

Capítulo 15

Variabilidad y selección de poblaciones generadas in vitro

J. A. Mariotti*

* Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina.

Introducción

El cultivo de tejidos y células vegetales *in vitro* se ha considerado frecuentemente como una alternativa frente a los métodos convencionales de mejoramiento genético en especies de importancia económica. Esta alternativa requiere de algún mecanismo capaz tanto de generar variabilidad genética *in vitro* como de regenerar plántulas a partir de dichas variantes genéticas.

En la caña de azúcar, por ejemplo, el cultivo de células *in vitro* permite inducir, por lo menos en algunos casos, una variabilidad genética seleccionable, la cual está asociada con 'mosaicos cromosómicos' que presumiblemente se presentarían en algunas variedades o clones (Heinz et al., 1971). A partir de tales variantes cromosómicas se pueden regenerar plantas de diferente constitución genética, las cuales se estabilizarían en poblaciones capaces de reproducirse en forma agámica y que serían, eventualmente, susceptibles de selección por sus características cualitativas o cuantitativas de interés agronómico.

Una serie de supuestos permitirán formular un modelo biométrico con su correspondiente interpretación; partiendo de él, una población de la naturaleza antes descrita se caracterizaría por los efectos genéticos y ambientales determinantes de la expresión fenotípica individual.

Cabe mencionar que algunas variantes fenotípicas seleccionables, especialmente en las primeras etapas de la reproducción clonal, pueden no estar asociadas con efectos genéticos estables; es el caso de los llamados efectos clonales o efectos 'C', de determinación probablemente extracromosómica, que tienden a desaparecer en el curso de algunas generaciones de reproducción asexual. Es muy posible que, en la determinación de los fenotipos, los efectos 'C' se sumen y se confundan con los efectos genéticos estables, afectando consecuentemente las estimaciones del valor fitotécnico potencial de las poblaciones así originadas.

Estimación del Grado de Determinación Genética

La falta de variabilidad genética en una población se traduce en una determinación genética nula, lo cual descalifica cualquier intento de seleccionar tipos superiores en ella; en este caso, la totalidad de la variación observada se puede atribuir a efectos ambientales aleatorios no susceptibles de selección dirigida.

La expresión fenotípica individual se puede definir con un modelo biométrico simple según la expresión 1:

$$X_{ij} = \mu_0 + G_i + E_{ij} \quad (1)$$

Los términos de la ecuación representan lo siguiente:

X_{ij} = la expresión fenotípica individual del genotipo i en un réplica cualquiera j ;

μ_0 = el parámetro de la posición poblacional (media) para el carácter investigado;

G_i = el efecto particular del genotipo i que afecta por igual a todas las réplicas de dicho genotipo, y se expresa como desvío respecto de la media poblacional;

E_{ij} = el efecto ambiental asociado con la réplica j del genotipo i ; es un efecto particular de cada réplica en cada genotipo, y se expresa también como un desvío respecto de la media poblacional.

Tanto los efectos G_i como los E_{ij} se suponen aleatorios en este modelo, que entonces se autodefine como de tipo II (Steel et al., 1980).

El efecto G_i es, en realidad, una resultante de efectos genéticos y extra-genéticos; los efectos genéticos estables que componen la expresión fenotípica resultan del balance de los efectos aditivos, de dominancia y epistáticos sobre el carácter en cuestión. A estos efectos genéticos estables deben sumarse efectos genéticos de estabilidad relativa, referidos a la interacción genotipo-ambiente.

El componente G_i del modelo biométrico incluye también los efectos 'C' que son de relativa inestabilidad aunque, por lo general, de tendencia definida; estos efectos 'C' interfieren con la expresión del componente genético, afectando la capacidad de diagnóstico y el pronóstico de las técnicas biométricas.

Hechas estas consideraciones generales, se acepta que la varianza fenotípica poblacional (σ^2_P) está compuesta por una porción correspondiente a la variabilidad aportada por el componente G_i y por otra porción atribuible al E_{ij} ; estos términos constituyen la expresión (2):

$$\sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_E \quad (2)$$

donde:

σ^2_G = la variación genotípica, la cual puede estar acrecentada por los efectos 'C', cuando éstos ocurran.

σ^2_E = la variabilidad no seleccionable, de origen ambiental.

En (2) no hay una manera directa de estimar la σ^2_G . En cambio, se puede estimar la σ^2_E con distintas aproximaciones y con diferentes grados de confiabilidad.

Los pesos relativos de los componentes de la variación determinan el grado de determinación genética (GDG), a veces mencionado como la 'heredabilidad en el sentido amplio' (h^2).

$$\text{GDG} = h^2 = \sigma^2_G / \sigma^2_P \quad (3)$$

En el caso de que ocurran efectos 'C', la expresión (3) se puede interpretar como un límite superior o máximo para el GDG, lo cual afectará la eficiencia de esta estimación en una magnitud desconocida.

Caso 1: una sola repetición por genotipo

En el caso de que la población cuente con una sola repetición por genotipo, la varianza se puede interpretar sólo en términos de la σ^2_P ; y se requiere, en consecuencia, un estimador independiente (testigo) de la varianza ambiental.

En materiales reproducidos clonalmente, uno o varios clones independientes se pueden repetir en forma aleatoria, conjuntamente con la población base; en este caso, para estimar la variación ambiental es preferible (aunque no excluyente) utilizar como clon testigo el mismo clon madre replicado. En cualquier caso, se debe suponer que la variación ambiental (σ^2_E), estimada a partir de los clones testigo repetidos, representa bien la variación ambiental que realmente se ha producido en la población; esta suposición no sería necesariamente correcta si han ocurrido variaciones espontáneas, p.ej., una mutación. La estabilidad relativa respecto a las variaciones del ambiente es también una cualidad genética que caracteriza y diferencia a muchos genotipos.

Con estas limitaciones, la σ^2_G poblacional puede entonces estimarse mediante la expresión (4):

$$\sigma^2_G = \sigma^2_P - \sigma^2_E \quad (4)$$

donde:

σ^2_E = estimación independiente de la variación ambiental a que están sometidos los integrantes de la población investigada.

Esta es una manera sencilla, aunque extremadamente rudimentaria, de estimar la σ^2_G poblacional de un carácter cuantitativo; la confiabilidad

depende en este caso de cuán eficientemente se haya estimado la σ^2_G con los procedimientos descritos. El ejemplo que sigue sirve para ilustrar el manejo de esta información.

Ejemplo: subclones de caña de azúcar. A partir de cultivos in vitro, se obtuvo una población de subclones de caña de azúcar de la variedad NA 56-79; se desea investigar la posibilidad de que en estos materiales se haya inducido variabilidad genética con respecto a la característica 'contenido de sacarosa'.

Los subclones se han reproducido en parcelas experimentales únicas, y el clon madre (NA 56-79) se ha intercalado con repeticiones en el mismo experimento. Tanto en la población base, cuya probable variabilidad se desea analizar, como en el clon madre utilizado como testigo, se hicieron controles del contenido de sacarosa por los métodos convencionales de laboratorio. Los datos, analizados estadísticamente, permitieron estimar los parámetros de posición y dispersión que se consignan en el Cuadro 15.1.

Cuadro 15.1. Estadísticos de posición y dispersión del rendimiento sacarino en el clon madre y en subclones de caña de azúcar del cultivar NA 56-79.

Estadísticos	Clon madre	Subclones
Media ^a	11.52 (μ_C)	10.82 (μ_D)
Varianza	0.6337 (σ^2_E)	1.4659 (σ^2_P)
Desviación estándar	0.7960 (σ_E)	1.2107 (σ_P)
Coefficiente de variación	0.0691 (CV_E)	0.1119 (CV_P)

a. Del rendimiento o contenido de sacarosa, medido en porcentaje.

FUENTE: Ploper et al., 1978.

Con los resultados experimentales que presenta el cuadro mencionado se pueden estimar la varianza genética poblacional (σ^2_G) y el grado de determinación genética (GDG) para el carácter en cuestión, empleando las expresiones (3) y (5), respectivamente.

$$\begin{aligned} \sigma^2_G &= 1.4659 - 0.6337 = 0.8322 \\ \text{GDG} &= 0.8322 / 1.4659 = 0.5677 ; \text{GDG, \%} = 56.8\% \end{aligned}$$

Si en el carácter analizado se presentase una correlación entre medias y varianzas poblacionales, en la estimación de la σ^2_E podría proponerse una corrección para referirla a la media poblacional que corresponda, haciendo para ello uso de la siguiente expresión:

$$\begin{aligned}\sigma^2_E \text{ (corregida)} &= \sigma^2_E (\mu_0/\mu_C)^2 \\ &= 0.6337 (10.82/11.52)^2 = 0.5590\end{aligned}$$

Con esta nueva aproximación, la variación debida al genotipo (σ^2_G) y el grado de determinación genética (GDG) serían:

$$\begin{aligned}\sigma^2_G &= \sigma^2_P - \sigma^2_E = 1.4659 - 0.5590 = 0.9069 \\ \text{GDG} &= 0.9069/1.4659 = 0.6187; \text{GDG, \%} = 61.87\%\end{aligned}$$

A partir de las estimaciones de la σ^2_G puede estimarse también el coeficiente de variación genética (CV_G), que relaciona la variabilidad genética de la población con la media poblacional.

Continuando con el ejemplo, se usará la última estimación de la σ^2_G poblacional como punto de partida para calcular la desviación genética estándar (σ_G), y a partir de ésta calcular el coeficiente de variación (CV_G).

$$\begin{aligned}\sigma_G &= \sqrt{\sigma^2_G} = \sqrt{0.9069} = 0.9523 \\ CV_G &= \sigma_G/\mu_0 = 0.9523/10.82 = 0.088 ; CV_G, \% = 8.8\%\end{aligned}$$

A partir de los coeficientes de variación, existe otra forma de estimar el GDG mediante la expresión (5):

$$\text{GDG} = (CV_G/CV_P)^2 \quad (5)$$

El grado de determinación genética (GDG) permite describir la varianza que no se puede explicar por los efectos ambientales como una proporción de la varianza total existente en la población; por lo tanto, tiene valor para el diagnóstico en la investigación del potencial fitotécnico de la población base.

Caso 2: se repiten los genotipos de la población

En este caso, se supone que cada uno de los genotipos K_1 que integran la población investigada desde el punto de vista de su potencial fitotécnico ha sido repetido K_2 veces en un diseño experimental apropiado.

Sobre la base del mismo modelo biométrico expuesto en el Caso 1, el efecto G_1 se mide ahora a partir del promedio de las K_2 repeticiones distribuidas aleatoriamente en un diseño experimental definido. Las repeticiones tienden a reducir el error de la interacción genotipo-ambiente (en lo que se refiere a efectos microambientales), y reducen, parcialmente, algunos de los efectos 'C'.

Por otra parte, se puede emprender una estimación más directa y confiable de la σ^2_E , por cuanto ahora participan en dicha estimación los K_1 genotipos investigados en lugar de uno solo o de unos pocos genotipos independientes como lo requería la situación expuesta en el Caso 1. La σ^2_E , como estimación, está condicionada a las variaciones micro y macroambientales, como se comentó anteriormente.

La repetición de los genotipos y el uso de un diseño experimental permiten realizar un análisis convencional de la varianza. La varianza total del experimento puede separarse en efectos independientes atribuibles a diferentes causas. Las diferencias 'entre genotipos' y 'entre repeticiones de un mismo genotipo' permiten una estimación más ajustada de los parámetros supuestamente genéticos y ambientales que determinan la expresión fenotípica.

Ejemplo: subclones de caña de azúcar repetidos. Se supone una población constituida por 90 (K_1) genotipos (subclones) obtenidos a partir de cultivos in vitro de la variedad NA 56-79, dispuestos en un experimento completamente al azar, con 2 repeticiones (K_2) por entrada. El carácter investigado es el mismo del ejemplo anterior, o sea, el contenido de sacarosa. En el Cuadro 15.2 se presentan los resultados obtenidos en un análisis de varianza convencional, al que se han agregado los valores esperados de las varianzas respectivas.

Cuadro 15.2. Análisis de la varianza y esperanzas de los cuadrados medios en subclones de caña de azúcar de la variedad NA 56-79.

Causas de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios	Esperanza de los cuadrados medios
Entre genotipos	$K_1 - 1 = 89$	$(CM_1) = 2.3728$	$\sigma^2_E + K_2 \sigma^2_G$
Entre repeticiones dentro de los genotipos	$K_1(K_2 - 1) = 90$	$(CM_2) = 0.5590$	σ^2_E
Total	$K_1 \cdot K_2 - 1 = 179$		

Igualando los cuadrados medios con sus respectivas esperanzas en términos biométricos, se pueden estimar las variaciones de origen ambiental y de presunto origen genético:

$$\sigma^2_E = CM_2 = 0.559$$

$$\sigma^2_G = (CM_1 - CM_2)/K_2 = \frac{2.3728 - 0.559}{2} = 0.9069$$

de donde resultaría nuevamente la estimación del GDG a partir de (3).

$$\sigma_P = \sigma_G^2 + \sigma_E^2 = 0.9069 + 0.559 = 1.4659$$

$$\text{GDG} = \sigma_G^2 / \sigma_D^2 = \frac{0.9096}{1.4659} = 0.6187 ; \text{GDG, \%} = 61.87\%$$

Este ejemplo ha sido preparado de tal manera que en ambos casos se obtengan estimaciones idénticas del GDG y se facilite así la ejemplificación en el tema siguiente. En la práctica, en este segundo caso se espera obtener una estimación del GDG menor que en el caso de la réplica única, debido a la ya explicada tendencia de las repeticiones a neutralizar tanto los efectos de la interacción genotipo-ambiente como algunos efectos 'C'.

Selección y Progreso Genético

La detección de la variación residual no explicada por causas ambientales, y que presuntamente tiene causas genéticas estables, permite ejercer algún tipo de selección dirigida en la población en cuestión. Mediante este proceso selectivo, se pretende conservar los genotipos más convenientes y descartar aquéllos que no concuerdan con los objetivos del mejoramiento genético.

Existen técnicas biométricas simples para pronosticar el éxito de la selección en términos del progreso genético esperado; están basadas en algunos supuestos adicionales respecto a la distribución de los componentes del fenotipo.

La expresión (6) describe la respuesta esperada (R) a la selección, en función del diferencial de selección (S) y del grado de determinación genética (GDG):

$$R = \text{GDG} \cdot S \quad (6)$$

El diferencial de selección ($S = \mu_s - \mu_0$) expresa la media fenotípica de los individuos seleccionados en la población como desvío de la media poblacional antes de iniciarse el proceso selectivo. La respuesta a la selección ($R = \mu_1 - \mu_0$) expresa, también en términos de desvío respecto de la media poblacional original, la media de la población en la generación siguiente a la selección (Figura 15.1).

Si se realiza un experimento de selección en la población original (G_0) y se observa la respuesta real en la siguiente generación (G_1), se pueden conocer los verdaderos valores de S y de R, y a partir de éstos determinar,

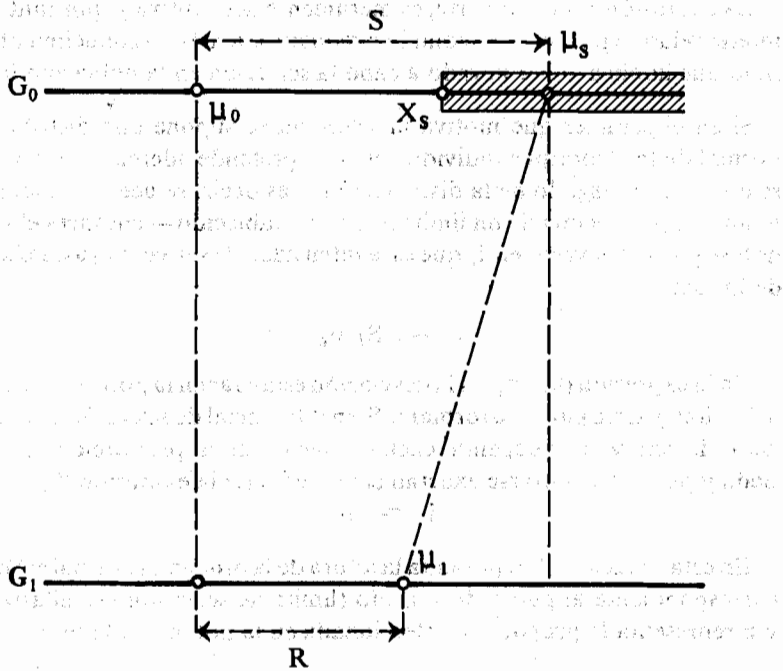


Figura 15.1. Medias, diferencial de selección y respuesta. El área sombreada (línea superior) indica la porción seleccionada en la población base.

G_0 = generación 0, en la que ocurre la selección.

G_1 = generación siguiente a la de selección.

μ_0 = media poblacional en la G_0 .

μ_S = media de los fenotipos seleccionables en la G_0 .

μ_1 = media poblacional en la G_1 , suponiendo ausencia de interacción genotipo-ambiente.

X_S = límite de selección y punto de truncado.

S = diferencial de selección.

R = respuesta a la selección.

mediante la expresión (7), lo que se conoce como 'grado de determinación genética liberado' ($GDGR$). Este expresa la verdadera determinación genética que la población sometida a selección pone de manifiesto:

$$GDGR = R / S \quad (7)$$

La expresión 6, por su parte, es meramente descriptiva y, por tanto, de interés relativo para el seleccionador; requiere además un conocimiento de S , lo que implica haber llevado a cabo la selección en la población base.

Si en el carácter que motiva la selección se supone una distribución normal de los fenotipos individuales, y se pretende además efectuar una selección por sesgado de la distribución —es decir, se aceptan todos los fenotipos por encima de un límite inferior establecido— entonces el valor de S se puede convertir en i , que es la intensidad de selección ya que ésta se define así:

$$i = S / \sigma_p \quad (8)$$

En la expresión (8), σ_p es la desviación estándar en la población base de selección, y sirve para transformar a S en diferencial de selección estandarizado, i . Este valor i depende exclusivamente de la proporción seleccionada y puede encontrarse exactamente mediante la expresión (9):

$$i = hp \quad (9)$$

En esta ecuación, h representa la altura de la ordenada normal estándar correspondiente al punto de sesgado (límite de selección estandarizado) y p representa la proporción seleccionada en la población base.

Para las presiones de selección más usuales, tales como 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30% y 50%, los valores de i son respectivamente los siguientes: 2.892, 2.665, 2.063, 1.755, 1.400, 1.159 y 0.798.

Esta particularidad de i permite transformar la expresión descriptiva de la respuesta a la selección en una expresión de pronóstico, si se admite una cierta presión selectiva teórica. El progreso se puede valorar en forma cuantitativa, lo que permite comparar situaciones experimentales y procedimientos de selección diferentes. Las expresiones (10) y (11) pronostican los progresos absolutos y relativos esperados de la selección.

$$R = i \cdot \text{GDG} \cdot \sigma_p \quad (10)$$

$$R, \% = i \cdot \text{GDG} \cdot \text{CV}_p, \% \quad (11)$$

De estas expresiones, donde CV_p es el coeficiente de variación fenotípico de la población base, se puede inferir que, al menos en principio, se esperarían mayores progresos por selección en las siguientes condiciones:

- a. Cuando se aplican presiones selectivas relativamente mayores, lo que por sí solo determinaría el crecimiento de i .
- b. Cuando el GDG efectivo sea mayor, lo que está determinado por un CV_G relativamente elevado.

- c. Cuando la variabilidad fenotípica de la población base sea mayor, lo que asegura una mayor discriminación con respecto a los efectos de la selección.

No obstante, esta expectativa de progreso no se cumple necesariamente por varias razones, que no serán analizadas aquí; ese hecho determinaría un desajuste entre los progresos esperados y aquéllos verdaderamente logrados por la selección.

Ejemplo: progreso esperado de la selección en subclones de caña de azúcar. De acuerdo con los datos consignados en el Cuadro 15.1, la característica 'contenido de sacarosa' de la caña de azúcar presenta, en la población base, una media $\mu_0 = 10.82$ y una desviación $\sigma_P = 1.2107$.

Por otra parte, en la población se había establecido, para esta característica, un residuo de variabilidad que no se puede explicar solamente por efectos ambientales aleatorios, y que, cuando sea determinado por efectos genéticos estables, permitirá una selección efectiva de la población en cuestión. El GDG estimado en la población base fue de 0.6187.

Si se establece una presión selectiva tal que permita conservar el 10% de los mejores fenotipos (respecto al contenido de sacarosa) se pueden estimar el progreso absoluto y el relativo que, con respecto a la media de la población base, se esperan de dicha selección. Como se vio anteriormente, a una selección propuesta del 10% corresponde un valor de intensidad de selección $i = 1.755$, si se supone que hay una distribución normal del carácter objeto de la selección. Se pueden entonces efectuar estas estimaciones empleando las expresiones (10) y (11), así:

$$R = 1.755 \times 0.6187 \times 1.2107 = 1.315$$

$$R, \% = 1.755 \times 0.6187 \times 11.19 = 12.15\%$$

El primer resultado (1.315) indica el valor absoluto que, como desvío respecto a la media poblacional, se espera después de aplicar en la siguiente generación clonal el criterio selectivo en cuestión. La media esperada (μ_1) en la generación G_1 equivaldría entonces a la media inicial más ese desvío.

$$\mu_1 = 10.82 + 1.315 = 12.135 \quad (12)$$

El segundo resultado obtenido (12.15%) expresa la misma ganancia, pero con relación a la media poblacional. Esta segunda expresión (donde $CV_P = 0.1119$ puede indicarse como $CV_P \cdot 100$ o como $CVP, \%$) permite una comparación directa entre los resultados pronosticados para diferentes procedimientos de selección, e incluso para diferentes características, cosa que no sería posible hacer con el valor absoluto del progreso genético.

Una dificultad que se presenta frecuentemente en este tipo de investigación es la comparación con el testigo (por ejemplo, el clon madre). En ocasiones, es deseable conocer la frecuencia relativa de los subclones que superan al testigo, o el progreso esperado cuando se toma como límite de selección la media del testigo.

En el Cuadro 15.1 se consigna la media del clon madre (var. NA 56-79), el cual se utilizó como testigo en el experimento que se describe ($\mu_C = 11.52$). La frecuencia relativa de los fenotipos que en la población base superen esta media se halla fácilmente con la ayuda de cualquier tabla de áreas de la distribución normal estandarizada, en el supuesto de que la distribución del carácter sea normal (Fisher et al., 1963). El procedimiento consiste en una transformación 'z', calculando este valor z mediante la expresión (13) y hallando el área correspondiente en la tabla antes descrita.

$$z = (\mu_C - \mu_0) / \sigma_P \quad (13)$$

$$= (11.520 - 10.082) / 1.2107 = 0.578$$

En la tabla de áreas, el valor de z calculado corresponde a un área de 0.7183 (valor encontrado por interpolación); esta área pertenece a la extrema izquierda de la población. Con respecto al área total, que se considera igual a la unidad, el área hallada deja, hacia la derecha de la distribución, otra área de 28.17% aproximadamente; ésta corresponde al porcentaje seleccionado, si el criterio de selección ha sido descartar todos los fenotipos que no alcancen, por lo menos, el valor medio del testigo.

Para una presión selectiva de esta magnitud se puede calcular exactamente la intensidad de selección, i, haciendo uso de la expresión (8). Sin embargo, se puede lograr una aproximación razonable con el método gráfico (Falconer, 1981), con el cual se obtiene, para este caso, un valor $i = 1.25$ (aproximadamente).

Sustituyendo ahora valores en las expresiones (10) y (11) se obtienen los resultados siguientes:

$$R = 1.25 \times 0.6187 \times 1.2107 = 0.936$$

$$R, \% = 1.25 \times 0.6187 \times 11.19 = 8.65\%$$

Estos valores tienen idéntica interpretación que los anteriores, excepto por la menor presión selectiva utilizada (28.2% frente al 10% utilizado en el primer caso); esta diferencia explica los menores progresos absolutos y relativos que se alcanzan con el criterio selectivo propuesto.

Cabe mencionar finalmente la relativa confiabilidad que le atribuye el fitotecnista a estas estimaciones basadas en modelos biométricos teóricos. Ya se dijo anteriormente que es frecuente observar desajustes significativos entre los progresos esperados en virtud de estas consideraciones teóricas y los progresos realmente alcanzados en la práctica de la selección; esta falta de concordancia provendría de una de estas dos causas:

- a. Una falla de los modelos biométricos o genéticos propuestos —o de ambos— para la interpretación de la expresión fenotípica; si se comprueba, debe conducir a una investigación de la eficacia de tales modelos y, eventualmente, a la formulación de modelos alternativos más realistas, aunque no necesariamente más complejos.
- b. Una segunda causa, en el supuesto de que los modelos sean correctos, es una deficiente estimación de los parámetros poblacionales e individuales; esta falla puede corregirse mejorando la calidad del experimento, que está asociada, la mayor parte de las veces, con el uso de diseños apropiados y de poblaciones y muestras de tamaño mayor.

La aplicación de las ideas de la genética biométrica ha contribuido notablemente, en los últimos 30 años, al conocimiento de la expresión y estabilidad de los caracteres cuantitativos, y también al progreso del mejoramiento genético convencional. Es evidente que tales ideas serán también de gran utilidad en la caracterización y en el aprovechamiento de nuevas aproximaciones al mejoramiento genético, como las descritas en esta obra.

Referencias

- Falconer, D. S. 1981. Introduction to quantitative genetics. Longman Group, Londres. 340 p.
- Fisher, E. A. y Yates, F. 1963. Tablas estadísticas para investigadores. Aguilar, Madrid. 131 p.
- Heinz, D. J. y Mee, G. W. P. 1971. Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. Amer. J. Bot. 58:257-262.
- Ploper, L. D. y Mariotti, J. A. 1978. Variabilidad en subclones obtenidos de cultivos de tejidos en caña de azúcar. Rev. Ind. Agric. (Tucumán) 55:59-64.
- Steel, R. G. D. y Torrie, J. H. 1980. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. McGraw-Hill, Nueva York. 633 p.