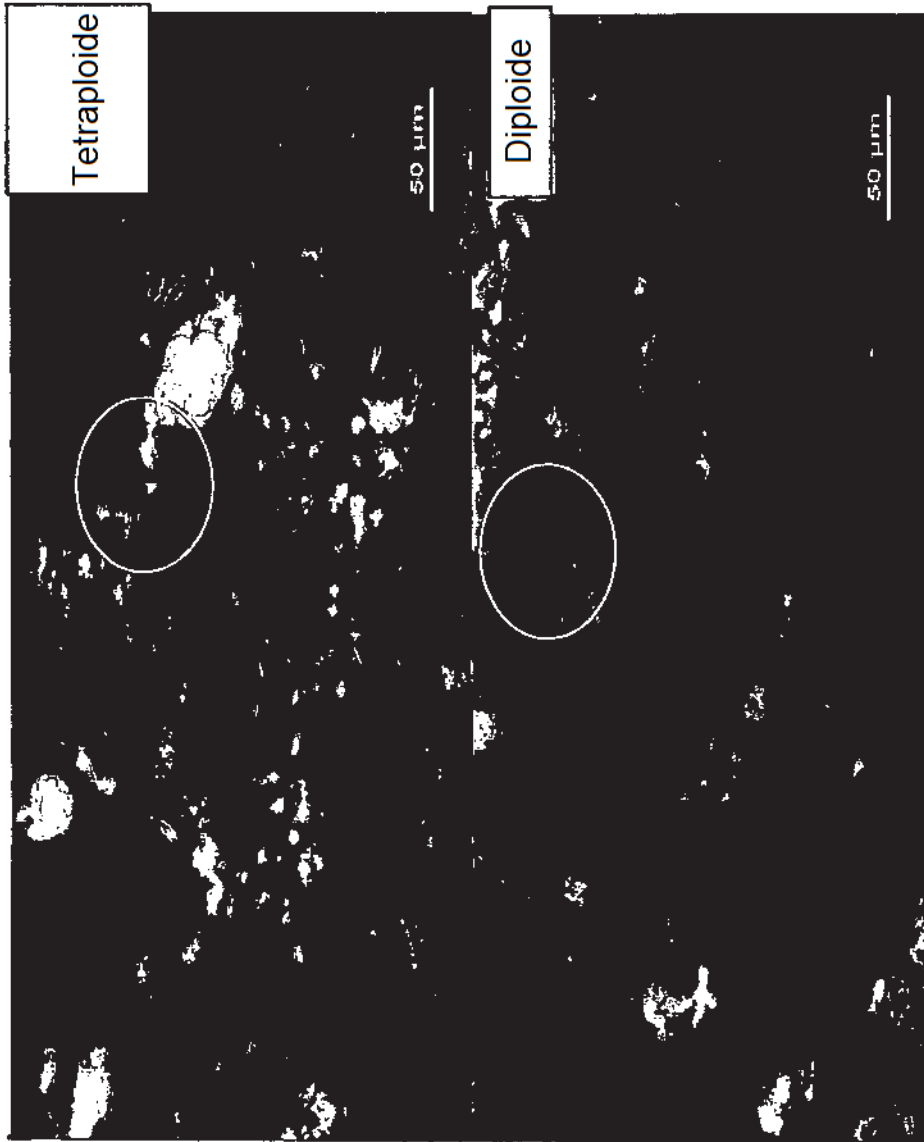
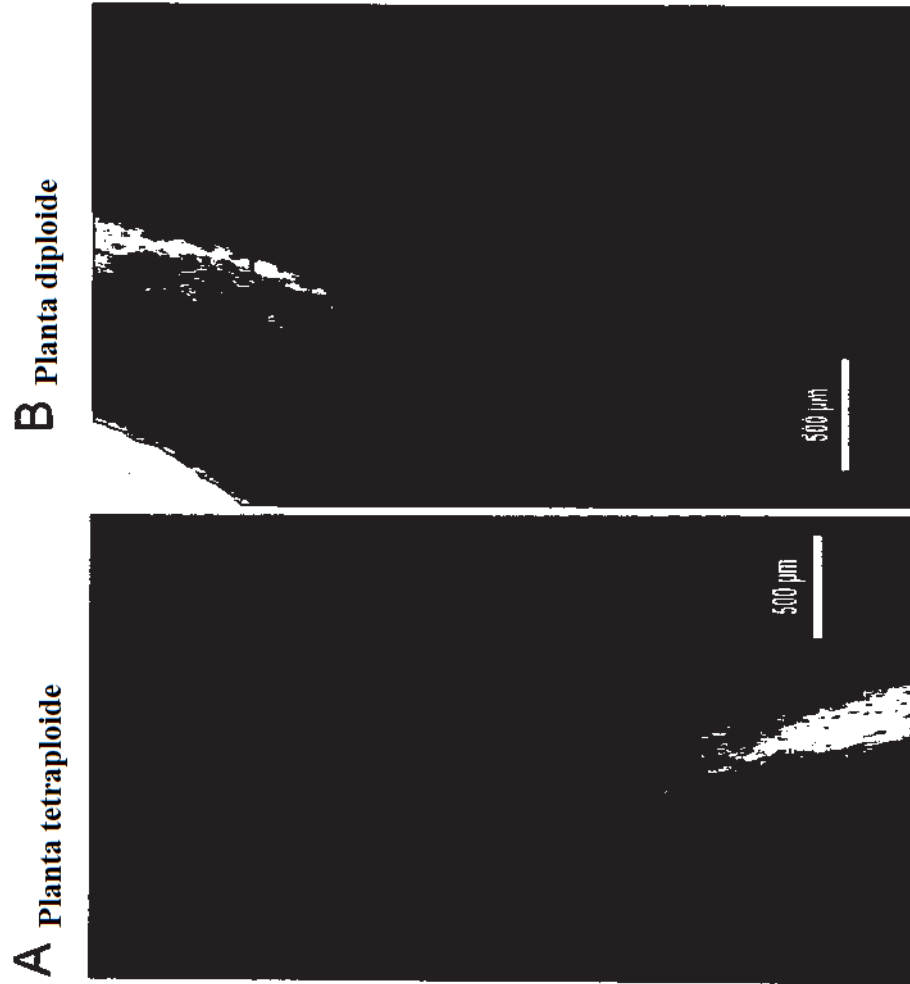


FIG. 4



**FIG. 5A-B**



FIG. 6