

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO FACULTAD DE AGRONOMÍA

ÁREA DE FRUTICULTURA

TALLER DE LICENCIATURA

**INFLUENCIA DE DISTINTOS CULTIVARES DE PALTO
(*Persea americana* Mill.), COMO POLINIZANTES DEL
CULTIVAR HASS EN CINCO ZONAS DE CHILE.**

MARÍA SUSANA ROMERO LARIOS

QUILLOTA CHILE
1996

ÍNDICE DE MATERIAS

1. INTRODUCCIÓN

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. ANTECEDENTES GENERALES DE LA ESPECIE.

2.2. FLORACIÓN.

2.3. GRUPOS FLORALES.

2.3.1. INFLUENCIA DE LOS FACTORES CLIMÁTICOS.

2.3.1.1. TEMPERATURA.

2.3.1.2. HUMEDAD ATMOSFÉRICA.

2.3.1.3. VIENTO.

2.4. POLINIZACIÓN, FECUNDACIÓN Y CUAJA.

2.5. POLINIZACIÓN E INSECTOS POLINIZANTES.

2.6. POLINIZANTES Y SU UTILIZACIÓN EN

PLANTACIONES

DE PALTO.

2.7. ABSCISIÓN DE FRUTA Y LA INFLUENCIA DEL

PARENTAL

DONADORDE POLEN.

2.8. ISOENZIMAS Y SU UTILIZACIÓN EN TÉCNICAS

ELECTROFORÉTICAS.

2.9. ELECTROFORESIS, ISOENZIMAS Y SU USO

ESPECÍFICO

PALTOS COMO MARCADORES GENÉTICOS.

3. MATERIAL Y MÉTODO.

3.1. ORIGEN Y RECOLECCIÓN DEL MATERIAL.

3.2. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA.

3.3. EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA.

3.3.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS PARENTALES.

3.3.2. IDENTIFICACIÓN DE LA PROGENIE.

- 3.4. PREPARACIÓN DE LOS CELES.
 - 3.5. ELECTROFORES.
 - 3.6. TINCIÓN DE ENZIMAS.
 - 3.7. INTERPRETACIÓN DE LAS BANDAS EN LOS GELES.
 - 3.8. ANÁLISIS DE DATOS.
 - 4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.
 - 4.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARENTALES.
 - 4.1.1. CARACTERÍSTICAS Y PATRONES
ELECTROFORÉTICOS DE CADA ISOENZIMA.
 - 4.1.1.1. LAP-2.
 - 4.1.1.1.2. TPI.
 - 4.1.1.1.3. 6-PGD.
 - 4.1.1.1.4. SKDH.
 - 4.1.1.1.5. MDH.
 - 4.1.1.1.6. GOT.
 - 4.1.1.1.7. PGI.
 - 4.1.1.1.8. PGM.
 - 4.2. DETERMINACIÓN DEL .POLEN PARENTAL EN
PROGENIE.
 - 5. CONCLUSIONES.
 - 6. RESUMEN.
 - 7. BIBLIOGRAFÍA CITADA.
- ANEXO

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo del palto (Persea americana Mill.) ha tenido un sostenido aumento en superficie en los últimos años, debido a las posibilidades de venta que brindan los mercados extranjeros y la creciente difusión de sus propiedades alimenticias e industriales (GARDIAZABAL Y ROSEMBERG, 1991).

En Chile, existen, actualmente, alrededor de diez mil hectáreas plantadas con paltos, de las cuales el cultivar Hass, supera el 60%; esta es la variedad preferida por el principal importador de paltas chilenas, Estados Unidos, que en la temporada 94/95 abarcó más del 95% de nuestras exportaciones de paltas (GARDIAZABAL, 1995)*.

Dada la gran trascendencia que tiene este cultivar dentro de la industria de paltas de nuestro país, resalta la importancia de buscar estrategias que permitan optimizar su producción.

Atendiendo al hecho de que el palto presenta producciones irregulares y, generalmente, se aprecian problemas a nivel de polinización, resulta de gran interés encontrar alternativas que permitan obtener una mayor cantidad de fruta.

GARDÍAZÁBAL, F. Ing. Agr. 1995. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. Comunicación Personal.

Los problemas de polinización están referidos al comportamiento floral *que* posee el palto, que si bien tiene flores completas, presenta el fenómeno de dicogamia protogínea, madurando a destiempo los verticilios sexuales, lo que se traduce en una menor probabilidad de autopolinización de las flores. Se suma a esto, el hecho de poseer dos tipos de florea en las distintas variedades: A y B, las cuales se diferencian en los tiempos de apertura floral, siendo complementarias para una adecuada polinización.

Por ello se ha postulado la necesidad de intercalar cultivares complementarios en cuanto a floración para lograr así un máximo de polinización y, por lo tanto, una buena producción. Sin embargo, se ha visto que el comportamiento floral no es estricto y está fuertemente influenciado por las condiciones climáticas. Se sabe que bajas temperaturas causan un retardo en la apertura floral, lo que incrementa la posibilidad de autopolinización (SEDGLEY Y GRANT, 1983). Por otra parte, bloques compactos de una sola variedad pueden llegar a generar buenas cosechas (DEGANI y GAZIT, 1984).

Es por esto que surgen interrogantes, por una parte, respecto de la influencia que ejercen ciertos polinizantes sobre el cultivar Hass y, por otra, en relación de la eventual existencia de un mejor polinizante para la variedad Hass, adornando la condiciones

Para evaluar la influencia de distintos cultivares en la polinización, es necesario contar con técnicas que permitan determinar la procedencia del polen que origina cada fruto. Esta información permite conocer los rangos de autopolinización y de polinización cruzada y puede ser obtenida a través de la técnica de electroforesis a embriones de frutos, utilizando isoenzimas como marcadores genéticos.

Dado el comportamiento floral que posee el palto, se puede esperar que exista una variación entre los porcentajes de autopolinización y polinización cruzada dependiente de las condiciones en que se encuentre el huerto.

En el presente estudio, se plantea un análisis enzimático de frutos obtenidos en huertos con distintas condiciones climáticas, en cinco zonas productoras del país, cuyos objetivos son:

- Determinar el origen del polen parental que fecunda las flores de Hass en cada una de las combinaciones, mediante la caracterización de isoenzimas presentes en los embriones de los frutos.
- Establecer los porcentajes de autopolinización y polinización cruzada a partir de los frutos del cultivar Hass en cada combinación.
- Determinar la variación en los porcentajes de polinización cruzada y de autopolinización a medida que aumenta la distancia de la fuente donadora de polen.
- Determinar el origen del polen parental que origina la fruta en huertos del cultivar Hass, sin polinizante cercano, en cuatro zonas climáticas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Antecedentes de producción de la especie.

La falta de producción y añerismo son fenómenos que se presentan con mucha frecuencia en paltos, lo que interfiere continuamente en la producción de los huertos (ROSEMBERG Y GARDÍAZÁBAL, 1987). Este problema que atañe a diversas zonas productivas a nivel mundial como Australia, California, Florida e Israel (SCHOLEFIELD, SEDGLEY y ALEXANDER, 1985).

El ciclo de producción bianual consiste en que un año se produce una gran cantidad de flores y frutas, y al año siguiente, la floración se presenta pobre y la producción baja, debido a un aumento en el nivel de giberelinas provenientes del exceso de fruta, lo que inhibe la inducción (SCHOLEFIELD, SEDGLEY y ALEXANDER, 1985; CAUTÍN, 1988; GARDÍAZÁBAL Y ROSEMBERG, 1991). La producción bianual puede también estar relacionada con el nivel de carbohidratos del árbol; ocurre una alta acumulación de carbohidratos durante el invierno, determinando una buena producción en la temporada y una baja acumulación de carbohidratos para la temporada siguiente (SCHOLEFIELD, SEDGLEY y ALEXANDER, 1985). La baja producción, en cambio, se presenta en los huertos a pesar de existir una alta floración (CAUTÍN, 1988; ROSEMBERG y GARDÍAZÁBAL, 1987).

Un palto maduro origina alrededor de un millón de flores cada floración; sin embargo, sólo unos pocos cientos de flores originan fruta (DEGANI, GOLDRING y GAZIT, 1989; WOLSTENHOLME, 1990; CALABRESE, 1992). El porcentaje de flores que llega a fruta madura varía entre 0,001 y 0,23%, lo que determina cosechas impredecibles y usualmente bajas (SEDGLEY, 1980). A pesar de que el porcentaje de flores cuajadas necesario para obtener una buena cosecha es relativamente pequeño, en muchas ocasiones no se logra alcanzar esta cuaja mínima (BERGH, 1967; GARDÍAZÁBAL Y ROSEMBERG, 1991). Las actuales producciones (5,6 a 21,5 ton/ha) caen muy por debajo del máximo teórico estimado de 32,5 ton/ha (WOLSTENHOLME, 1986).

El palto es una especie muy poco eficiente en cuanto a cuaja. En durazneros, perales o manzanos, cuaja una flor de cada 6 ó de cada 10, mientras que, en palto, se obtiene una buena producción cuando cuaja una de cada mil flores que abren (GARDÍAZÁBAL y ROSEMBERG, 1991) .

Un problema mayor en la producción de paltas, es el alto rango de fruta caída, especialmente durante el mes siguiente a la polinización, aunque alguna abscisina durante todo el período de desarrollo (SEDGEY, 1987). Luego, la cuaja no es una buena medida de la producción (DAVENPORT y LAHAV, 1992).

2.2. Floración.

La floración ocurre en primavera a partir de las yemas provenientes del crecimiento de la primavera o el verano anterior (THORP, ASPINAL y SEDGLEY, 1993). Se ha sugerido que una mayor cantidad de frutos proviene del crecimiento de verano (CALABRESE, 1992).

Las flores van dispuestas en una inflorescencia llamada panícula (GARDÍAZABAL y ROSEMBERG, 1991), la cual puede ser axilar o terminal, y posee aproximadamente 200 flores (RODRÍGUEZ, 1982).

La yema terminal de la inflorescencia es mixta, es decir, origina un brote y flores. La inflorescencia termina normalmente en una yema vegetativa, la cual, salvo que el brote sea muy débil o que el árbol se haya debilitado después de floración, empezará a crecer emitiendo hojas (GARDÍAZABAL y ROSEMBERG, 1991).

Las flores son completas, es decir, poseen androceo, gineceo, cáliz y corola (CALABESE, 1992; GARDÍAZABAL y ROSEMBERG, 1991); son pequeñas, 0,5 a 1,5 cms. de diámetro cuando están completamente abiertas, de color amarillo verdoso y densamente pubescentes (ÓCHESE *et al.*, 1965; CALABRESE, 1992). El periantio está formado por tres sépalos y tres pétalos, cada uno de los sépalos se encuentra opuesto a un estambre interno. Rodeando al gineceo se encuentran tres estambres con dos nectarios en la base de cada uno e intercalados

por tres estaminodios. Hacia el exterior, se encuentran seis estambres que no poseen nectarios (BECKEY, 1989).

El gineceo consta de un carpelo simple (OSUNA, 1982). El estilo es delgado y el estigma es lobulado (BERGH, 1969). El ovario es supero y posee un único óvulo, blanco y pubescente (OSUNA, 1982).

La duración de la floración varia entre cultivares de 1 a 8 meses, pero en la mayoría de las variedades, tiene una extensión de 2 a 3 meses (PAPADEMETRIOU, 1976). La gran extensión de la floración se debe a que el periodo de inducción que ocurre durante el otoño dura dos o tres meses (WOLSTENHOLME, 1990).

Al cuajar las primeras flores de la inflorescencia, las que teóricamente abrirían después, se caen. El palto tiene yemas de reserva bajo la inflorescencia, que pueden o no ser emitidas. Al inhibirse la apertura de las flores apicales por cualquier tipo de daño, como por ejemplo helada, puede emitir flores más basales, lo que parece ser un mecanismo del árbol para regular la carga y evitar el alto gasto energético de un proceso de diferenciación innecesario (GARDÍAZABAL y ROSEMBERG, 1991).

Cuando culmina el proceso de floración, ya se ha producido la fecundación y las primeras divisiones celulares del embrión. En este

momento, el fruto alcanza el estado fenológico del cuajado y comienza el proceso de desarrollo del fruto (RODRÍGUEZ, 1982). El fruto cuajado es altamente sensible a las condiciones ambientales y cualquier condición adversa puede determinar su caída o en algunos casos puede originar que éste se desarrolle sin semilla (SCHROEDER, 1954).

2.3. Grupos florales.

Las flores del palto presentan un fenómeno llamado dicogamia protoginea que determina un doble ciclo de apertura; es decir, las partes femenina y masculina de la flor maduran a destiempo (BERGH, 1969). Cuando una flor abre inicialmente, el estigma está receptivo y las anteras no están dehiscentes, después de permanecer abiertas por varias horas, las flores cierran y vuelven a abrir durante el día siguiente. Esta vez, el estigma está seco y no receptivo, pero las anteras están maduras (VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND, 1985). De cierta forma, la planta trata de que la flor no cuaje por efecto de su mismo polen (GARDÍAZÁBAL y ROSEMBERG, 1991). Este comportamiento es idealmente sincronizado entre todas las flores que abren en un mismo árbol y un mismo cultivar (BERGH, 1969); VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND, 1985).

Además, las distintas variedades de palto pueden ser clasificadas en dos grupos, A y B, según sus tiempos de apertura floral, cuya

sincronización de estados femenino y masculino permiten que ocurra polinización cruzada (BERGH,1969; ROBINSON y SAVAGE, 1926).

En las variedades tipo A, las flores abren primero al estado femenino en la mañana, actuando exclusivamente como hembras, con el estigma receptivo y las anteras sin producir polen. El pistilo está erecto y sobresaliente y el estigma brillante, blanco y receptivo en apariencia (esta etapa corresponde a la fase I). Luego cierran completamente y reabren al estado masculino en la tarde del día siguiente (VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND, 1985; BECKEY, 1989; GARDÍAZÁBAL y ROSEMBERG, 1991) . Durante la segunda apertura (fase II) de la flor, el aspecto ésta es totalmente diferente, el pistilo aparece pardo y deshidratado y las anteras son la estructura sobresaliente (BRINGHURST, 1952).

Al comenzar el estado masculino, el polen queda rápidamente disponible y se observa adherido a las valvas y alejándose en masas. Éste no se adhiere a los estigmas desecados (DAVENPORT, 1989).

En cultivares tipo B, las flores abren al estado femenino en la tarde, luego cierran y reabren al estado masculino en la mañana del día siguiente (GARDÍAZÁBAL y ROSEMBERG, 1991). Existe una estrecha relación entre el estado I de las flores tipo A y la apertura al estado TI de las flores tipo n (PAPADEMETRIOU, 1976).

Este

comportamiento floral complementario tiende a promover la polinización cruzada (VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND, 1985).

Sin embargo, la dicogamia es rara vez absoluta y la autopolinización suele ocurrir; por ende, la fruta puede provenir tanto de polinización cruzada como de autopolinización (DEGANI Y GAZIT, 1984). Se ha observado que una gran cantidad de estigmas permanecen blancos durante la segunda apertura floral (DAVENPORT y LAHAV, 1992), y que su número varía según el cultivar (PAPADEMETRIOU, 1976)

SCHROEDER (1954) reporta que el polen transferido por contacto directo de las anteras al estigma en el estado floral masculino, podría germinar y penetrar el estigma; no obstante, DAVENPORT y LAHAV (1992) señalan que aunque es posible la autopolinización de flores al estado masculino, el tubo polínico no crece bajo esas condiciones.

Durante la segunda apertura, la fertilidad de los órganos femeninos es muy baja (SEDGLEY y GRANT, 1983). La aparición de tejido calloso en el pistilo podría estar reduciendo la viabilidad de ciertas sustancias necesarias para la germinación del tubo polínico y contribuyendo, así, a la esterilidad del estado floral masculino (SEDGLEY, 1977b).

2.3.1. Influencia de los factores climáticos:

2.3.1.1. Temperatura:

El ciclo floral se encuentra fuertemente influenciado por las condiciones climáticas; cualquier cambio en el clima afecta la continuidad, regularidad y secuencia del ciclo floral (STOUT, 1923; BERGH, 1969).

Cuando a la apertura floral le precede un día frío y con alta humedad por la noche y estas condiciones se mantienen durante la apertura, se produce una completa inversión del ciclo normal de apertura en cultivares tipo A, es decir, la liberación del polen ocurre en la mañana y los órganos femeninos están receptivos en la tarde. En cultivares tipo B, en cambio, bajo condiciones ambientales similares, las flores no abren completamente y puede ocurrir una completa omisión del estado femenino (LESLEY y BRINGHURST, 1952; BERGH, 1975; SEDGLEY, 1977a). La omisión del estado femenino puede alcanzar un 90% (SEDGLEY, 1987) .

Bajas temperaturas durante floración han mostrado coincidir con una cuaja pobre (SEDGLEY, 1977a), lo que puede resultar en una alta producción al año siguiente y un ciclo de alternancia (SEDGLEY y GRRNT, 1983). Se ha visto, además, una prolongación del ciclo floral a más del doble del largo normal, la antesis ocurre muchas veces durante la noche. Esto puede reducir la polinización y la cuaja, ya

que los insectos polinizantes no están activos durante la noche (SEDGLEY, 1987) .

Los cultivares de tipo A, como Hass, responden mejor a bajas temperaturas que los de tipo B. Todas las flores presentan estado femenino, pero con una larga extensión del ciclo floral (GARDIÁZABAL y ROSEMBERG, 1991; COETZER y ROBERTSE, 1987). SEDGLEY y GRANT (1983) observaron que los cultivares tipo B tienen menores producciones que los de tipo A con bajas temperaturas. En un ensayo realizado por los autores, todos los cultivares tipo A y sólo un cultivar tipo B, mantuvieron su fertilidad medida como penetración del óvulo por el tubo polínico bajo condiciones de baja temperatura.

Durante el tiempo frío, se producen cortos periodos de traslape entre el estado floral receptivo y el polen maduro, permitiendo la autopolinización (ROBINSON y SAVAGE, 1926). Según GARDIÁZABAL y ROSEMBERG (1991), a mediodía, se produce un sobrecubrimiento de flores de diferente estado y mientras más fresco y nublado sea el clima, más parece encontrarse un estado con otro. El traslape no ocurre cuando prevalecen temperaturas más altas durante el mediodía (ROBINSON y SAVAGE, 1926).

Ensayos realizados por SEDGLEY (1977a) reportan que la temperatura tiene un gran efecto en todos los aspectos de producción de fruta; a

17°C durante el día y 12°C durante la noche, se produce un retraso en el crecimiento del tubo polínico y el desarrollo embrional. A 33°C en el día y 28°C en la noche, el desarrollo reproductivo se ve superado por el crecimiento vegetativo, incidiendo en el tamaño de las partes florales y generando un crecimiento anormal del tubo polínico, resultando en una abscisión de flores y frutos recién cuajados. Condiciones cálidas y secas, pueden, además, desecar las flores impidiendo la polinización (BECKEY, 1989).

La temperatura óptima para el crecimiento del tubo polínico en la mayoría de las variedades es de 25°C (GARDÍAZÁBAL y ROSEMBERG, 1991) . Un desarrollo normal del ciclo floral y un crecimiento del tubo polínico, fertilización y desarrollo de fruto ocurren con temperaturas de 25°C durante el día y 20°C en la noche, según reportaron SEDGLEY y ANNELS, (1981) .

2.3.1.2. Humedad atmosférica:

LESLEY y BRINGHURST (1952) señalaron que, bajo las condiciones de California, las abejas melíferas son muy importantes para la cuaja y que su actividad se ve afectada por la humedad atmosférica y las bajas temperaturas.

La humedad atmosférica tiene una importancia significativa en la polinización dada por el grado de receptividad del estigma. Al

producirse una disminución de la humedad atmosférica por sobre un 50%, los líquidos estigmatices comienzan a decaer lo que limita la germinación de los granos de polen, llegando a inhibirla por completo (CALABRESE,1992).

Existe una relación entre la deposición de polen y las condiciones de humedad dada, especialmente, por la condición secante del aire. Cuando la humedad relativa se mantiene alta (80-95%) y los vientos son ligeros (menos de 14,4 Km/hr), la superficie estigmática tiende a mantenerse blanca durante la II apertura. Cuando los días son ventosos o se presentan frentes fríos y secos (40-75% HR) o con vientos superiores a 25.2 Km/hr, los estigmas se secan rápidamente durante la segunda apertura, e incluso durante la primera. Cuando las condiciones ambientales son de alta humedad, no es necesario que haya una transferencia de polen entre los estados I y II, ya que la autopolinización puede ocurrir durante la segunda apertura de la flor (DAVENPORT, 1989).

En días cubiertos, se produce un retraso del estado femenino de ambos tipos de flores por sobre tres horas. Esto significa, que en variedades del tipo B, el crecimiento del tubo polínico ocurre durante el atardecer, cuando las temperaturas suelen ser demasiado bajas para su desarrollo (SEDGLEY, 1977a).

2.3.1.3. Viento:

El viento es otro importante factor climático que incide en la cuaja (CHANDLER, 1962). Vientos superiores a los 10 Km/hr limitan el vuelo de las abejas e influyen negativamente en la fecundación si son secos y deshidratantes (RODRÍGUEZ, 1982). Además, si los vientos son fríos pueden reducir el crecimiento del tubo polínico (BECKEY, 1989) .

Vientos fríos costeros pueden originar pequeñas variaciones de temperatura a nivel de huerto determinando, que en huertos no protegidos, las flores no cuajen y haya muy poca fruta (GARDÍAZÁBAL y ROSEMBERG, 1991).

Estudios han reportado un considerable beneficio del uso de cortinas cortavientos de variedades polinizantes. Esto origina un microclima de las filas adyacentes, que favorece tanto el vuelo de las abejas como el desarrollo del tubo polínico. Debido a que el polen del palto es pesado y pegajoso, el estudio realizado no sugiere al viento como agente primario en el movimiento del polen (BECKEY, 1989).

2.4. Polinización, fecundación y cuaja.

La producción de paltas depende de una exitosa inducción, diferenciación, polinización y cuaja. Cualquier problema que altere

alguno de estos procesos, tendrá un efecto detrimental en la producción no pudiendo ser resuelto a través de manejos posteriores (GARDÍAZÁBAL y ROSEMBERG, 1991). La polinización conduce a la fertilización y ésta determina el éxito de la formación de fruta en la mayoría de los cultivos. En el palto, donde existe un mecanismo de polinización abierta, la falta de polinización puede limitar la formación de fruta, así como es posible que, aumentando la polinización, se produzca una mayor cantidad de fruta (VTTHANAGE, 1990) .

La polinización no siempre garantiza fecundación, ya que no todos los granos de polen que germinan en el estigma logran que sus tubos polínicos lleguen al ovario (PAPADEMETRIOU, 1975b). El número de tubos polínicos en el pistilo depende en gran medida del parental femenino. Por ejemplo, el cultivar Reed tiende a tener relativamente pocos granos de polen germinando sobre el estigma, mientras que Bacon tiene un gran número (SEDGLEY, 1979b).

El tiempo que tarda el tubo polínico en alcanzar el ovario es un importante factor por considerar a nivel de producción, ya que si el rango de crecimiento del tubo es muy lento, el óvulo puede no estar en una condición apropiada de fertilidad cuando es alcanzado por el tubo (PAPADEMETRIOU, 1975b) . Este crecimiento está sujeto a un evidente control genético; sin embargo parece ser más dependiente

del parental femenino (SEDGLEY, 1979a). Según la autora, los cultivares A tienden a tener un mayor número de óvulos penetrados que los de tipo B.

Si la polinización es adecuada y se depositan en el estigma muchos granos de polen, la variación en el crecimiento del tubo polínico no será ningún problema, pero bajo condiciones inadecuadas de polinización, en que hay pocos granos de polen sobre el estigma, la variación en el crecimiento del tubo polínico puede afectar la producción (PAPADEMETRIOU, 1975b).

Existen, por otro lado, diferencias en cuanto a la fertilidad femenina (GARDÍAZABAL y ROSEMBERG, 1991). El tamaño del estigma varía entre cultivares y, al parecer, estigmas más grandes presentan un mayor porcentaje de receptividad (PAPADEMETRIOU, 1976). SEDGLEY (1978) reportó diferencias en cuanto a la fertilidad femenina entre las variedades Fuerte y Hass dada por una mayor proporción de sacos embrionales defectuosos, lo que resultó en una menor cantidad de fruta fertilizada postpolinización de la variedad Fuerte.

Estudios realizados por SEDGLEY (1979a), realizando cruzamientos dirigidos con los cultivares Edranol, Ryan, Hass, Talbot, Jalva, Fuerte, Bacon y Sharwil, muestran que no hay evidencia de incompatibilidad sexual entre el grano de polen y el pistilo.

A

excepción del cultivar Bacon, como parental femenino, todos presentaron compatibilidad cruzada. No hay diferencia entre el polen de una misma variedad, de una variedad del mismo grupo o de una de tipo complementario. Según la autora, aunque existe la posibilidad de mal funcionamiento del proceso de fertilización y aborto del y óvulo o del endosperma, los resultados sugieren que el genotipo del polen no es de primera importancia.

2.5. Polinización e insectos polinizantes.

Generalmente, son las abejas las que llevan el polen de una flor a otra (GARDÍAZÁBAL y ROSEMBERG, 1991). Ellas visitan sus flores para alimentarse del néctar (RUEHLE, 1963). Este hecho permite manipular la polinización a través de la adición de colmenas al huerto durante la floración (VITHANAGE, 1990).

A pesar de que las flores del palto son poco atractivas, verde amarillentas y suelen confundirse con el follaje (VITHANAGE, 1990), la introducción de abejas beneficia la producción aun cuando existe sólo una variedad presente en el huerto, esto debido a que existe la posibilidad de que el polen de las flores al estado II colectado por abejas, quede adherido a ellas y sea viable por varias horas, permitiendo que flores del mismo árbol o cultivar sean polinizadas durante el estado I (BECKEY, 1989) .

Al analizar los granos de polen portados por las abejas de un huerto de paltos, es posible ver que la mayoría proviene de otros cultivos presentes en el área, especialmente, cítricos (VITHANAGE,1990).

Se ha visto en algunos estudios recientes, que el polen no muere rápidamente, teniendo una viabilidad cercana a las 72 horas, lo que permite la ocurrencia de autopolinización por medio de abejas (PAPADEMETRIOU ,1975a). Según PAPADEMETRIOU (1975a), el polen permanece activo durante 566 días, cuando las temperaturas varían de 20,6 a 32,8°C y la humedad relativa es de 57 a 63%. A 4°C y 23% de humedad relativa, puede conservarse casi un mes (SEDGLEY y ANNELS, 1981). Luego, la baja productividad que se observa en los paltos no puede ser atribuida al polen, aun cuando las condiciones ambientales sean desfavorables (CALABRESE, 1992).

La eficiencia de las abejas en la polinización es mayor cuando existe traslape entre los estados masculino y femenino, ya que éstas tienden a visitar las flores entre las 11:00 y las 14:00 hrs, tiempo en que suelen encontrarse ambos estados en los árboles (BERGH, 1967).

Es también posible lograr un aumento de la polinización cruzada al introducir abejas al huerto, ya que éstas visitan más variedades de

paltos en huertos mixtos (VITHANAGE, 1990). Al respecto, GARDÍAZÁBAL y ROSEMBERG (1991) señalan que el éxito de una buena polinización cruzada está dado por una buena dosis de abejas por hectárea.

BERGH (1967) afirma que las abejas son el principal agente polinizante en paltos y descarta la posibilidad de que el polen se movilice por viento o por gravedad. BECKEY (1989) señala que el polen del palto es demasiado pesado y pegajoso para poder ser llevado por el viento; sin embargo, al monitorear la polinización y la cuaja sobre ramas encerradas en bolsas, se vio que el transporte de polen fue similar dentro y fuera de ellas. Esto estaría determinando que un adecuado porcentaje de estigmas del palto reciben polen por transferencia directa o a través de insectos visitantes.

Por otro lado, al analizar el polen de seis variedades, se determinó que este no es adhesivo, sino cohesivo, debido a la humedad que presenta en la dehiscencia, y que al secarse puede ser dispersado sobre el estigma adyacente. Luego, bajo estas condiciones la autopolinización resulta ser el mecanismo principal de polinización (DAVENPORT y LAHAV, 1992). Sin embargo, inflorescencias cubiertas con bolsas muestran una pequeña proporción de pistilos con tubos polínicos, ya que las bolsas no permiten la llegada de polen externo a las flores. El porcentaje de pistilos que presentan tubos

polínicos en el interior de las bolsas, puede deberse a que flores cambiando al estado masculino liberen algo de polen producto del movimiento de las bolsas por el viento. La proporción de pistilos que poseen tubos polínicos es mucho mayor en las flores que no han sido cubiertas por bolsas, lo que evidencia la importancia de la visita de los insectos para la efectiva transferencia de polen (VITHANAGE, 1990) .

VITHANAGE (1990) señala que, al introducir 2 colmenas por hectárea se obtuvo un significativo aumento del número de frutos por árbol (ver Anexo 1). Sin embargo, no hubo una diferencia significativa en el peso promedio de la fruta. Por otro lado, al aumentar la densidad de colmenas de 2 a 3, no se observó un incremento significativo de la cantidad de fruta, pero si creció significativamente el peso promedio de la fruta, lo que puede estar relacionado con una mayor oportunidad de polinización cruzada.

2.6. Polinizantes y su utilización en plantaciones de palto.

El comportamiento floral del palto tiende a promover la polinización cruzada. (VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND, 1985; BECKEY, 1989). Por esta razón, para asegurar una adecuada polinización y aumentar la producción, se recomendaba la plantación de cultivares complementarios en un mismo huerto. (DEGANI, GOLDRING y GAZIT, 1989;

GUSTAFSON, 1967), basado en el hecho de que cuando cultivares complementarios son plantados adyacentes o intercalados a nivel de huerto, las producciones son significativamente más altas (DEGANI, GOLDRING y GAZIT, 1989).

Con frecuencia, ha sido utilizada la plantación de cortinas de variedades polinizantes para dar polen a la variedad principal. También se ha intentado el injerto de parte de la variedad principal con la variedad polinizante; no obstante, esto suele generar problemas como el sobrecrecimiento de la variedad principal o polinizante (BECKEY, 1989).

Al elegir la variedad polinizante, se debe asegurar que ambos cultivares se traslapen en el periodo de floración para lograr una absoluta coincidencia de los estados masculino y femenino de los dos cultivares (SEDGLEY, 1979a). No obstante, debido al largo periodo de floración que presentan, en general, las distintas variedades, este aspecto no resulta ser un problema real al momento de elegir la variedad (BECKEY, 1989). Según el autor, la principal consideración al seleccionar el cultivar complementario debiese ser el valor comercial de su fruta. Desde que la variedad Hass superó a las otras en importancia, el precio que han obtenido variedades como la Bacon, no ha logrado siquiera cubrir sus costos de cosecha en muchas ocasiones.

Un alto porcentaje de híbridos no necesariamente determina una alta producción; con todo, se puede asumir que un sustancial aumento en el rango de polinización cruzada iría en beneficio de un significativo incremento de la producción (DEGANI, GOLDRING y GAZIT, 1989). Los polinizantes que originan un alto porcentaje de híbridos, también pueden incrementar producciones bajo condiciones de huerto (DEGANI y GAZIT, 1984).

La influencia del uso de variedades polinizantes puede variar según las condiciones climáticas imperantes el huerto. En años en que se produce un alto rango de traslape entre los estados I y II, puede haber poca necesidad de tener polinización cruzada. Sin embargo, en años en que las temperaturas ocasionan una gran separación entre el estado femenino y masculino de la flor, resulta fundamental contar con cultivares de ambos grupos florales en el huerto. Este argumento avala la plantación de árboles polinizantes para asegurar la plantación en años en que no ocurre traslape de estados (BECKEY, 1989) .

En diversos estudios realizados por BERGH y colaboradores (BERGH y GUSTAFSON, 1958; BERGH y GARBER, 1964; BERGH et. als., 1966), destinados a determinar el efecto de interplantar cultivares complementarios, los autores verificaron que cuando diversos cultivares eran plantados adyacentes a un cultivar complementario,

los rendimientos obtenidos eran significativamente mayores. Ellos concluyen que la polinización cruzada era la principal causa del aumento en la producción.

BERGH (1968) recomendó, para aumentar la polinización cruzada, que las ramas de ambas variedades estuvieran muy juntas e idealmente se traslaparan. Según BERGH et al. (BERGH, 1968; BERGH y GUSTAFSON, 1958), el efecto de la variedad polinizante estaba limitado a la primera hilera adyacente a ésta, especialmente a aquellos árboles que presentaban los brazos traslapados. Él, incluso, concluyó que una distancia de 100 metros podía garantizar la total ausencia de polinización cruzada.

Los estudios citados, no obstante, estuvieron limitados a diferencias en cuanto a producción, ya que no se contaba entonces con un método que permitiera determinar los rangos de polinización cruzada (VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND, 1985, GOLDRING; DEGANI y GAZIT, 1987) .

Ensayos realizados por GUIL y GAZIT (1992) muestran que diferentes huertos de Hass vecinos a huertos de Ettinger, presentaron, durante cuatro años, una producción mayor en las hileras adyacentes a Ettinger, siendo significativo el efecto hasta los 18 metros de distancia. Según los autores, las hileras de Hass bordeando a los

Ettinger produjeron 17-20 ton/ha; a una distancia de 50 metros, la producción se redujo a 8-10 ton/ha, para disminuir a 5 ton/ha cuando la distancia fue de más de 50 metros. En este caso, se realizaron análisis con isoenzimas para confirmar el efecto de la polinización cruzada de Ettinger sobre Hass. Los resultados mostraron que un 90% de los frutos de Hass provenían de polen aportado por Ettinger, con lo cual se confirmó la debilidad de Hass como autopolinizante.

Según McGregor (1976), citado por VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND (1985), la polinización cruzada por abejas estaría limitada a distancias menores de 80 metros; sin embargo, ELLSTRAND (1992) señala que la polinización cruzada puede ocurrir a muchos metros de distancia de la fuente donadora de polen. VRECENAR-GADUS (1985), citado por BECKEY (1989), reportó que en un huerto de la variedad Hass ubicado a 76 metros de uno de Bacon, un 42,2% de la fruta provenía de polinización cruzada con Bacon.

Por otro lado, por muchos años ha sido bien conocido que es posible obtener buenas cosechas sin el beneficio de la polinización cruzada (DEGANI y GAZIT, 1984). Se ha visto que bloques compactos de una sola variedad, con una pequeña cantidad de abejas han mostrado una producción tan buena como los huertos interplantados con un cultivar complementario, (DAVENPORT y LA11AV, 1992; DEGANI, GOLDRING y GAZIT, 1989), ya que siempre es posible encontrar algún momento de

coincidencia de los estados femenino y masculino dentro de un mismo árbol o cultivar y, por lo tanto, una oportunidad para la autopolinización (SEDGLEY y ANNELS, 1981).

Al respecto, GARDÍAZÁBAL y ROSEMBERG (1991), señalan que a mediodía se produce en un mismo árbol un sobrecubrimiento de flores en diferentes estados y, por ende, con óptimas temperaturas y una buena cantidad de abejas, se puede plantar bloques compactos de una sola variedad sin necesidad de considerar otros cultivares para la polinización.

El hecho de que los estados masculino y femenino se encuentren, incluso, dentro de una misma inflorescencia (GARDÍAZÁBAL y ROSEMBERG, 1991; VITHANAGE, 1990; DAVENPORT, 1989; SEDGLEY y GRANT, 1983), permite que la fruta pueda resultar de autopolinización o de polinización cruzada (DEGANI y GAZIT, 1984). Sin embargo, PAPADEMETRIOU (1976), señala que sólo en las variedades tipo A es posible que los estados femenino y masculino se encuentren en el mismo árbol y que el grado de traslape varía según cultivar.

Según VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND (1985), es posible que las buenas producciones las cuales se logran en huertos de Hass aislados se deban a que árboles complementarios están aportando polen desde distancias considerables o a que dentro del mismo huerto haya

árboles de otra variedad, árboles de semilla o árboles que al haber sido dañados por heladas u otra causa, hayan rebrotado desde el patrón.

Se ha visto en California, que las zonas donde son obtenidas las menores producciones de palta, coinciden exactamente con aquéllas en que no es posible ver otra variedad que Hass en muchas millas a la redonda (ELLSTRAND, 1992).

2.7. Abscisión de fruta y la influencia del parental donador de polen.

Un mayor problema en la producción de paltas resulta el hecho de la gran cantidad de fruta que abscisiona después de la polinización. La mayor parte de ésta cae durante el mes siguiente a la polinización, pero otra lo hace durante todo el periodo de desarrollo (SEDGLEY, 1987). Luego, la cuaja no es una buena medida de la polinización (DAVENPORT y LAHAV, 1992).

Se conoce muy poco acerca de la regulación de la abscisión en palto. La mayoría de los trabajos realizados en el tema están orientados a aspectos fisiológicos y anatómicos (ADATO y GAZIT, citados por DEGANI et. als., 1986; SEDGLEY, 1980). Algunos estudios sugieren que existen mejores donadores de polen, al igual que una diferencia en la cantidad de fruta abortada dependiente del origen del polen

parental (VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND, 1985; DAVENPORT y LAHAV, 1992) .

La abscisión selectiva de frutos puede ser afectada por factores genéticos. El número de flores encontradas en el palto y la masiva abscisión de frutitos apuntan a la importancia de la tolerancia a las condiciones ambientales y la capacidad de competencia de los frutos sobrevivientes de un determinado cultivar (DEGANI, GOLDRING y GAZIT, 1989). Estudios recientes muestran que la supervivencia de los frutitos jóvenes es dependiente del parental donador de polen (DEGANI et. als., 1986; DEGANI y GAZIT, 1984) . Los genotipos del embrión y del endosperma pueden jugar un rol fundamental en la selección diferencial por la supervivencia (DEGANI y GAZIT, 1984).

Al analizar los porcentajes de polinización cruzada de distintas combinaciones, se ha observado una alta variabilidad en cuanto al rango de hibridación final. Ésta puede ser afectada en cualquier estado de la polinización, fertilización o abscisión de frutitos. La causa de esta variabilidad podría explicarse por la resistencia y capacidad de supervivencia conferida a través del polen parental (DEGANI y GAZIT, 1984) .

En árboles de Hass sujetos a polinización cruzada de Ettinger y Fuerte, la población de frutitos de Hass, un mes después de la

cuaja, correspondió en un 88% a autopolinización. Sin embargo, durante el desarrollo del fruto, la proporción de Hass autopolinizados disminuye, mientras aumenta el rango de polinización cruzada con Ettinger y tuerte. Al finalizar la abscisión de frutitos, la mayor parte de los frutos sobrevivientes corresponden a híbridos de Hass (alrededor de un 84% de híbridos). Este aumento en el porcentaje de híbridos resulta de una abscisión selectiva en la cual la progenie de Ettinger y Fuerte desplazó en ventaja a la progenie proveniente¹ de autopolinización de Hass. Además, la producción de frutos de Hass está significativamente correlacionada con el rango de polinización cruzada con Ettinger (DEGANI, GOLDRING y GAZIT, 1989).

Sobre un 90% de las flores y frutos pequeños que abscisionan durante la primera y segunda semana después del término de la floración no son fertilizados (SEDGLEY, 1987). Esto puede sugerir una polinización inadecuada y falta de fertilización. Todos los frutos abscisionados durante la cuarta semana seguida al término de la floración, en cambio, habían sido fertilizados (SEDGLEY, 1980). Un mes después de la floración, toda la fruta caída presentaba desarrollo de embrión y endosperma normal (SEDGLEY, 1987).

La selectiva abscisión de frutos puede ser afectada por factores como la selección genética, sensibilidad a condiciones ambientales y la habilidad de competir con el crecimiento vegetativo y con frutitos vecinos (DEGANI, GOLDRING y GAZIT, 1989). Según SEDGLEY (1987), la competencia entre frutitos y entre los frutos y los "flush" de crecimiento vegetativo serían la causa de la elevada abscisión observada, ya que no se distingue una razón anatómica para la gran cantidad de fruta que abscisiona.

Según DAVENPORT y MANNERS (1982), citados por MUÑOZ y JANKIEWICZ (1984), normalmente, los frutos que caen presentan un oscurecimiento de la cubierta seminal, aunque existen frutos que presentan esta anomalía y persisten

hasta la cosecha. Los autores señalan que la descomposición de la cubierta seminal está asociada con la caída de frutos.

El anillamiento del pedúnculo del fruto es otra causa de caída prematura de un gran número de frutos y afecta a varios cultivares. Así, los frutos afectados temprano en la temporada se desprenden rápidamente, mientras que aquéllos en que el anillamiento del pedúnculo aparece más tarde, aunque no caen, presentan menor crecimiento 2 a 3 meses antes de la cosecha (MUÑOZ y JANKIEWICZ, 1984) .

Un estudio realizado por GANDOLFO (1995) destinado a determinar los porcentajes de polinización cruzada de frutos sobrevivientes con anillamiento del pedúnculo, mostró un alto porcentaje de frutos híbridos, lo que evidencia la superioridad de la fruta híbrida respecto a la autopolinizada, en cuanto al grado de retención que presenta la fruta con esta anomalía. Según la autora, los frutos provenientes de polinización cruzada reciben- en su material hereditario- información proveniente del parental donador de polen que les permite sobrevivir pese a tener anillamiento del pedúnculo y la cubierta seminal normalmente necrosada.

2.8. Isoenzimas y su utilización en técnicas electroforéticas.

Las moléculas de enzimas son proteínas específicas, codificadas por un gen, una sección de DNA cromosomal. El DNA es una copia patrón de un código que determina la secuencia de aminoácidos de proteínas constituyendo bloques, los cuales, en cambio, dictan las características de la proteína. Los genes son transmitidos a través de las células sexuales, y con raras excepciones no cambian o mutan a otras formas. Cuando se presenta una mutación, como ocurre para muchos casos en palto, la forma que ha cambiado es fielmente copiada y transmitida a la descendencia. La mutación puede resultar en una enzima con características detectablemente diferentes, especialmente en cuanto a la carga eléctrica neta (TORRES y BERGH, 1980).

Las proteínas están compuestas de aminoácidos, los cuales tienen carga positiva o negativa según sea su composición química. Por lo

tanto, la Carga neta que tiene una proteína depende de la composición de aminoácidos que la constituyen. A su vez, las diferentes formas de una proteína se deben a la substitución de un aminoácido por otro y por lo tanto, pueden determinar un cambio en la carga neta de ésta. Si bien, todas las substituciones originan un cambio en la carga neta de una proteína, muchas de ellas (30%) la producen. Este cambio puede ser detectado, debido a que, proteínas con diferente carga migran a diferente velocidad en un campo eléctrico, siendo ésta, la base de la técnica de electroforesis (EATON, 1995)*

La migración de las enzimas en un gel y la separación de las enzimas con diferentes cargas, resulta de la integración de la corriente eléctrica, el pH en el gel y el pH en la cámara del electrodo. La dirección (anodal o catodal) y el rango de migración de la enzima, depende del tipo de carga eléctrica (positiva o negativa) y la fuerza de la carga. Son necesarios muchos sistemas de gel para analizar el máximo de enzimas posible (CONKLE et. al., 1980).

Después que los geles han sido mantenidos por un tiempo suficiente en el campo eléctrico, las planchas de gel son cortadas en delgadas capas, las cuales son teñidas para detectar las diferentes enzimas. Las soluciones de tinción contienen substratos específicos para las enzimas, las cuales catalizan una determinada reacción. Los

EATON, L. C. Lic.Biol. M.S. 1995. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias. Comunicación personal.

productos de esta reacción son la base de los procesos de tinción (EATON, 1995)*'

Diferentes bandas sobre un mismo gel denotan moléculas funcionalmente relacionadas, que difieren en su carga eléctrica, las isoenzimas, las cuales se analizan por los rangos de segregación mendeliana. La electroforesis a embriones individuales resuelven modelos de bandeo diploides, producto del aporte de ambos parentales en su material hereditario (CONKLE et. al., 1980).

Las diferentes formas de una misma proteína se llaman Aloenzimas, y corresponden a diferentes alelos de un mismo gen. Estos diferentes alelos se acostumbra a identificarlos por números o letras, según su velocidad de migración; por ejemplo, F (Fast), para el alelo que especifica la migración anódica más rápida y S (Slow), para el que migra más lento. Cuando existen dos alelos, hay tres posibles genotipos diferentes: homocigoto para F, homocigoto para S o heterocigoto (CONKLE et al., 1980).

En una electroforesis, cuando un individuo es homocigoto para un gen, siempre presentará una banda. La posición de esta banda en el gel indicará para cual alelo es homocigoto. La unión de gametos que portan diferentes alelos produce un genotipo heterocigoto. Un individuo con genotipo heterocigoto puede producir diferentes tipos de gametos. Los heterocigotos producen proteínas diferentes, una para cada alelo. En una electroforesis, el número de bandas

observadas dependerá de la forma funcional de la enzima (EATON, 1995)* .

Cuando en una población todos los individuos son homocigotos para el mismo alelo, este gen invariante es llamado monomórfico, codificando una enzima que no presenta variación en su forma molecular, y en el gel se presentará como una sola banda en el mismo lugar para cada individuo; es decir, presenta sólo un alelo. Cuando los genes son variables y se presentan dos o más aleles, se dice que el gen es polimórfico, codificando enzimas que presentan variación en su forma molecular, evidenciándose en el gel dos o más bandas (EATON, 1995)*.

Se denominan alelos codominantes a aquéllos que carecen de relaciones dominantes y recesivos. Esto significa que cada alelo posee cierto grado de expresión cuando se encuentra en una posición heterocigota. EL genotipo heterocigoto origina un fenotipo bastante diferente de cualquiera de los fenotipos homocigotos (CONKLE et. al., 1980).

Cuando una enzima funciona con una sola unidad, se denomina enzima monomérica y en un gel los heterocigotos presentan dos bandas, una correspondiente a cada alelo. Las enzimas diméricas tienen dos unidades funcionales. Los heterocigotos pueden formarse con dos proteínas provenientes del mismo alelo o con una de cada una. Esta última es una especie de enzima híbrida, que presenta una movilidad intermedia a la de las bandas de los homocigotos en el gel. En este caso el heterocigoto presenta tres bandas (EATON, 1995)*.

*EATON, L.C. Lic.Biol. M.S. 1995. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias. Comunicación personal.

Algunas proteínas tienen isoenzimas, es decir, proteínas específicas con múltiples formas moleculares que cumplen la misma función, pero son producidas por otro. Esto se visualiza como sistemas separados en un mismo gel (EATON, 1995)*.

2.9. Electroforesis, isoenzimas y su uso específico en paltos como marcadores genéticos.

Las isoenzimas han sido utilizadas exitosamente como marcadores genéticos en muchos cultivos, incluyendo el palto (GOLDRING et. al., 1987; TORRES et. als, 1978; TORRES y BERGH, 1979; GOLDRING, GAZIT y DEGANI, 1987; TORRES, 1984 citado por GOLDRING, GAZIT y DEGANI, 1987), siendo especialmente apropiados para cultivos propagados clonalmente (ARULSEKAR y PARFIT, 1986). Cultivos con largos tiempos entre cada generación, tales como árboles frutales, resultan especialmente beneficiados con la técnica, debido a que evitan la espera hasta la madurez de la descendencia para evaluar los resultados de programas de cruzamiento de cultivos (TORRES, 1984, citado por VRECENARGADUS y ELLSTRAND, 1985).

*EATON, L.C. Lie. Biol. M.S. 1995. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias. Comunicación personal.

La técnica de isoenzimas permite también seleccionar donadores de polen promisorios para ser utilizados como polinizantes en los huertos (DEGANI y GAZIT, 1984). Como marcadores genéticos para resolver problemas de sistemática en paltos, documentación de párentales y discriminación de árboles de semilla en programas de hibridación, es también posible emplear esta técnica (TORRES y BERGH, 1980) . La identificación de cultivares se lleva a cabo habitualmente a través de caracterizaciones visuales y las variaciones observadas pueden deberse sólo a las condiciones ambientales y no a una real expresión de una variación genética (TRUSEIT y LEWIS, 1992) .

Sin embargo, las isoenzimas no han sido muy explotadas en árboles frutales y sólo se han reportado limitados estudios (TORRES, 1983). Este progreso limitado en el área, puede deberse a que existen ciertos problemas técnicos asociados a la extracción de enzimas activas desde los tejidos y probablemente a procedimientos inadecuados en los ensayos realizados (CARR y JOHNSON, 1980). Se ha detectado la presencia de compuestos fenólicos en los tejidos de especies perennes leñosas que interfieren con la extracción enzimática (LOOMIS, 1969; LOOMIS, 1974).

El hecho de que los paltos sean ricos en variación isoenzimática, permite que las isoenzimas sean utilizadas para realizar estudios de sistemática y de evolución en el palto (TORRES y BERGH, 1980)

Se han utilizado muchos sistemas isoenzimáticos en palto tanto en tejido foliar como mesocarpo. Las hojas son preferidas dado que su utilización permite trabajar con árboles antes de que la fruta esté disponible (TORRES, DIEDENHOFEN, BERGH y KNIGHT, 1978, citados por TORRES y BERGH, 1980).

TORRES et. als., (1978) introdujeron el uso de las isoenzimas en palto como marcadores genéticos para la caracterización de cultivares. Desde entonces, se ha utilizado también isoenzimas para determinar el origen de la descendencia y determinar los rangos de polinización cruzada entre cultivares (TORRES y BERGH, 1978a,b; DEGANI y GAZIT, 1984; TRUCEIT y LEWIS, 1992; TANSKLEY y ORTON, 1983a y b citados por VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND, 1985).

Las isoenzimas son un excelente marcador genético, debido a que normalmente están codificadas por alelos codominantes lo que permite que el parental donador de polen pueda ser identificado en la F1, si se conoce el genotipo de los parentales. Los modelos de electroforesis reflejan habitualmente el genotipo y no suelen ser afectados por condiciones ambientales (DEGANI y GAZIT, 1984; TRUCEIT

y LEWIS, 1992). Por lo tanto, para diferenciar la descendencia híbrida de la propia, la técnica de electroforesis con isoenzimas es de fundamental importancia (TRUCEIT y LEWIS, 1992).

Al analizar una enzima determinada en una población, se puede realizar asignaciones individuales de la progenie cuando los dos parentales son homocigotos diferentes (FF y SS). Cuando uno de los parentales es heterocigoto, las asignaciones pueden ser parciales. Si el parental masculino es heterocigoto, se puede identificar la mitad de los híbridos, y sólo un 25% en el caso de que el parental femenino sea heterocigoto. (DEGANI y GAZIT, 1984).

TORRES et. als., (1978) citados por TORRES y BERGH (1980), analizaron alrededor de treinta cultivares de palto. Los autores encontraron cuatro sistemas isoenzimáticos del mesocarpo (ADH, LAP, PGM y GOT), especificados por 10 genes con 20 alelos: ADH es dimérico y especificado por Adh-1 y Adh-2; LAP y PGM son monoméricos y cada uno codificado por dos genes: Lap-1 y Lap-2; Pgm-1 y Pgm-2. Las isoenzimas de Got-1 y Got-2 son diméricas; Got-3 y Got-4 se describen como monomórficas.

DEGANI y GAZIT (1984) discriminaron los porcentajes de polinización cruzada y autopolinización en un sistema cerrado que contenía dos cultivares complementarios de palto, analizando la población de

semillas. Para ello, los autores utilizaron la isoenzima Malato deshidrogenasa (MDH), a la cual señalaron como dimérica y codificada por los alelos F y S. No obstante, sus resultados muestran una gran variabilidad respecto a los porcentajes de híbridos esperados. Según señalaron, ésta variabilidad puede ser originada en algún estado de la polinización, fertilización o abscisión de fruta.

DEGANI, GOLDRING y GAZIT (1989) lograron también discriminar rangos de hibridación en bloques de paltos del cultivar Hass y Fuerte usando tres sistemas isoenzimáticos: MDH, LAP y TPI. Los autores reportaron que TPI es una enzima dimérica con los alelos F y S como los más comunes (también reportado por GOLDRING, GAZIT y DEGANI, 1987; VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND, 1985; DEGANI et. als., 1989). Señalan además a LAP-2 como una enzima monomérica con alelos F y S (también citado por TORRES y BERGH, 1980 y por DEGANI et. als., 1986), y a MDH como dimérica con alelos F y S. Ellos determinaron que la abscisión de frutitos es muy dependiente del parental donador de polen y que los frutos sobrevivientes de Hass eran, en su mayoría, frutos híbridos de Ettinger.

DEGANI, GOLDRING y GAZIT (1989) analizaron la distancia de influencia del polen parental de Ettinger, en el porcentaje de híbridos, advirtiendo que, a medida que la distancia aumentaba, el porcentaje de híbridos disminuía, alcanzando los menores valores

entre los 153 y 165 metros desde Ettinger. El rango más alto de polinización cruzada se encontró entre las hileras 3 y 5, alcanzando valores de 65%. Además, los autores observaron que la producción fue disminuyendo en la medida que aumentaba la distancia desde Ettinger.

DEGANI et. als. (1986) realizaron un estudio partiendo con una población de frutos autopolinizados de Ettinger obtenida a partir de árboles encerrados, analizando seis sistemas isoenzimáticos: LAP, GOT, PGM, TPI, MDH y ACP. En este ensayo, se concluyó que los rangos de segregación para LAP-2 variaban mucho de lo esperado, no obteniéndose ningún individuo con el genotipo SS para la isoenzima. Según los autores, la fruta con este genotipo posiblemente cuaja y luego abscisiona. Los autores señalan, además, no haber visualizado correlación entre los frutos pequeños y el genotipo para LAP-2.

La selección genética, que resulta en una mayor supervivencia de los individuos heterocigotos para LAP-2, es probablemente responsable del hecho que, en frutos de Hass, el rango observado de la progenie Ettinger (heterocigotos para LAP-2) es más alto que la diferencia entre el total de la progenie híbrida (heterocigota para TPI-1) y la progenie de Fuerte (heterocigota para MDH-1) y no igual a esta diferencia, como podría, ser esperado. Ellos concluyen diciendo que Ettinger se muestra como un fuerte parental donador de polen, como lo señalan estudios previos (DEGANI y GAZIT, 1984; GOLDRING, GAZIT y

DEGANI, 1987). El positivo efecto de Ettinger sobre su progenie se debe, probablemente, a su capacidad de conferir una mayor resistencia al estrés ambiental y una mayor habilidad de competir con el crecimiento vegetativo (DEGANI et.al. ,1986)

El hecho de que se observe un número considerable de híbridos incluso a distancias considerables de la fuente pueden ser el resultado de una transferencia indirecta de polen, debida a un cambio de éste dentro de la colmena (DEGANI, GOLDRING y GAZIT, 1989; GOLDRING, GAZIT y DEGANI, 1987).

En California, TORRES y BERGH (1980) realizaron un estudio en palto y otras especies de Persea, utilizando seis sistemas isoenzimáticos, especificados por 12 genes y 37 alelos: PX, MDH, LAP, PGM, ADH y GOT. Los autores lograron analizar más de cien cultivares de palto y otras ocho especies, mostrando que las enzimas MDH, LAP y PGM provenientes de las hojas y del mesocarpo presentaban idénticos modelos, intensidad relativa y posición de las isoenzimas. Sin embargo, las isoenzimas ADH y GOT no pudieron ser detectadas en las hojas sino sólo en el mesocarpo.

Otra experiencia al respecto es la realizada por VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND (1985), quienes utilizaron dos sistemas isoenzimáticos para determinar los rangos de polinización cruzada en huertos puros

e interplantados de Hass. Ellos observaron que el diseño de plantación tiene un efecto significativo sobre la producción y sobre el rango de polinización cruzada. Los autores señalan un número de frutos promedio por árbol de 138,8 en el huerto mixto y de 92,7, para el huerto de Hass puro. Por otro lado, la polinización cruzada en el huerto mixto fue de 89,6,% (promedio); en cambio, en el huerto de Hass solo, tuvo un valor promedio de 42,2%, cuando el árbol más cercano de Bacon se encontraba a 76 metros.

VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND (1985) realizaron estudios con las enzimas MDH y TPI para detectar los rangos de polinización cruzada, trabajando con huertos de Hass puro e interplantados con la variedad Bacon. En este caso sólo un cuarto de la polinización cruzada no pudo ser detectada, debido a que Hass es homocigoto para ambas enzimas y Bacon heterocigoto, también para ambas. Según los autores, los dos loci mostraron tener una segregación independiente según los rangos de segregación mendeliana (VRECENAR, 1984; VRECENAR -GADUS y ELLSTRAND, 1985) .

También GOLDRING, GAZIT y DEGANI (1987) reportaron haber analizado porcentajes de polinización cruzada en un bloque compacto de Hass utilizando tres sistemas isoenzimáticos: MDH, LAP y TPI. Los autores identificaron el polen parental de frutos maduros de Hass y reportaron a MDH como dimérica, LAP-2 monomérica y TPI como

dimérica. Ellos notaron un efecto positivo de Ettinger, pero sólo en la primera hilera de Hass.

GOLDRING, GAZIT y DEGANI (1987), observaron que, incluso con seis hileras de separación entre el cultivar Hass y Ettinger, casi todos los frutos de Hass provenían de Ettinger. Similares resultados fueron obtenidos por VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND (1985), en un estudio realizado con las variedades Hass y Bacon. Sin embargo, los autores GOLDRING, GAZIT y DEGANI (1987) señalan que no hubo una declinación consistente en el rango de frutos de polinización cruzada con un aumento de la distancia desde el polen parental. Esta falta de declinación en la producción puede ser el resultado de la cuaja inicial de los frutitos Ettinger, la cual es más alta que la capacidad productiva de los árboles. Así, incluso con una gradiente inicial en polinización cruzada, ésta podría no ser detectada al tiempo de cosecha. Es posible que, aunque las abejas trabajaran sobre las flores de Ettinger, visitaron sólo flores de Hass adyacentes, y el cambio de polen que pudo haber ocurrido en la colmena sea responsable de la expandida y baja intensidad de polinización cruzada a través del huerto. En tales condiciones, no debería ser esperada una gradiente de polinización cruzada, ya que el polen no es transferido directamente desde los Ettinger a los árboles de Hass. Los frutos pequeños autopolinizados Hass, en caso de haberse formado, abscisionaron gradualmente durante el

desarrollo, ya sea debido a la competencia con los frutos pequeños de descendencia Ettinger o independientemente, debido a la mayor susceptibilidad al estrés climático.

GANDOLFO (1995) analizó los porcentajes de polinización cruzada obtenidos en distintas combinaciones del cultivar Hass (Hass sin polinizante, Hass con Bacon, Hass con Zutano, Hass con Edranol y Hass con Rincón). En dicho estudio, fueron utilizadas nueve enzimas: LAP, TPI, 6-PGD, SKDH, MDH, GOT, PGI, PGM y Est-fl, con catorce sistemas isoenzimáticos. Según sus resultados, las asociaciones de los cultivares Zutano y Edranol con Hass, presentaron los más altos porcentajes de polinización cruzada con valores de 94,7% y 97,4% respectivamente. Las combinaciones Hass/Bacon, Hass/Rincón y Hass testigo no se diferenciaron significativamente en sus porcentajes de polinización cruzada, presentando valores promedio de 84,7%, 79,5% y 78%, respectivamente.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Origen y recolección del material.

Se realizaron tres ensayos paralelos en un total de siete huertos ubicados en las localidades de Longotoma, Panquehue, Quillota, Naltagua y Mallarauco.

El primer ensayo se realizó en un huerto de paltos situado en la Estación Experimental La Palma/ ubicado en el sector de La Palma, provincia de Quillota.

Dicho huerto se encuentra plantado con cinco combinaciones de palto (Hass con Bacon, Hass con Zutano, Hass con Rincón, Hass con Hass y Hass con Edranol). Cada parcela consta de un total de 32 árboles de los cuales 20 corresponden a Hass y 12 al cultivar acompañante (ver Anexo 2).

Se seleccionaron tres parcelas (tres repeticiones), de cada una de las combinaciones siguientes: Hass con Hass, Hass con Edranol y Hass con Zutano.

El material por muestrear fue obtenido seleccionando dos de los seis árboles centrales de cada parcela correspondientes al cultivar Hass, para evitar, en lo posible, influencia de las parcelas vecinas. Se

tomaron 17 muestras en cada una de las parcelas, de las cuales un 50% correspondió a fruta de calibre chico (161-188 grs) y un 50%, a calibre grande (226-280 grs), constituyéndose un total de 50 frutos por tratamiento y 150 frutos en total.

El segundo ensayo se realizó en un huerto ubicado en la localidad de Mallarauco, en el cual se encontraban plantadas 12 hileras del cultivar Hass a 12 x 12 m. y adyacentes a un bloque similar de la variedad Edranol plantado a 7x7 m. Se seleccionaron los tres primeros árboles de las seis primeras hileras adyacentes a los Edranol (12, 24, 36, 48, 60 y 72 m. del polinizante).

Se tomaron 10 frutos de cada uno de los árboles seleccionados en cada una de las hileras señaladas, constituyéndose un total de 30 frutos por tratamiento (distancia al polinizante) y de 210 frutos en total.

El tercer ensayo se llevó a cabo en cuatro huertos de similares condiciones de plantación, ubicados en Longotoma, Mallarauco, Naltagua y Panquehue. Cada uno de ellos se encontraba plantado con bloques compactos, de la variedad Hass.

En cada caso, se seleccionaron los cuatro árboles ubicados en los vértices del bloque y el árbol central, y se tomaron 14 frutos de

cada uno de ellos; 7 de calibre chico y 7 de calibre grande. Se analizaron, por lo tanto, un total de 70 frutos por huerto, exceptuando el huerto ubicado en la localidad de Naltagua, en que, debido al daño producido por una helada, la mayor parte de la fruta se perdió, lo que hizo necesario reducir el número de muestras a la mitad. Además, toda la fruta seleccionada en este huerto fue de calibre grande.

En cada uno de los ensayos los frutos cosechados fueron transportados en bolsas de papel al laboratorio donde se realizaron electroforesis en geles de almidón, cuya metodología se detalla a partir del punto 3.3. Los frutos fueron conservados hasta por 10 días a temperatura ambiente.

3.2. Caracterización enzimática.

Fueron analizadas 8 enzimas con 14 sistemas isoenzimáticos para poder diferenciar, en la mayor parte de los casos, los posibles parentales de los frutos. Las enzimas que se analizaron fueron:

GOT 1 y GOT 2 : Glutamato oxalacetato transaminasa.

LAP 1 y LAP 2 : Leucino aminopeptidasa.

MDH : Malato deshidrogenasa.

PGM 1 y PGM 2 : Fosfoglucomutasa.

PGI 2 : Fosfoglucosa isomerasa.

TPI 2 : Triosa fosfato isomerasa.

SKDH 1 y SKDH 2 : Shikimato dehidrogenasa.

6 PGD 2, 6 PGD 3 y 6 PGD 4 : 6 Fosfogluconato dehidrogenasa.

3.3. Extracción enzimática.

3.3.1. Identificación de los parentales:

Se recolectaron paltas de las variedades Hass, Edranol, Bacon, Rincón y Zutano con el fin de corroborar los genotipos de los parentales, previamente descritos por GANDOLFO (1995). De las frutas/ se extrajeron pequeñas láminas de mesocarpo, las cuales fueron molidas en una placa de acrílico y mezcladas con un "buffer" de extracción que contiene 0,1 M de fosfato de potasio (pH 7,5), cuya composición se señala en la Tabla 1. El buffer de extracción incluyó PVP (360.000) al 12% soluble (según antecedentes de TORRES y BERGH, 1980). Se adicionaron, además, 10 mM de 2-mercaptoetanol para mejorar la resolución (TORRES y BERGH,1980).

El *buffer* de extracción debió ser previamente refrigerado y la mezcla de tejido con el buffer de extracción se realizó en una placa de acrílico colocada encima de un envase rectangular de hielo congelado. El extracto de mesocarpo y *buffer* fue adsorbido sobre papeles filtro Whatman 3MM (SIGMA) de 2x12ml y a continuación colocado en el gel de almidón.

TABLA 1. Preparación *buffer* de extracción: Fosfato 0,1M pH 7,5

<i>Stock buffer fosfato:</i>
3,48g Fosfato de sodio monobásico
23,86g Fosfato de sodio dibásico
2,0lt Agua destilada
2 gotas Mercaptoetanol/100ml <i>buffer</i> fosfato
40mg albúmina de bovino/100ml <i>buffer</i> fosfato
1% Polietilenglicol
1,3% PVP soluble (360000)

Fuente: GANDOLFO, 1995.

3.3.2. Identificación de la progenie:

Para el análisis de frutos, se partió cada uno de ellos por la mitad y se abrió la semilla para ubicar el embrión, el cual fue extraído y triturado con el *buffer* de extracción antes señalado, utilizando el mismo procedimiento descrito para la identificación de los parentales.

3.4. Preparación de los geles.

Tres sistemas de geles, con valores de pH desde 6,1 a 8,3, fueron usados para resolver las diferentes isoenzimas (ver Cuadro 1). Las formulaciones químicas específicas para los geles y *buffers* de cámaras y de geles están dados en la Tabla 2.

CUADRO 1. Condiciones electroforéticas para cada isoenzima.

ENZIMA	BUFFER DE GEL	pH BUFFER DE GEL	pH BUFFER DE CÁMARA
LAP	A	8,3	8,3
TPI	H	8,0	8,0
6PGD	D	6,1	6,1
SKDH	D	6,1	6,1
MDH	D	6,1	6,1
GOT	H	8,0	8,0
PGI	A	8,3	8,3
PGM	H	8,0	8,0

Fuente: GANDOLFO, 1995.

TABLA 2. Preparación de geles y buffers

1. Sistema A:

Preparación del gel :

30g almidón SIGMA (S5651)

8 ml *buffer* de cámara A, completar 280 ml con *buffer* de gel

Buffer de gel A :

Tris citrae (pH 8,3)

62,0g Trizma base

14,6g Citrid acid

10,0lt Agua destilada

Almacenar a temperatura ambiente

Buffer de cámara A :

Lithium borate (pH 8,3)

12,0g Lithium hydrixide

118,9g Boric acid

10,0lt Agua destilada

Almacenar a temperatura ambiente.

2. Sistema D:

Preparación del gel :

30g Almidón SIGMA (N7004)

14 ml *buffer* de gel D completando con agua destilada

hasta 280 ml.

Buffer de gel D :

Morpholine citrate (pH 6,1)

Continuación

15,4g *citrid acid*
2,0lt agua destilada
Disolver el *citrid acid* y *citrate* a pH 6,1 con N-(3aminopropyl)morpholinie (20ml).
Mantener refrigerado a 4°C.
Buffer de cámara D :
Igual al *buffer* de gel.

3. Sistema H:

Preparación del gel :
35g almidón SIGMA (N7004)
320ml *buffer* de gel .
Buffer de gel H :
Histidine (pH 8,0)
1,05g/lt D-L-histidine-HCL monohydrato. Ajustar a pH 8 con NaOH 4.
Mantener a temperatura ambiente.
Buffer de cámara H :
Citrato de sodio (pH 8,0)
103,0g citrato de sodio/lt
Ajustar con ácido cítrico 0,4M a pH 8,0
Mantener a temperatura ambiente.

Fuente: GANDOLFO, 1995.

Se suspendieron 30 o 35 grs. de almidón (SIGMA) (según el sistema de gel utilizado, ver Tabla 2) en 230 o 280 ml de *buffer* de gel correspondiente, en un frasco de vacío de 1 lt. Se coció el almidón, agitando constantemente el frasco durante 5 minutos, hasta que adquirió una textura espesa y una tonalidad opaca.

Se aplicó vacío por 15 segundos para quitar burbujas de aire en el gel y se vació de inmediato en un molde de plástico de 20x20x1cm, colocado encima de un rectángulo de vidrio, procurando que quedara de un espesor uniforme.

Después de 10 minutos, se colocó un pedazo de plástico transparente encima de cada gel para sellarlo y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Los geles fueron siempre preparados la tarde del día anterior al corrimiento de la electroforesis. En la mañana, los geles fueron colocados al refrigerador por una hora.

Los geles fueron separados de los moldes, previa la realización de un corte a todo lo ancho del gel, y a seis centímetros de un extremo, corte que fue llamado origen.

Se preparó la cámara llenando los reservorios con el *buffer* de cámara correspondiente y colocando trozos de tela de algodón empapados con el *buffer* de cámara, para hacer puente entre los electrodos de entrada y salida del gel. Esto se colocó en el refrigerador para que se enfriara. Los *buffer* de cámara y de gel se basaron en antecedentes previos, según CONKLE *et. als.*, (1980).

3.5. Electroforesis:

Se colocaron 35 muestras en cada gel, distribuyendo los trozos de papel filtro verticalmente a lo largo del origen. En cada gel, se colocó siempre en un lugar predeterminado un papel filtro impregnado en azul de bromofenol, el cual actuó como indicador. Luego de colocadas todas las muestras, se juntaron nuevamente las partes del gel (divididas anteriormente con el origen) . Se colocó cada gel en

la cámara correspondiente, previamente enfriada; se cubrieron cuatro centímetros de cada extremo del gel con los trozos de género y se aplicó corriente con las fuentes de poder (Heath Zenith regulated H.V. Power supply modelo SP-2717A) , que mantiene voltaje constante a 75 mA para los sistemas A y H, y 60 mA para el sistema D. El gel se cubrió con plástico para evitar su desecamiento durante el corrimiento del gel.

Después de 15 minutos de corrimiento del gel, se detuvo la corriente y los geles fueron sacados para extraer los papeles filtro. Luego se colocó una varilla de vidrio en el lado catodal para asegurar un buen contacto de ambas partes del gel y se volvió a aplicar corriente.

Las electroforesis fueron efectuadas en el refrigerador a 4°C y se debió, además, colocar bolsas de agua fría sobre cada gel, las cuales debieron ser cambiadas cada aproximadamente media hora durante las cuatro horas y media de corrimiento del gel.

3.6. Tinción de enzimas.

La tinción de enzimas fue realizada considerando antecedentes previos de GANDOLFO (1995), los cuales concuerdan, en general, con

referencias LAP (DEGANI et. als, 1986) ,MDH (DEGANI y GAZIT, 1984), TPI (GOLDRIN, GAZIT y DEGANI, 1987), PGM (ARULSEKAR y PARFIT, 1986) y GOT (CONKLE et. als., 1980). Sus composiciones se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3: Tinción de enzimas

1. GOT: GLUTAMATO OXALACETATO TRANSAMINASA

- *Buffer* de tinción: 30ml *buffer* fosfato 0,2M pH 7,
 - Componentes de tinción:
 - 0,8 ml solución 0,5% pyridoxal 5- fosfato
 - 1,6 ml albúmina de bovino al 3%
 - 6,8 ml *L-aspartic acid* 0,2M ajustado a pH 7,5 con KOH 2N
 - 2 ml solución alfa-ketoglutarato
 - 120 mg de *Fast blue BB salt* disuelto en 8 ml de agua destilada
- Combinar los componentes con el *buffer*, cuando el gel esté listo para ser teñido, agregar la solución de *Fast Blue BB salt* a la solución; agregarlo al gel y mantener a temperatura ambiente.

2. LAP: LEUCINO AMINOPEPTIDASA.

- *Buffer* de tinción: 75 ml de *buffer* aminopeptidasa
 - Componentes de tinción:
 - 5 ml de solución 0,4% *L-leucine B-naphthylamide*.
 - 20 mg de *Black K salt*.
- Agregar los componentes al *buffer* a 37°C e incubar a esa temperatura.

3. MDH: MALICO DESHIDROGENASA.

- *Buffer* de tinción: 75 ml 0,05M de Tris-HCL pH 8,0
 - Componentes de tinción:
 - 5 ml de solución de ácido málico: (°134,1 g *DL-malic acid*, 80 gr NaOH, 1 lt agua destilada, ajustar a pH 7,0 con NaOH 4N.
 - NAD: 1 ml de solución *stock*
 - MTT: 1 ml de solución *stock*.
 - PMS: 0,5 ml de solución *stock*
- Agregar los componentes al *buffer* a 37°C e incubar el gel a esa temperatura en la oscuridad.

4. **6-PGD: 6- FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA**

- Buffer de tinción: 75 ml 0,05M de *Tris-HCl* pH 8,0
 - Componentes de la tinción:
 - 20 mg de *6-Phosphogluconic acid*
 - NADP: 1 ml de solución stock
 - MTT: 1 ml de solución stock
 - PMS: 0,5 ml de solución stock
 - $MgCl_2$: 1 ml
- Agregar los componentes al buffer de tinción a 37°C, agregar al gel e incubar en la oscuridad.

5. **PGI: FOSFOGLUCOSA ISOMERASA**

- Buffer de tinción: 75 ml 0,05M de *Tris-HCl* pH 8,0
 - Componentes de tinción:
 - 25 mg de D-fructosa 6-fosfato
 - 1 ml de solución de $MgCl_2$ al 1%
 - NADP: 1 ml
 - MTT : 1 ml
 - PMS : 0,5 ml
 - G6PDH: 20 unidades
- Agregar los componentes al buffer de tinción a 37°C, agregarlo al gel e incubar en la oscuridad.

6. **PGM: FOSFOGLUCOMUTASA.**

- Buffer de tinción: 75 ml 0,05M de *Tris-HCl* pH 8,0
 - Componentes de tinción:
 - 1 ml de solución de alfa-D glucosa 1,6 difosfato (100 mg/100 ml agua destilada)
 - 140 mg de alfa-D glucosa 1-fosfato
 - 1ml de solución de $MgCl_2$ al 1%
 - NADP: 1ml
 - MTT: 1 ml
 - PMS: 0,5 ml
 - G6PDH: 20 unidades
- Agregar todos los componentes al buffer de tinción caliente.
Agregar al gel e incubar en la oscuridad.

8. **SKDH: SHIKIMATO DESHIDROGENASA.**

- Buffer de tinción: 75 ml 0,05m de *Tris-HCl* pH 8,0
- Componentes de la tinción:
 - 75 mg de *Shikimic acid*
 - NADP: 1 ml
 - MTT: 1 ml

Continuación

- PMS: 0,5 ml
- Agregar todos los componentes al *buffer* a 37°C e incubar el gel en la oscuridad

9. TPI: TRIOSA FOSFATO ISOMERASA.

- *Buffer* de tinción: 4 ml 0,1 M de Tris HCl
 - Componentes de tinción:
 - 15 mg EDTA
 - 75 unidades de Gliceraldehido-3 fosfato dehidrogenasa
 - 1,5 mg NAD
 - 5 mg MTT
 - 1 mg PMS
 - 6 ml de agarosa
- Agregar todos los componentes al *buffer* de tinción a 37°C y luego la agarosa, pintar el gel e incubar a 37°C.
-

Fuente: GANDOLFO, 1995.

Los *buffer* de tinción fueron preparados una o dos horas antes de realizar las tinciones y fueron incubados a 37°C. Una vez terminado el corrimiento de los geles, fueron retirados de las cámaras y cortados en delgadas láminas de alrededor de 1,2 mm de espesor, las cuales se colocaron en cubetas de acrílico para agregarles las tinciones específicas de cada enzima.

Una vez agregadas las soluciones de tinción, se debió esperar 1 a 3 horas para que se revelaran las bandas. Luego, la solución de tinción era eliminada y los geles se lavaban para evitar un oscurecimiento del fondo del gel. Para evitar el desecamiento posterior de los geles, éstos eran conservados con un poco de agua.

3.7. Interpretación de las bandas en los geles.

Se estableció una equivalencia entre el patrón de bandeo que aparece en el gel (fenotipo) y los alelos que llevan los individuos para tal tinción (genotipo). Se siguieron las anotaciones que varios autores han sugerido y utilizado para otras especies: si aparece más de una isoenzima, la que migra más rápido anodalmemente es la N° 1. El alelo que especifica la migración isoenzimática anódica más lenta de un set fue llamado S y F, el más rápido.

La identificación del parental se realizó por medio de descartes sucesivos; es decir, se verificó el fenotipo para la primera isoenzima y, de los posibles parentales que arrojó ésta, se verificó los que correspondían para el fenotipo de la segunda isoenzima y así, sucesivamente, para las 14 isoenzimas hasta llegar, en lo posible, a diferenciar al parental donador de polen (ver Anexo 3).

3.8. Análisis de datos.

A partir de la determinación del parental donador de polen, realizada a través de las electroforesis, se obtuvo el porcentaje de polinización cruzada, como una proporción de éste sobre el total de fruta analizada en el ensayo y tratamiento correspondiente.

Para el análisis estadístico de los datos, se siguió un modelo completamente al azar con submuestreos para los distintos calibres.

Se utilizó una tabla ANDEVA para determinar el efecto del submuestreo y del tratamiento en cada caso. En los casos en los cuales se advirtió diferencia significativa, se realizó un test de comparación de medias de Tuckey.

Los datos fueron sometidos a una transformación arcoseno antes de ser realizarse el análisis estadístico.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Determinación de los parentales.

Se realizó utilizando tejido de mesocarpo de fruta, tomando en consideración los resultados obtenidos por GANDOLFO (1995). La autora señala que se observaron patrones de bandeo similares a los encontrados en las hojas, pero de una mayor claridad e intensidad. Estos resultados habían sido obtenidos también por TORRES y BERGH (1980) para LAP, MDH y PGM.

CUADRO 2. Genotipo obtenido para las trece isoenzimas utilizadas y las cinco variedades ensayadas.

CULTIVAR	MDH	LAP1	LAP2	PGM1	PGM2	PGI3	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	TPI2	GOT1y2
HASS	SS	FS	FF	FF	FS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS
ZUTANO	FF	SS	FS	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FS	FS	FF
RINCON	FF	SS	FF	FF	FF	SS	SS	SS	FF	FF	FS	FS
EDRANOL	SS	FF	FS	FS	FS	SS	SS	SS	FF	FF	FS	FS
BACON	FS	FS	FF	FS	FS	FS	FS	FS	FF	SS	FS	FF

Cabe señalar que los genotipos para los posibles parentales fueron similares a los reportados por GANDOLFO (1995), exceptuando el genotipo de Hass para 6PGD3, el cual fue descrito por la autora como FS; con todo, no existen antecedentes previos respecto a esta isoenzima que permitan corroborar alguna de las observaciones.

4.1.1. Características y patrones electroforéticos de cada isoenzima:

4.1.1.1. LAP-2 : LEUCINO AMINOPEPTIDASA

Bajo las condiciones de este estudio, LAP-2 se mostró como una enzima monomérica, codificada por el gen LAP-2, teniendo los alelos F y S como los más comunes (ver Figura 1), cuyos resultados coinciden con reportes previos (TORRES y BERGH, 1980, GOLDRING, GAZIT Y DEGANI, 1987). El presente estudio coincidió en que sólo los cultivares Zutano y Edranol presentan el alelo S en su genotipo para LAP-2, pero difiere de reportes previos en los cuales LAP-1 se presentaba como invariante FF.

Cabe señalar que en la mayor parte de las electroforesis realizadas, se perdió la información aportada por esta enzima. Por razones que no se pudieron determinar, no se produjo un bandeo adecuado, los sistemas se presentaron totalmente sobrepuestos en el gel y la tinción difusa, haciendo imposible su interpretación.

4.1.1.2. TPI: TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

El control genético de esta enzima, descrito previamente por DEGANI, GOLDRING y GAZIT (1989); VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND (1985) y por GOLDRING, GAZIT y DEGANI (1987), coincidió completamente con los resultados de este estudio, comportándose con una enzima dimérica,

codificada por los genes TPI-1 y TPI-2, teniendo como los aleles más comunes: F y S (ver Figura 2).

FIGURA 1. Electroforesis de la progenie (embriones de frutos), para la enzima LAP.

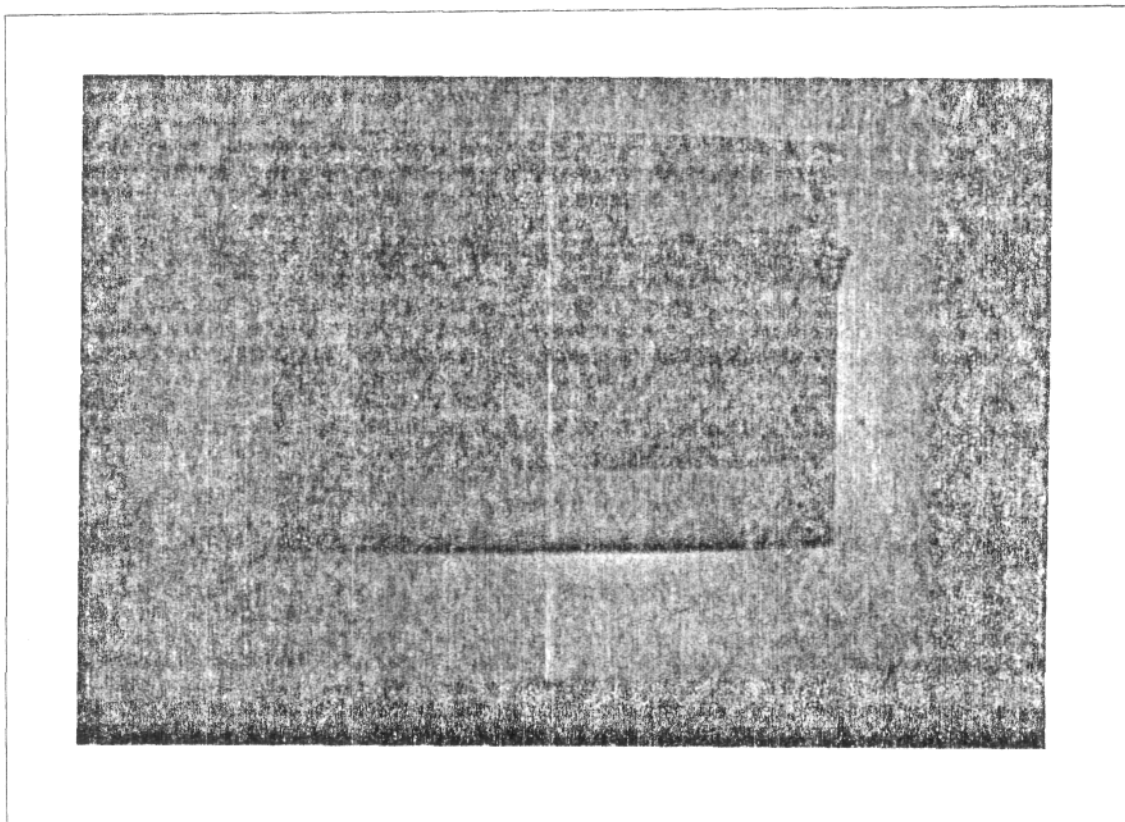
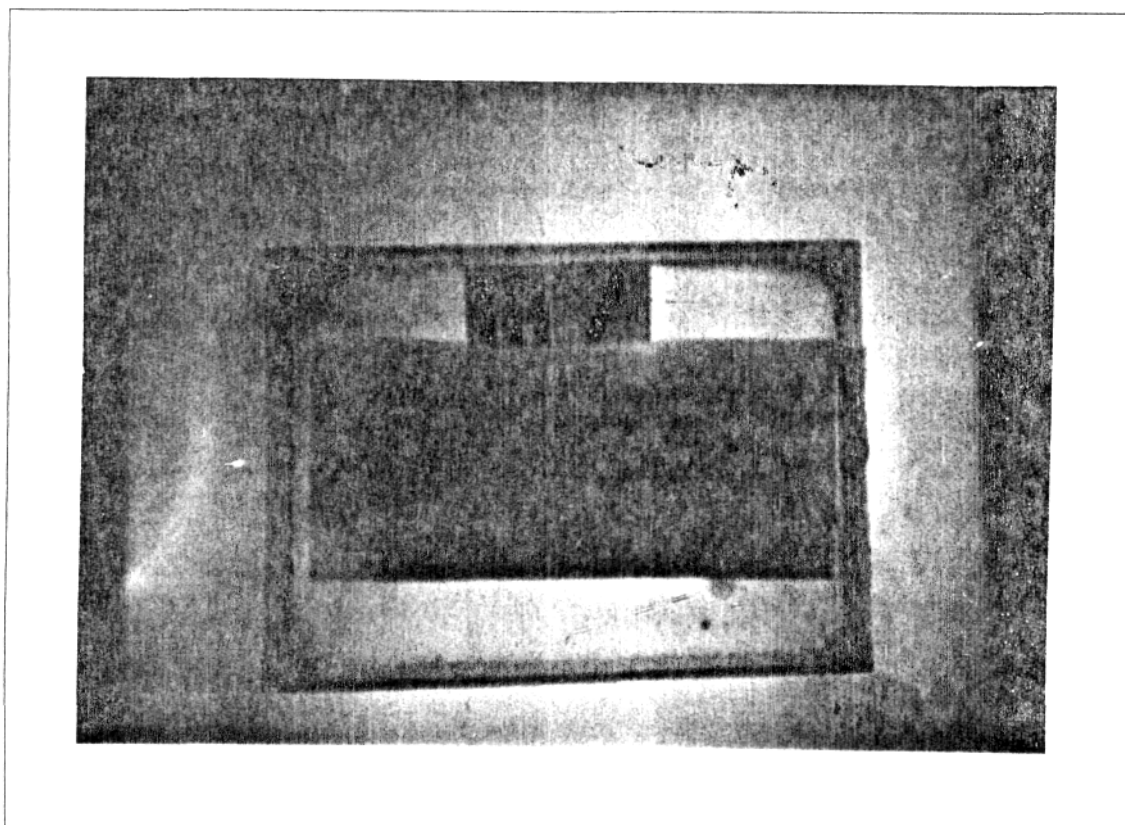


FIGURA 2. Electroforesis de progenie (embriones de frutos) para la enzima TPI.



4.1.1.3. 6-PGD: 6- FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENABA

Esta enzima se comportó como monomérica codificada por cuatro genes: 6-PGD-1, 6-PGD-2, 6-PGD-3 y 6-PGD-4, teniendo dos alelos F y S como los más comunes (ver Figura 3), resultados que coincidieron con los reportados por GANDOLFO (1995), no obstante, en el presente estudio, el gen 6-PGD-2 se comportó como invariante en las cinco variedades analizadas y las otras tres isoenzimas aportaron información que permitió diferenciar Hass de Bacon, bajo ciertas condiciones, en contraposición a lo señalado por GANDOLFO (1995), quien describe al gen 6-PGD-1 como invariante para las variedades analizadas. Sin embargo, es probable que esto se deba sólo a un problema en la nomenclatura utilizada.

4.1.1.4. SKDH: SHIKIMATO DEHIDROGENASA

Los resultados obtenidos para esta enzima coincidieron con los reportados por GANDOLFO (1995). Bajo las condiciones del estudio, SKDH se comportó como una enzima monomérica, codificada por dos genes: SKDH-1 y SKDH-2, con los alelos F y S como los más comunes (ver Figura 4). Los resultados obtenidos con esta enzima señalan un aparente ligamento de los genes, hecho que fue señalado también por GANDOLFO (1995).

FIGURA 3. Electroforesis de la progenie (embriones de frutos) para la enzima 6-PGD.

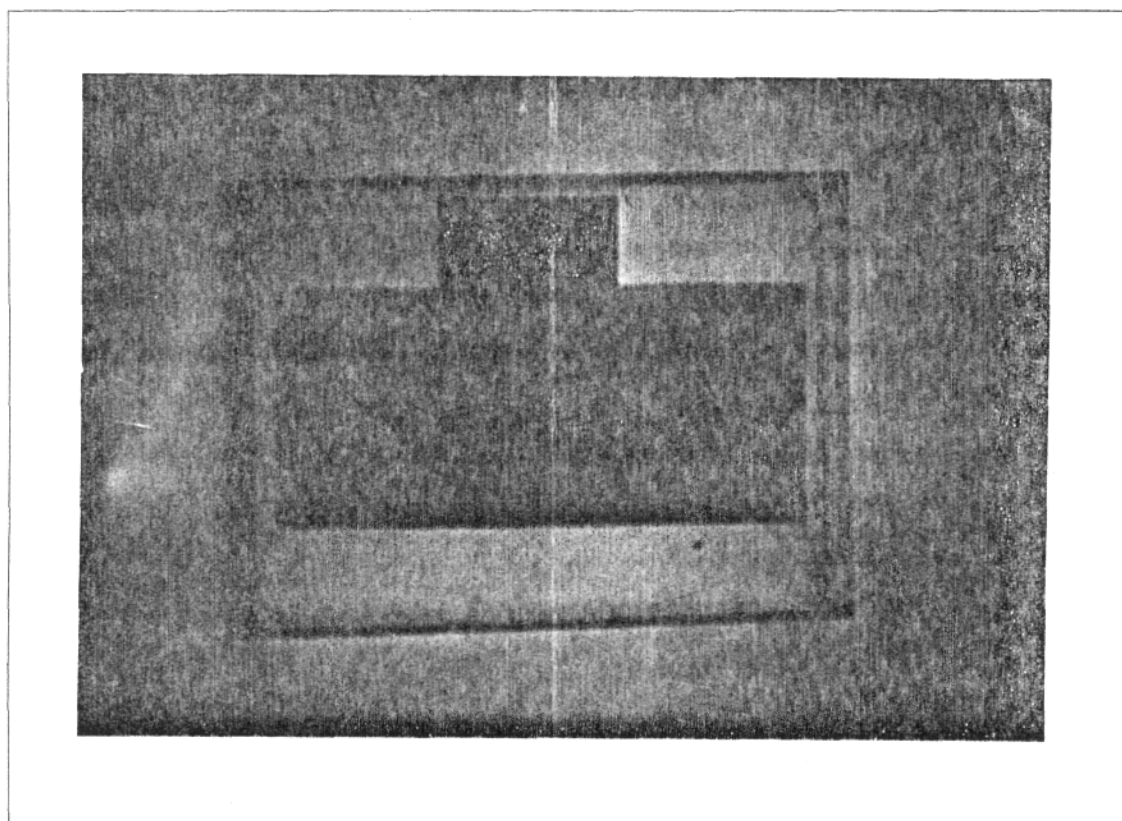
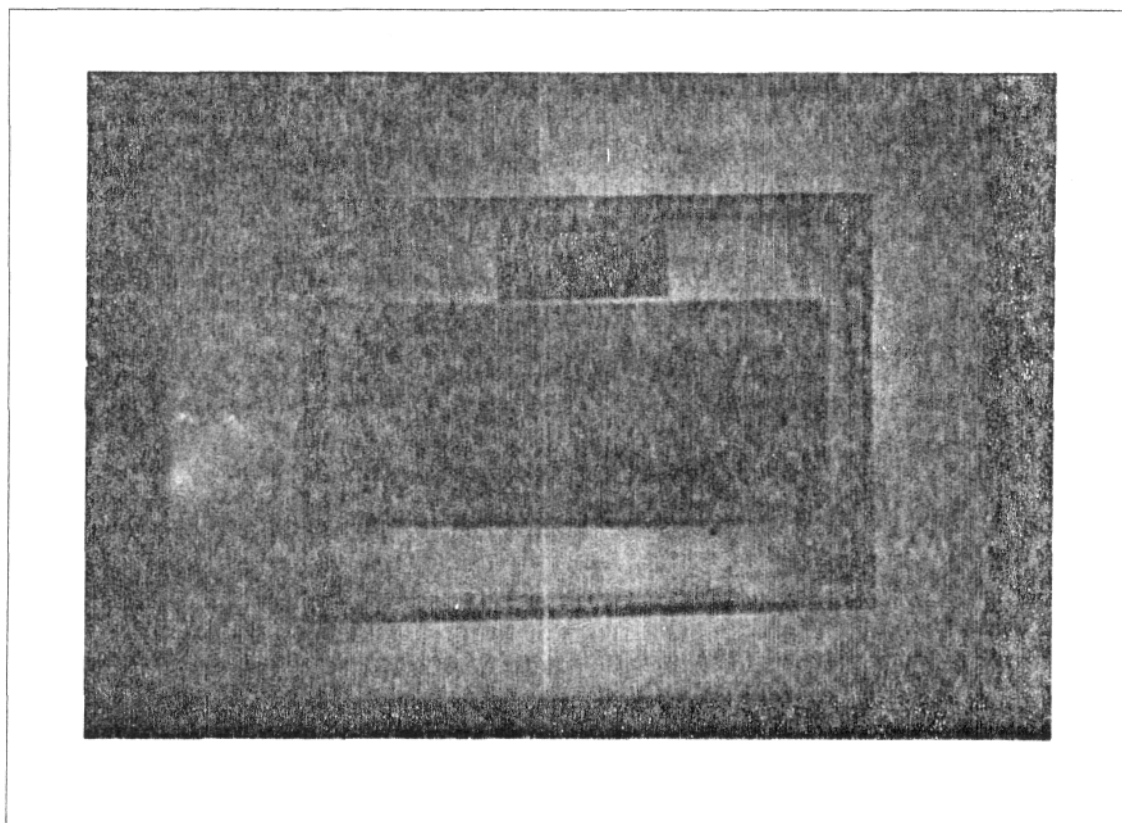


FIGURA 4. Electroforesis de progenie (embriones de frutos) para la enzima SKDH.



4.1.1.5. MDH: MÁLICO DESHIDROGENASA

Esta enzima fue claramente identificada, comportándose como una enzima dimérica, con los alelos F, S y M como los más comunes (ver Figura 5), lo cual coincidió con reportes previos (DEGANI y GAZIT, 1984, DEGANI, GOLDRING y GAZIT, 1989; TORRES y BERGH, 1980; GOLDRING, GAZIT y DEGANI, 1987; GANDOLFO, 1995).

Se observó, además, una serie de bandas de migración más rápida que no pudieron ser interpretadas, pero que presentaron cierta variación entre los individuos analizados. Similares observaciones fueron realizadas por GANDOLFO (1995). Pese a esto, se descartó la idea de buscar una interpretación más consistente de estas bandas, debido a que los patrones de bandeo presentados para las cinco variedades fueron similares; luego, no permitían obtener información relevante para el estudio.

4.1.1.6. GOT: GLUTAMATO. OXALACETATO TRANSAMINASA

Los resultados obtenidos indican que GOT es una enzima dimérica, codificada por dos genes: GOT-1 y GOT-2, teniendo los alelos F y S como los más comunes (ver Figura 6). Estos resultados coinciden con antecedentes previos (TORRES y BERGH, 1978, TORRES y BERGH, 1980; GANDOLFO, 1995). Los genotipos observados para GOT-1 y GOT-2 fueron siempre los mismos concordando con observaciones previas de TORRES y

BERGH (1980), VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND (1984) y GANDOLFO (1995), quienes señalan un posible ligamiento entre los genes.

FIGURA 5. Electroforesis de la progenie (embriones de frutos) para la enzima MDH.

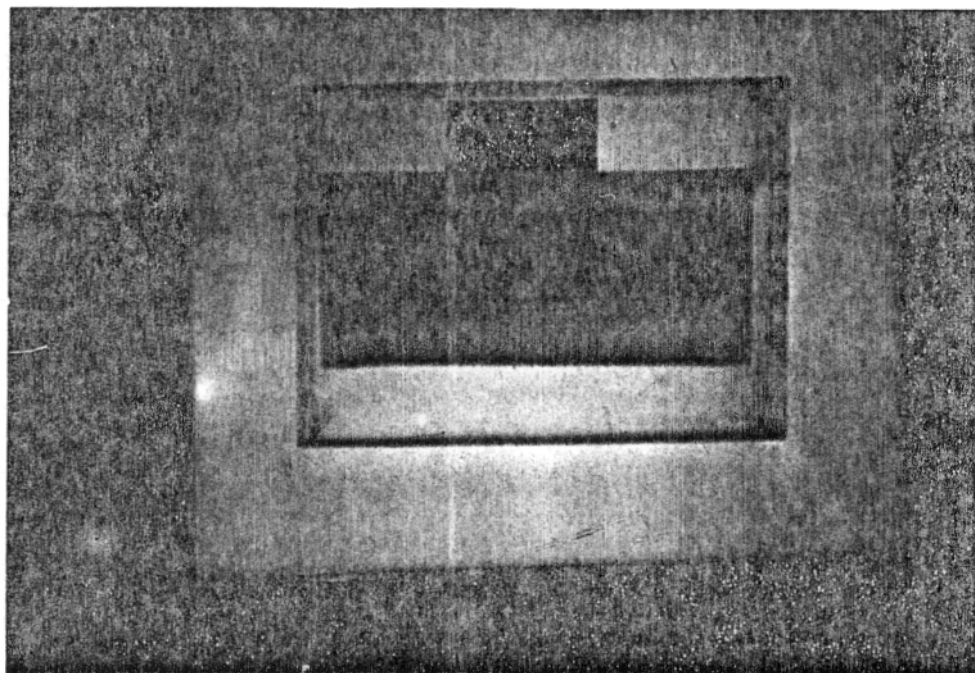
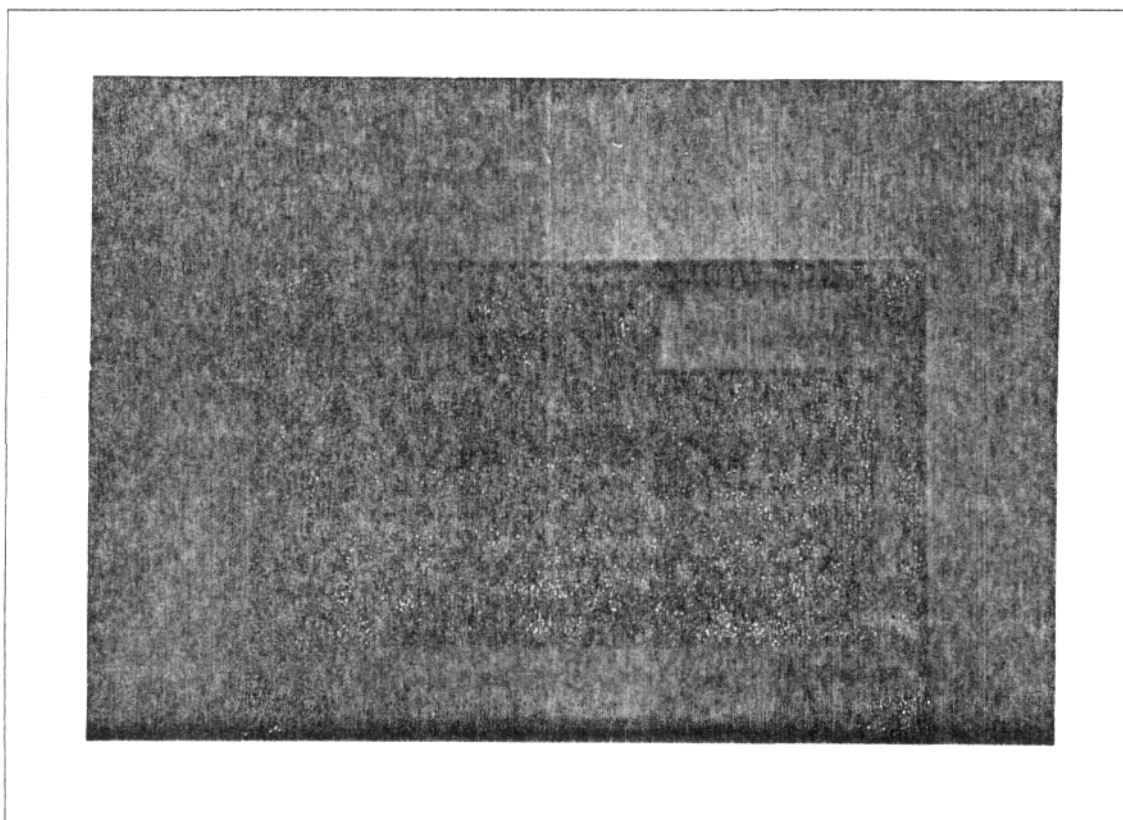


FIGURA 6. Electroforesis de la progenie (embriones de fruto) para la enzima GOT.



4.1.1.7. PGI: FOSFOGLUCOSA ISOMERASA

El patrón de bandeo de esta enzima resultó ser bastante complicado coincidiendo con antecedentes previos (TRUCEIT y LEWIS, 1992; GANDOLFO, 1995), por lo que no pudo determinarse el número de genes involucrados en su codificación. Sin embargo, la isoenzima PGI-1, se ubicaba en la parte inferior del gel y fue consistentemente clara para poder realizar las lecturas en el gel, comportándose como dimérica con alelos F y S como los más comunes (ver Figura 7) y coincidiendo plenamente con lo señalado por GANDOLFO (1995).

4.1.1.8. PGM: FOFOGLUCOMUTASA

Los resultados obtenidos, muestran a PGM como una enzima monomérica, codificada por dos genes: PGM-1 y PGM-2, con los alelos F y S (ver Figura 8). Cabe señalar que ambos sistemas se mostraron variantes para efectos de este estudio en contraposición a lo señalado por TORRES y BERGH (1980) y TORRES y BERGH (1978a), quienes reportaron que el sistema PGM-2 se comportó como homocigoto FF para todos los individuos analizados. Con todo, GANDOLFO (1995) observó en su estudio resultados similares a los obtenidos en este caso.

FIGURA 7. Electroforesis de la progenie (embriones de frutos) para la enzima PGI.

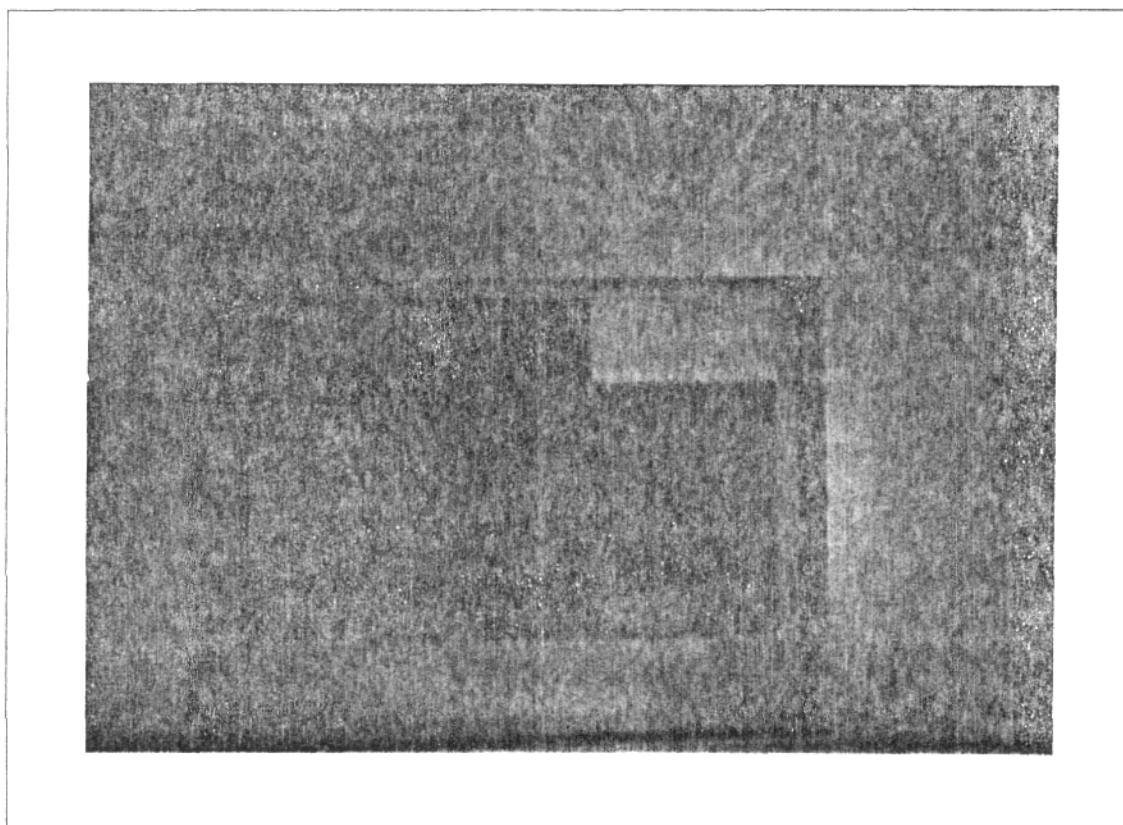
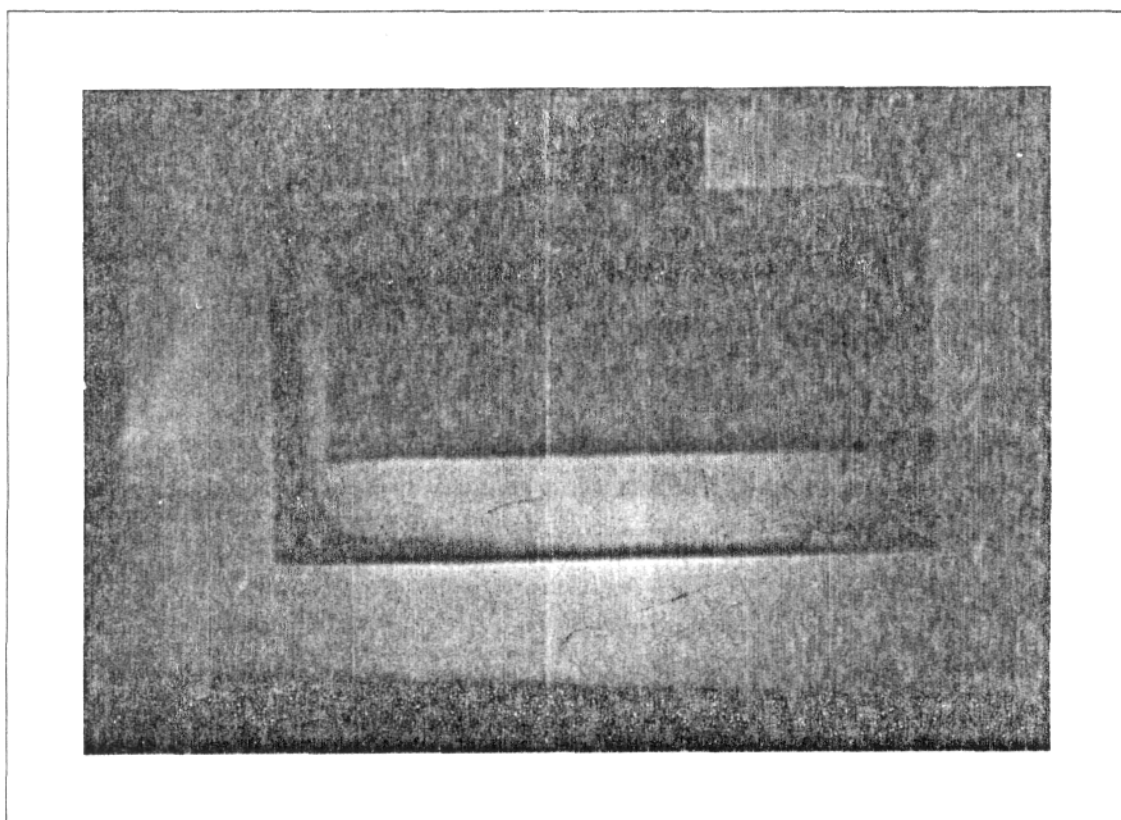


FIGURA 8. Electroforesis de la progenie (embriones de frutos) para la enzima PGM.



4.2. Determinación del polen parental en la progenie. Para la determinación del parental donador de polen en la progenie, lo óptimo es tener isoenzimas que sean homocigotas de diferente tipo entre los parentales, de modo de poder diferenciar toda la progenie. Pese a lo anterior, esta situación no se dio en el presente estudio, por lo cual se diferenció en muchos casos sólo un cuarto o la mitad de la descendencia, pero se pudo acotar los posibles parentales en cada caso.

Para facilitar la determinación del parental donador de polen, se utilizó el Cuadro 3, en que se presentan los posibles hijos de Hass según los genotipos de las catorce isoenzimas, obtenidos para Hass y los otros cultivares analizados.

CUADRO 3. Posible parental donador de para cada genotipo obtenible de un individuo proveniente de madre Hass.

ISOENZIMA	GENOTIPO HASS	GENOTIPO HIJO	POSIBLE PARENTAL DONADOR POLEN
MDH-1	SS	SS FS	Hass, Edranol, Bacon Zutano, Rincon, Bacon
LAP-1	FS	FF FS SS	Hass, Edranol, Bacon Todos Todos menos Edranol
LAP-2	FF	FF FS	Todos Zutano y Edranol
TPI-2	SS	SS FS	Todos Todos menos Hass
6-PGD-1	FF	FS FF	Bacon Todos
6-PGD-3	SS	SS FS	Todos Bacon
6-PGD-4	FS	FF FS SS	Todos Todos Hass

ISOENZIMA	GENOTIPO HASS	GENOTIPO HIJO	POSIBLE PARENTAL DONADOR POLEN
GOT 1y2	FS	SS FS FF	Hass, Rincón, Edranol Todos Todos
PGI-3	FS	FF FS SS	Hass, Zutano, Bacon Todos Todos
PGM-1	FF	FF FS	Todos Zutano, Edranol, Bacon
PGM-2	FS	SS FS FF	Todos menos Rincón Todos Todos
SKDH 1	FS	SS FS FF	Hass, Zutano, Bacon Todos Todos menos Bacon

La realización de las electroforesis dio una serie de genotipos para cada isoenzima los que se encuentran publicados en el Anexo 3. Por diferentes causas, en ciertas ocasiones no pudieron ser leídas todas las enzimas en los diferentes corrimientos, razón por la cual falta información, en algunos casos, para algunas enzimas.

Normalmente se encontró una correlación entre el tamaño del embrión y la intensidad de la tinción obtenida para las distintas enzimas, lo cual puede deberse a una menor concentración enzimática en los embriones de menor tamaño. Observaciones similares fueron realizadas por GANDOLFO (1995), quien advierte, además, la posibilidad de que exista una menor actividad enzimática en ciertos embriones.

Los resultados de la determinación del parental donador de polen para el Ensayo 1, en cada tratamiento, se aprecian en las Tablas

4.1. a 4.3., donde la letra H corresponde a Hass, E a Edranol, B a Bacon, R a Rincón y Z a Zutano.

TABLA 4.1. Parcela Hass con Hass. Parentales donadores de polen obtenidos en para los individuos analizados dentro de cada calibre.

Posible parental donador de polen	Calibre Grande	Calibre Chico
Hass	4	5
Zutano	2	3
Edranol	0	2
Bacon	5	3
Rincon	0	0
H-E-B	4	5
H-E	1	2
H-B	5	2
Z-B-R	1	0
Z-B	1	2
Z-R	1	0
E-B	1	0
Total de casos	25	26

Dos o más letras significa que no se pudo discriminar a un solo parental donador de polen.

TABLA 4.2. Parcelas Hass con Zutano. Parentales donadores de polen obtenidos para los individuos analizados dentro de cada calibre.

Posible parental donador de polen	Calibre Grande	Calibre Chico
Hass	1	3
Zutano	12	8
Edranol	0	0
Bacon	0	1
Rincón	0	0
H-E	1	2
H-B	1	0
E-B	1	1
Z-B	10	8
Z-R	1	1
Z-B-R	1	1
Total de casos	27	25

Dos o más letras significa que no se pudo discriminar a un solo parental donador de polen.

TABLA 4.3. Parcelas Hass con Edranol. Parentales donadores de polen obtenidos para los individuos analizados en los distintos calibres.

Posible parental donador de polen	Calibre Grande	Calibre Chico
Hass	0	0
Zutano	0	1
Edranol	9	12
Bacon	0	1
Rincón	0	0
H-E-B	1	2
H-E	3	5
H-B	2	1
E-B	9	1
Z-B-R	1	0
Z-B	1	2
Z-R	1	0
Total de casos	27	25

Dos o más letras significa que no se pudo discriminar a un solo parental donador de polen.

Se puede apreciar que existe un número muy elevado de casos en que no se pudo diferenciar un solo parental, debido a que sus genotipos no aportaron información suficiente para lograr discriminarlos de los otros posibles parentales. Descartar los casos dudosos para poder analizar esta información conducirla a error, ya que se podría estar sobreestimando a algunos cultivares en cuanto a su aporte a la polinización cruzada. Por otro lado, el hecho de considerarlos también implica un error, ya que se altera la real participación de cada cultivar. Por esta razón, se mostrarán, de aquí en adelante, los datos y análisis para ambos casos: cuando existe un parental asignado individualmente y cuando no se pudo discriminar entre varios parentales posibles. En este último caso, se repartirá la probabilidad de ocurrencia entre los posibles parentales involucrados.

Para los tres ensayos realizados se presenta el mismo problema, luego, los análisis de todos ellos serán efectuados de la forma anteriormente señalada.

El Cuadro 5 detalla los porcentajes de polinización cruzada obtenidos por tratamiento, por parcela y por calibre, considerando sólo los casos en que se identificó un posible parental donador de polen.

CUADRO 5. Porcentajes de polinización cruzada obtenidos por tratamiento, por parcela y por calibre, considerando los frutos con sólo un parental identificado.

Tratamiento	Calibre	Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3
H/H	Grande	75,0	66,6	0
	Chico	83,3	66,6	25
H/Z	Grande	100	100	100
	Chico	100	60	50
H/E	Grande	100	100	100
	Chico	100	100	100

Al analizar estadísticamente estos datos, se concluyó, con un 5% de significancia, que no existe una diferencia significativa entre los calibres, en relación con los porcentajes de polinización cruzada obtenidos. Por ello, se tomaron los mismos datos agrupando los calibres de cada parcela en cada tratamiento, obteniéndose nuevos porcentajes de polinización cruzada, los cuales se muestran en el Cuadro 6.

CUADRO 6. Porcentaje de polinización cruzada obtenido en cada tratamiento y cada parcela, considerando sólo los frutos con el parental donador de polen identificado.

Tratamiento	Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Media	Tuckey
H/H	80	66,6	20	55,5	a
H/Z	100	84,6	66,6	83,7	ab
H/E	100	100	100	100	b

Al analizar estadísticamente los datos se obtuvo que al 5% de significancia existe diferencia significativa entre los tratamientos, en cuanto a los porcentajes obtenidos de polinización cruzada. Medías con letras iguales indican que los tratamientos no difieren estadísticamente, según Tuckey, con un 5% de significancia. Para el análisis estadístico se realizó una transformación arcoseno de los datos.

Se deduce del cuadro anterior, que el tratamiento Hass/Edranol presenta en promedio porcentajes de polinización cruzada significativamente mayores a los del tratamiento Hass/Hass, pero que no difieren estadísticamente de los observados en el tratamiento Hass/Zutano.

De los resultados obtenidos, llama la atención el bajo porcentaje de polinización cruzada obtenido en la parcela 3 del tratamiento de Hass con Hass, que se aleja considerablemente de los observados en las parcelas 1 y 2 para el mismo tratamiento. Sin embargo, es posible que esto se relacione con la ubicación de dicha parcela dentro del huerto, ya que las dos adyacentes corresponden a Hass sin polinizante y una a Rincón, Cultivar que mostró la menor incidencia

como donador de polen en todos los tratamientos; por lo tanto, la única fuente posible de polen para este tratamiento fueron árboles de los cultivares Bacon y Edranol, los que, si bien mostraron ser buenos donadores de polen, resultaron ser las variedades más difíciles de separar de Hass a través del método utilizado, debido a los genotipos que presentan para las isoenzimas ensayadas. Esto podría ser la causa de la baja cantidad de casos en que se logró obtener asignaciones individuales y, como se mencionó anteriormente el análisis de éstos, podría estar induciendo a una sobreestimación de la autopolinización. En el Cuadro 7, se puede observar un significativo aumento en el porcentaje de polinización cruzada de esta parcela, al considerar los casos con más de un posible parental donador de polen.

CUADRO 7. Porcentaje de polinización cruzada obtenidos para cada parcela de cada tratamiento, considerando los casos con más de un posible parental donador de polen.

Tratamiento	Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Media
H/H	76,4	70,5	52,9	66,6
H/Z	100,0	83,3	88,2	90,5
H/E	93,0	94,1	73,9	87,0

Al analizar estadísticamente estos datos, se obtuvo que, con un 5% de significancia, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, en cuanto a los porcentajes de polinización cruzada.

Los resultados obtenidos para el análisis de los frutos con parental de polen identificado, concuerdan con reportes previos de GANDOLFO

(1995). Sin embargo, los estudios realizados por la autora señalan diferencias entre los tratamientos al analizar los casos con más de un posible parental donador de polen, en contraste con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Es posible que la diferencia de éstos en relación con los reportados por GANDOLFO (1995) se deba a la mayor cantidad de casos dudosos (más de un posible parental donador de polen) obtenidos en este ensayo, probablemente asociados a la pérdida de la enzima LAP.

De los resultados obtenidos, se puede inferir que Hass resulta ser muy débil como autopolinizante, ya que se observan muy pocos casos de autopolinización, incluso en el tratamiento Hass/Hass. Estos resultados concuerdan con reportes previos (GUIL y GAZIT, 1992; GANDOLFO, 1995), que señalan a Hass como un débil autopolinizante.

Esta baja influencia del polen de Hass como parental de su propia fruta puede ser atribuida a distintas causas. Puede ser que las condiciones ambientales no hayan favorecido el traslape entre los estados florales de la variedad y hayan, por lo tanto, dificultado la posibilidad de autopolinización; es también posible que exista alguna limitación a nivel de polen en la variedad Hass que dificulte la autopolinización o la fecundación y, en tercer lugar, puede ser que el material genético que Hass está aportando en su polen presente alguna desventaja frente al aportado por otras variedades en cuanto a la sobrevivencia de los frutos, y que éstos (frutos autopolinizados) estén abscisionando en una mayor proporción.

En el Cuadro 8, se puede observar el aporte de los distintos cultivares presentes en el huerto a la polinización cruzada.

CUADRO 8. Aporte da cada variedad al porcentaje de polinización cruzada de cada tratamiento, considerando sólo los frutos con parental asignado individualmente.

Tratamiento	Frutos ensayados	Frutos con parental identificado	Porcentaje parental donador de polen (según cultivar)				
			Hass	Zutano	Edranol	Bacon	Rincón
H/H	51	24	37,5	20,8	8,38	33,3	0
H/E	52	23	0	4,3	91,3	4,3	0
H/Z	52	24	12,5	83,3	0	4,1	0

Se puede apreciar que existe un aporte de polen de distintas variedades en cada tratamiento y que, por lo tanto, hay una influencia de las variedades ubicadas en parcelas vecinas. Además, es claro que la mayor diversidad en cuanto a donadores de polen se observa en el tratamiento Hass/Hass. Por otro lado, la influencia de las variedades Edranol y Zutano dentro de su propio tratamiento alcanza los mayores valores.

En el Cuadro 9, se puede observar la influencia de las distintas variedades de polen dentro de cada tratamiento en cuanto a los porcentajes de polinización cruzada que presentan.

CUADRO 9. Aporte de cada cultivar al porcentaje de polinización cruzada de cada tratamiento, considerando los casos con más de un posible parental donador de polen.

Tratamiento	Frutos ensayados	Porcentaje parental donador de polen (según cultivar)				
		Hass	Zutano	Edranol	Bacon	Rincón
H/H	51	33,3	16,2	11,7	34,9	2,9
H/Z	52	9,6	58,9	4,8	23,3	3,1
H/E	52	9,6	6,4	59,6	19,8	1,6

En este caso, los resultados obtenidos en son similares a los observados en el Cuadro 8. Los tratamientos Hass/Edranol y Hass/Zutano presentan en su progenie un alto porcentaje de fruta proveniente del cultivar polinizante del tratamiento que los contenía. El tratamiento de Hass/Hass presentó, también en este caso, la mayor diversidad en cuanto a donadores de polen. Sin embargo es también posible observar que los porcentajes tuvieron una gran variación al considerarse los frutos con más de un posible parental donador de polen, lo que evidencia que existe una gran cantidad de casos de este tipo.

Otro aspecto importante de resaltar es la escasa participación del cultivar Rincón como polinizante del cultivar Hass, hecho previamente reportado por GANDOLFO (1995). Este cultivar presenta una floración similar a la de Hass (tipo A) y, por lo tanto, la oportunidad de coincidencia de estados florales debiese estar supeditada a las condiciones ambientales. Desde este punto de vista, resultaba esperable obtener valores similares de autopolinización y de polinización cruzada con Rincón, sin embargo, la participación de Hass como donador de polen fue mayor. La no despreciable

participación de Hass como donador de polen para su propia progenie deja en evidencia que hubo traslape entre los estados. Existen además reportes previos (DEGANI, GOLDRING y GAZIT, 1989), señalando una exitosa polinización cruzada entre cultivares del mismo tipo de floración.

Es posible pensar, entonces, que la baja participación de Rincón en la polinización cruzada se debe a algún problema a nivel de polen que esté limitando la polinización o que esté confiriendo a su progenie una menor capacidad de competencia frente a frutos polinizados con una variedad polinizante e incluso Hass.

La capacidad del polen de ciertas variedades de conferir a su progenie una mayor capacidad de supervivencia, ha sido reportada por DEGANI y GAZIT (1984), quienes observaron una variación en los rangos de abscisión de frutitos dependiente del origen del polen parental. Así, DAVENPORT y LAHAV (1992) y GUIL y GAZIT (1992) señalan que los frutos de Hass provenientes de polinización cruzada con Ettinger sobreviven mejor a la madurez y que Ettinger resulta ser un muy buen donador de polen para Hass.

Los resultados obtenidos, en este caso, para la polinización cruzada de Hass con Edranol y Zutano en sus respectivos tratamientos concuerdan con los reportados por GANDOLFO (1995), y muestran que ambas variedades influyen altamente en la polinización del cultivar Hass al estar presentes en el huerto. Es muy posible que algo similar a lo señalado por DAVENPOT y LAHAV (1992) y GUIL y GAZIT (1992) esté ocurriendo en este caso, y que las variedades Edranol y

Zutano estén confiriendo ciertas características a través de su material genético a su progenie que le permita sobrevivir en mayor proporción.

Otro aspecto que resulta importante de analizar es el alto porcentaje de polinización cruzada que se observa en el tratamiento de Hass/Hass. Es claro que las parcelas utilizadas en este ensayo se encuentran muy próximas entre si y que existe influencia de pólenes diferentes al contenido en cada parcela como polinizante. Este hecho evidencia que el polen es capaz de recorrer distancias relativamente altas o, al menos, superiores a la distancia entre las parcelas ensayadas. Resulta, por ello, interesante considerar la distancia entre los árboles Hass y la fuente donadora de polen más cercana de cada variedad.

En la Figura 9, se presenta la distribución de las parcelas presentes en la estación experimental y se señalan las parcelas seleccionadas en cada tratamiento. En las Figuras 10 a la 18, se presentan gráficos donde se muestran los porcentajes de participación de cada polinizante con respecto al total de polinización cruzada de cada parcela en relación a la distancia de la fuente donadora ' de polen más cercana de cada variedad, considerando los casos en que se diferenció el parental de polen y los casos con más de un posible parental (datos entre paréntesis).

FIGURA 9. Distribución de las parcelas en la E.E. La Palma.

1 H/Z	9 H/H	17 H/E
2 H/R	10 H/Z	18 H/B
3 H/E	11 H/H	19 H/Z
4 H/H	12 H/H	20 H/R
5 H/B	13 H/R	21 H/H
6 H/B	14 H/B	22 H/H
7 H/H	15 H/B	23 H/H
8 H/H	16 H/E	24 H/B



Parcelas seleccionadas en el ensayo.

FIGURA 10. Participación de cada cultivar en el porcentaje de polinización cruzada de la parcela 9 del tratamiento Hass/Hass en relación a la distancia de los árboles muestreados con la fuente donadora de polen más cercana de cada cultivar.

CULTIVAR	%		DISTANCIA AL ÁRBOL MÁS CERCANO (m)
ZUTANO	50	(34, 6)	25
RINCON	0	(0)	42
EDRANOL	12,5	(20, 4)	25
BACON	37,5	(39, 7)	42

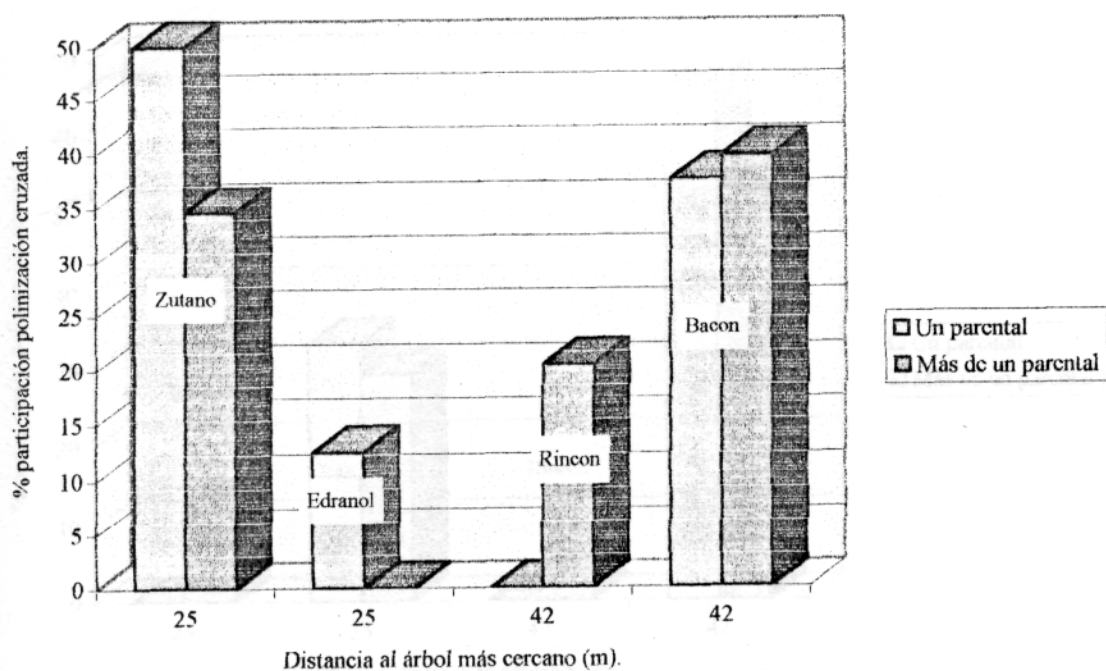


FIGURA 11. Participación de cada cultivar en el porcentaje de polinización cruzada de la parcela 11 del tratamiento Hass/Hass, en relación a la distancia de los árboles muestreados con la fuente donadora de polen más cercana de cada cultivar.

CULTIVAR	%		DISTANCIA AL ÁRBOL MÁS CERCANO (m)
ZUTANO	33,3	(29,2)	35
RINCON	0	(4,1)	42
EDRANOL	0	(12,5)	25
BACON	66,6	(54,2)	42

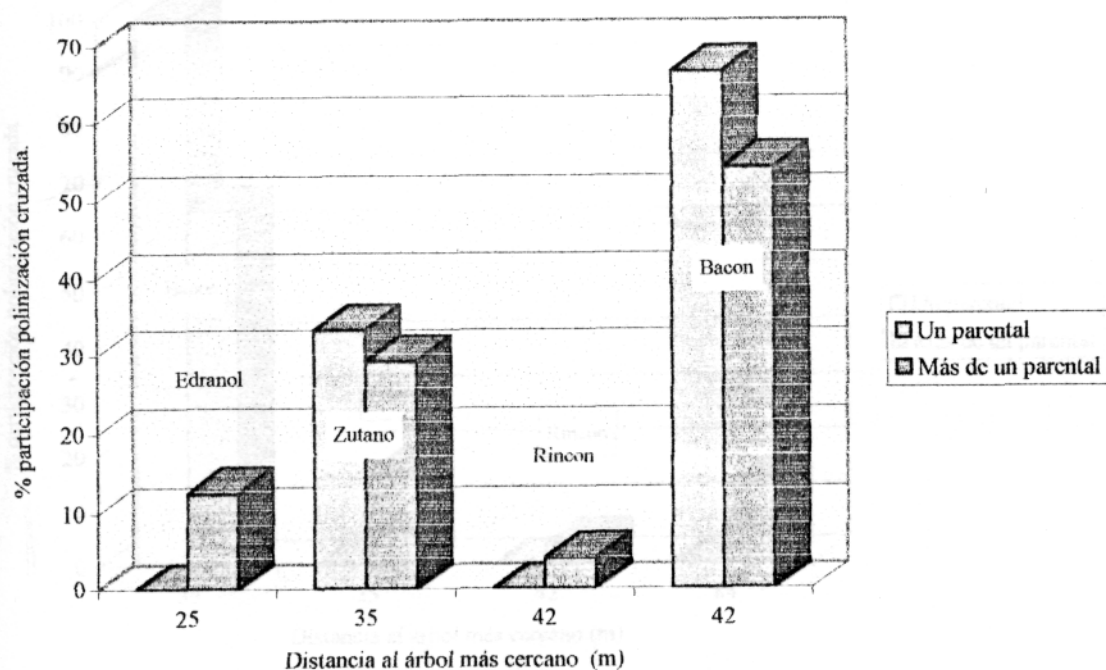


FIGURA 12. Participación de cada cultivar en el porcentaje de polinización cruzada de la parcela 4 del tratamiento Hass/Hass, en relación a la distancia de los árboles muestreados con la fuente donadora de polen más cercana de cada cultivar.,

CULTIVAR	%		DISTANCIA AL ÁRBOL MÁS CERCANO (m)
ZUTANO	0	(14, 7)	84
RINCON	0	(3, 6)	42
EDRANOL	0	(16, 6)	35
BACON	100	(64, 7)	35

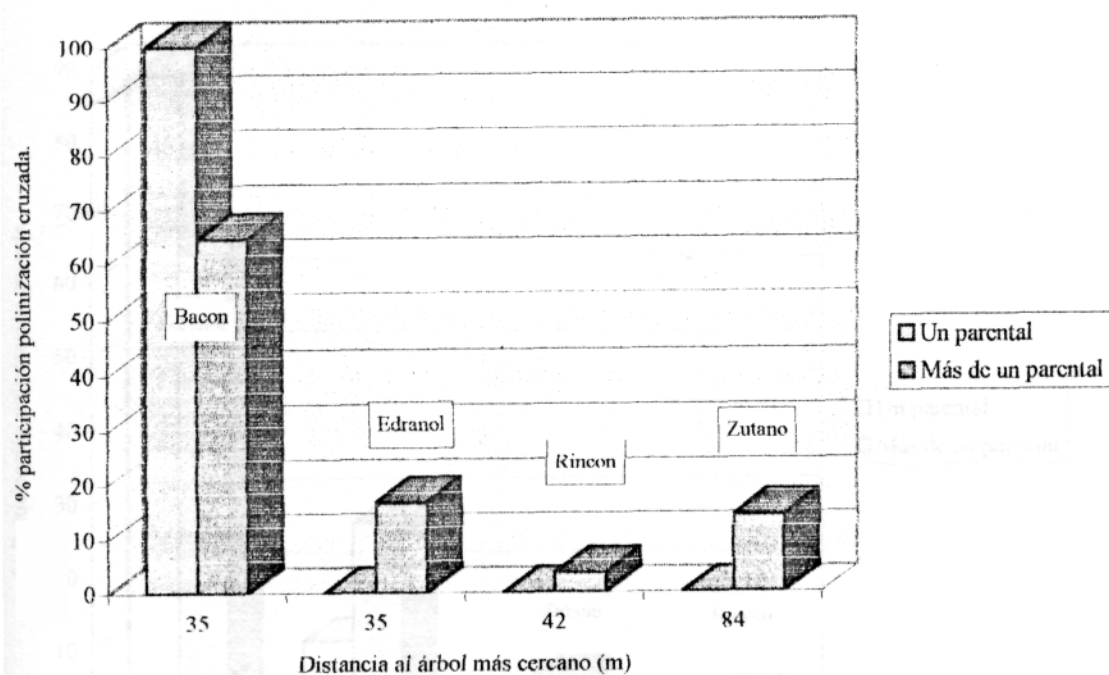


FIGURA 13. Participación de cada cultivar en el porcentaje de polinización cruzada de la parcela 4 del tratamiento Hass/Edranol, según distancia de los árboles muestreados con la fuente donadora de polen más cercana de cada cultivar.

CULTIVAR	%		DISTANCIA AL ÁRBOL MÁS CERCANO (m)
ZUTANO	0	(5, 6)	42
RINCON	0	(2, 8)	72
EDRANOL	88,8	(64, 1)	0
BACON	11,1	(27, 3)	35

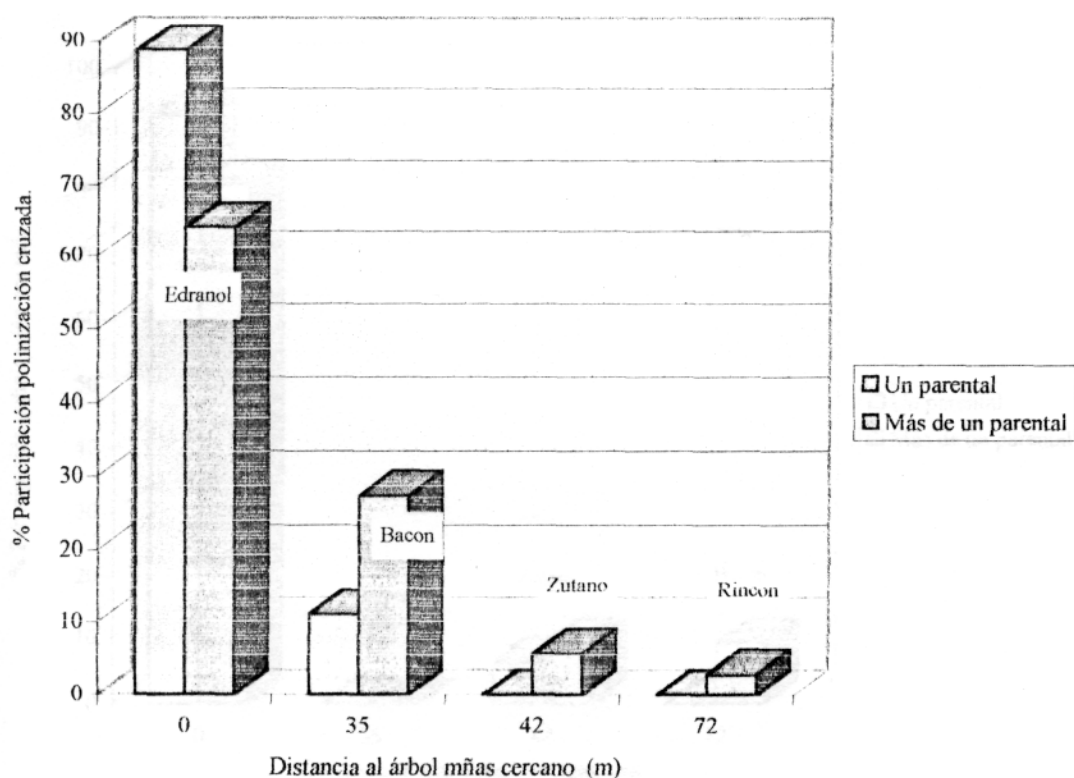


FIGURA 14. Participación de cada cultivar en el porcentaje de polinización cruzada de la parcela 3 del tratamiento Hass/Edranol, en relación a la distancia de los árboles muestreados con la fuente donadora de polen más cercana de cada cultivar.

CULTIVAR	%		DISTANCIA AL ÁRBOL MÁS CERCANO (m)
ZUTANO	6,3	(9,3)	42
RINCON	0	(0)	35
EDRANOL	92,3	(81,2)	0
BACON	0	(9,3)	72

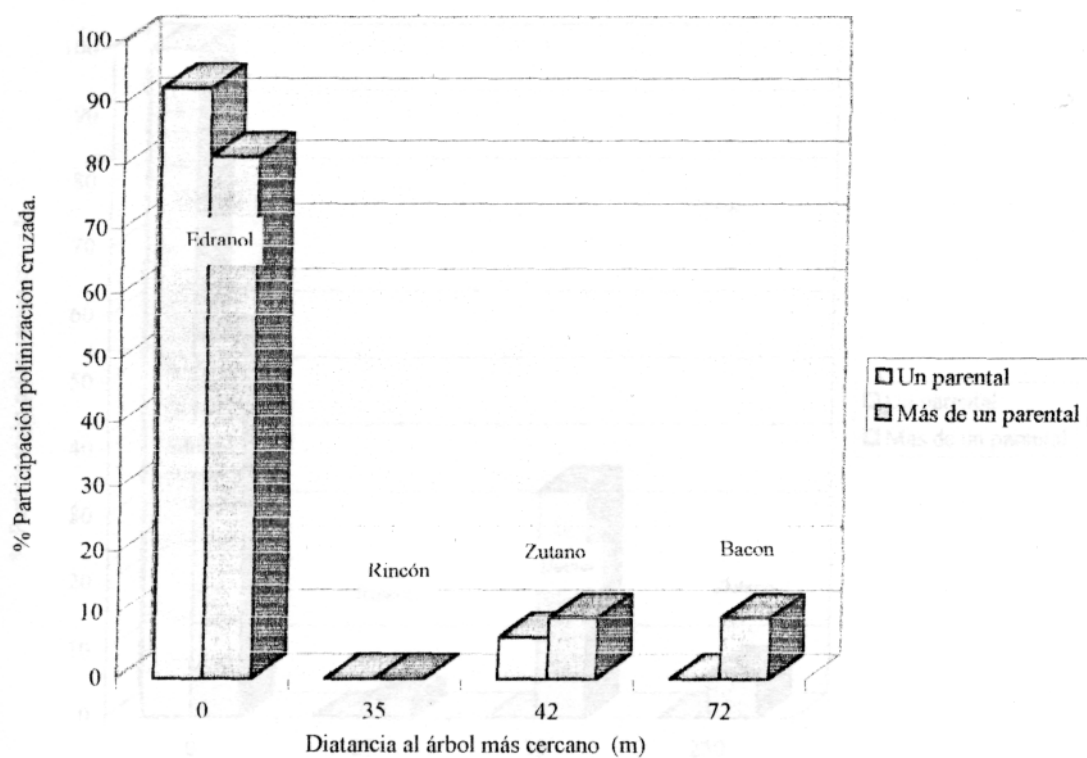


FIGURA 15. Participación de cada cultivar en el porcentaje de polinización cruzada de la parcela 16 del tratamiento Hass/Edranol, en relación a la distancia de los árboles muestreados con la fuente donadora de polen más cercana de cada cultivar.

CULTIVAR	%		DISTANCIA AL ÁRBOL MÁS CERCANO (m)
ZUTANO	0	(7, 0)	250
RINCON	0	(2, 7)	25
EDRANOL	100	(56, 3)	0
BACON	0	(33, 8)	35

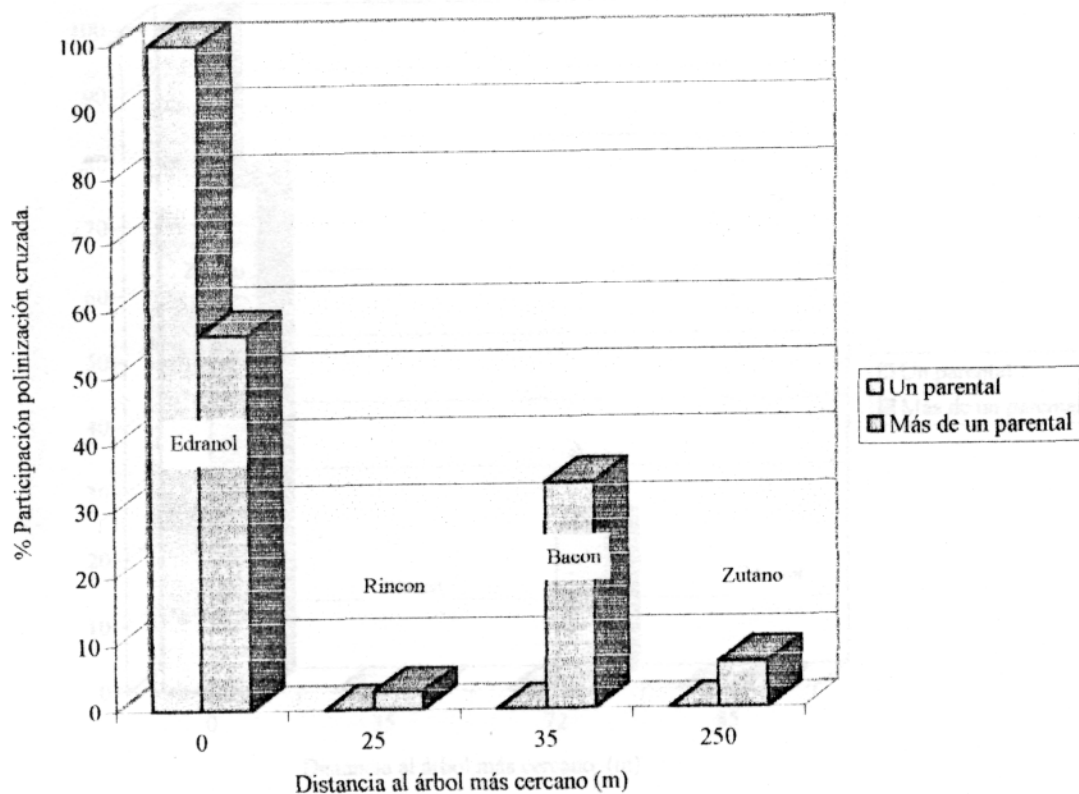


FIGURA 16. Participación de cada cultivar en el porcentaje de polinización cruzada de la parcela 1 del tratamiento Hass/Zutano, según distancia de los árboles muestreados con la fuente donadora de polen más cercana de cada cultivar.

CULTIVAR	%		DISTANCIA AL ÁRBOL MÁS CERCANO (m)
ZUTANO	100	(76,4)	0
RINCON	0	(0)	35
EDRANOL	0	(0)	85
BACON	0	(23,5)	72

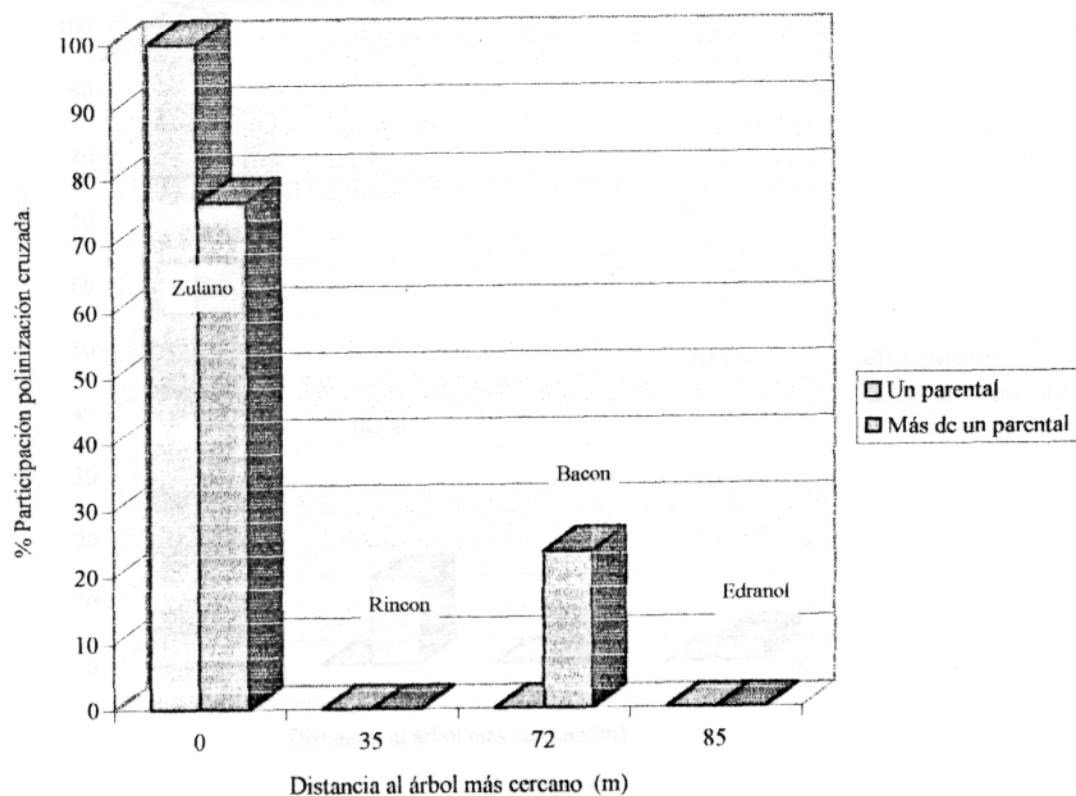


FIGURA 17. Participación de cada cultivar en el porcentaje de polinización cruzada de la parcela 10 del tratamiento Hass/Zutano, en relación a la distancia de los árboles muestreados con la fuente donadora de polen más cercana de cada cultivar.

CULTIVAR	%		DISTANCIA AL ÁRBOL MÁS CERCANO (m)
ZUTANO	100	(83,3)	0
RINCON	0	(0)	35
EDRANOL	0	(3,3)	42
BACON	0	(13,3)	25

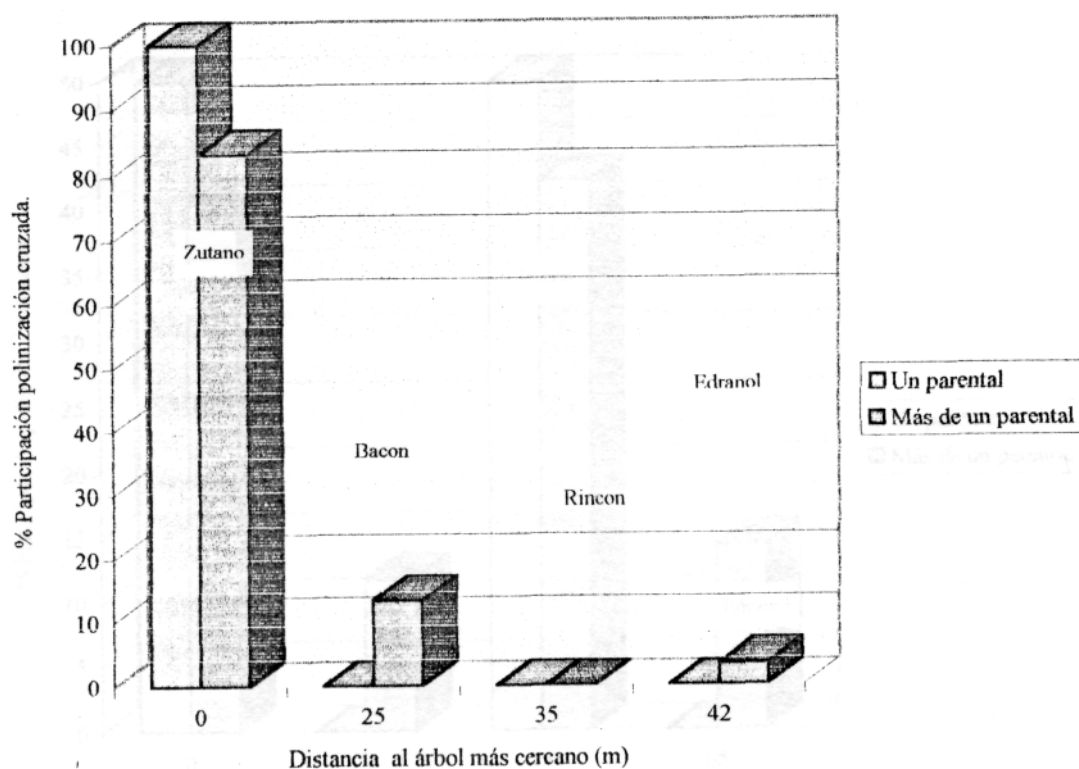
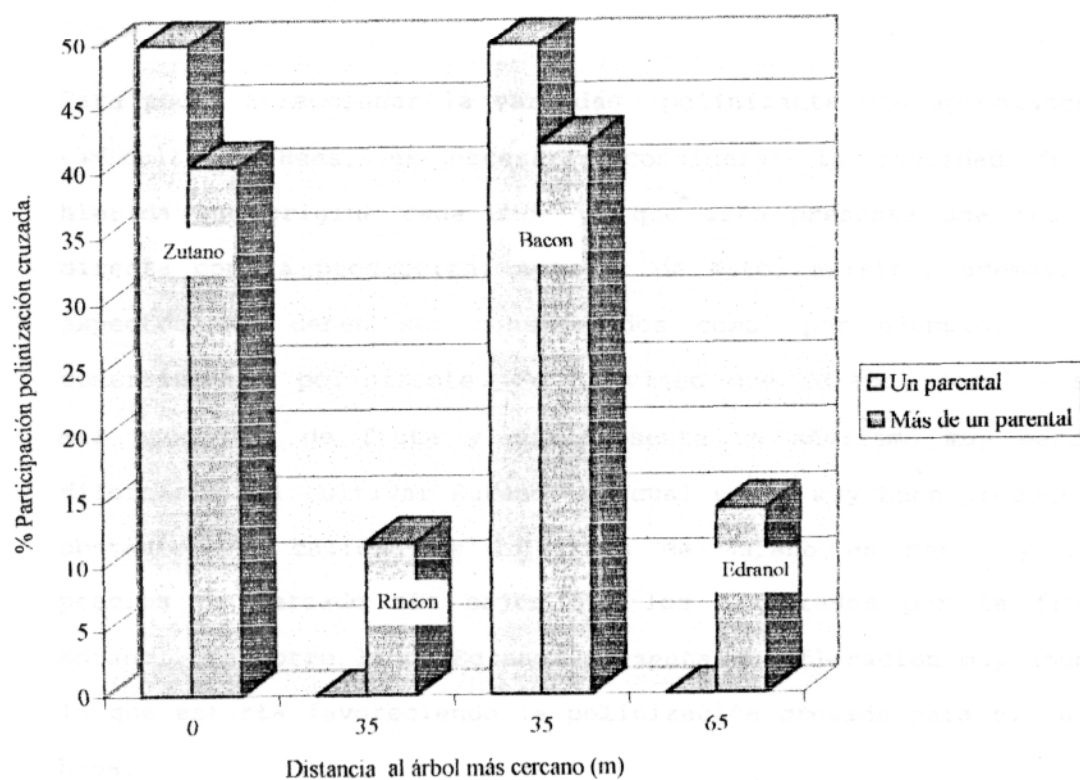


FIGURA 18. Participación de cada cultivar en el porcentaje de polinización cruzada de la parcela 19 del tratamiento Hass/Zutano, en relación a la distancia de los árboles muestreados con la fuente donadora de polen más cercana de cada cultivar.

CULTIVAR	%		DISTANCIA AL ÁRBOL MÁS CERCANO (m)
ZUTANO	50	(40, 5)	0
RINCON	0	(11, 8)	35
EDRANOL	0	(14, 3)	65
BACON	50	(33, 4)	35



Se puede apreciar que la polinización cruzada de los tratamientos Hass/Zutano y Hass/Edranol proviene, casi en la totalidad de los casos, del polinizante (Zutano y Edranol, respectivamente), lo que es más evidente cuando se analizan los casos con un sólo parental donador de polen. En el tratamiento de Hass sin polinizante, en cambio, el polen parental proviene de árboles de las cuatro variedades presentes, especialmente de Zutano y Bacon, ubicados a distancias, en general, menores a los 50 metros. Sin embargo, se aprecia en los resultados, que no existe una relación directa entre la distancia a la fuente donadora de polen y el porcentaje de polinización cruzada. Los porcentajes de polinización cruzada con Bacon son significativamente mayores que los aportados por Rincón. Lo mismo se puede observar para Zutano en el tratamiento Hass/Edranol.

Para poder seleccionar la variedad polinizante más apropiados para el cultivar Hass, es necesario considerar la cantidad de fruta híbrida que origina cada uno, ya que esto presenta una incidencia directa con la producción. A pesar de ésto, existen, además, otros aspectos que deben ser considerados como, por ejemplo, el valor comercial del polinizante. Se ha visto que Edranol resulta ser un mal productor de fruta y que presenta un añerismo muy marcado a diferencia del cultivar Zutano, el cual es un muy buen productor. No obstante, la calidad de la fruta de Zutano es menor y alcanza precios de mercado más bajos que los alcanzados por la fruta de Edranol. Por otro lado, Edranol presenta una floración muy abundante lo que estaría favoreciendo la polinización cruzada para el cultivar Hass.

La distancia hasta la cual influye un polinizante como donador de polen, es otro aspecto fundamental de considerar a nivel de huerto para poder determinar la densidad de polinizante necesaria para garantizar un alto porcentaje de fruta híbrida y una mayor producción.

En el Cuadro 10 se presentan los resultados obtenidos en el ensayo N°2 para las distintas distancias de la fuente donadora de polen ensayadas, en cuanto a los parentales donadores de polen.

CUADRO 10. Parentales donadores de polen obtenidos para los individuos analizados en cada tratamiento.

Posible parental donador de polen	Hilera 1	Hilera 2	Hilera 3	Hilera 4	Hilera 5	Hilera 6
Hass	3	1	0	5	2	5
Edranol	20	16	15	13	17	8
H-E	3	3	7	2	2	7
H-B	0	3	0	2	3	2
E-B	3	2	4	4	2	1
H-E-B	1	5	4	4	3	3
Total de casos	30	30	30	30	29	26

Dos o más letras significa que no se pudo discriminar un solo parental donador de polen.

Se observa, en este cuadro, que existe un número importante de casos en que no fue posible discriminar un sólo parental donador de polen. Es importante destacar que los genotipos para las enzimas analizadas de las variedades Edranol y Hass son muy similares y

pocas veces es posible discriminar una de la otra y, que la pérdida de la enzima LAP significó en este caso reducir la posibilidad de lograr asignaciones individuales del parental donador de polen, ya que ésta aporta información fundamental en ese sentido.

En el Cuadro 11 se presentan, por un lado, los porcentajes de polinización cruzada obtenidos a las distintas distancias de la fuente donadora de polen (tratamientos) y por otro los resultados obtenidos al considerar los casos con más de un posible parental donador de polen se presentan en el Cuadro 12.

CUADRO 11. Porcentaje de polinización cruzada obtenido para cada hilera (tratamiento) y cada árbol (repetición), considerando los casos en que se logró identificar un sólo parental donador de polen.

Tratamiento	Árbol 1	Árbol 2	Árbol 3	Media
Hilera 1	87,5	75,0	100,0	87,5
Hilera 2	100,0	100,0	85,7	95,2
Hilera 3	100,0	100,0	100,0	100,0
Hilera 4	60,0	100,0	57,1	72,3
Hilera 5	100,0	85,7	75,0	86,9
Hilera 6	80,0	100,0	20,0	66,6

Al practicar los análisis estadísticos a estos resultados, se pudo concluir, con un 5% de significancia, que no existen diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a los porcentajes de polinización cruzada; es decir, entre 12 y 72 metros de distancia de la fuente donadora de polen (Edranol), los porcentajes de polinización cruzada fueron estadísticamente iguales.

CUADRO 12. Porcentajes de polinización cruzada obtenidos en cada hilera (tratamiento) y cada árbol (repetición), incluyendo los frutos con más de un posible parental de polen.

Tratamiento	Árbol 1	Árbol 2	Árbol 3	Media
Hilera 1	81,6	70,0	100,0	83,8
Hilera 2	86,7	73,3	93,4	84,5
Hilera 3	83,4	91,7	76,7	83,9
Hilera 4	58,4	91,7	66,7	72,2
Hilera 5	96,7	78,3	70,0	81,6
Hilera 6	66,7	77,8	31,3	58,6

Al analizar los resultados estadísticamente, se obtuvo que con un 5% de significancia no existe una diferencia relevante entre los tratamientos, en cuanto a los porcentajes de polinización cruzada.

Los altos valores de polinización cruzada observados, al igual que el hecho de que los porcentajes de polinización cruzada sean estadísticamente iguales entre 12 y 72 metros de distancia de la fuente donadora de polen, concuerda con reportes previos de VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND (1985), quienes observaron un 42,2% de polinización cruzada con Bacon en un huerto de Hass ubicado a 76 metros del árbol de Bacon más cercano y de GOLDRING, GAZIT y DEGANI (1987), quienes reportaron que casi todos los frutos de Hass provenientes de un bloque sólido de 10 hileras vecino a un bloque de Ettinger eran híbridos de Ettinger.

En el Cuadro 13, se puede ver la influencia del cultivar Edranol sobre los porcentajes de polinización cruzada obtenidos en cada tratamiento considerando los casos en que se pudo realizar una asignación individual del parental donador de polen. La misma

información, pero considerando los casos en que no se pudo hacer una asignación individual, se presenta en el Cuadro 14; en ambos casos se agruparon las tres repeticiones de cada tratamiento.

CUADRO 13. Participación del parental donador de polen según cultivar, en el porcentaje de polinización cruzada de cada hilera, considerando los casos con el parental donador de polen identificado.

Tratamiento	Frutos Ensayados	Frutos con Donador de polen Identificado	Porcentaje parental donador de polen (según cultivar)		
			Hass	Edranol	Bacon
Hilera 1	30	23	13,0	86,9	0,0
Hilera 2	30	17	5,8	94,1	0,0
Hilera 3	30	15	0,0	100,0	0,0
Hilera 4	30	18	27,7	72,2	0,0
Hilera 5	29	19	10,5	89,5	0,0
Hilera 6	26	13	38,4	61,5	0,0

Se deduce de este cuadro que la participación del cultivar Edranol como donador de polen es muy superior a la presentada por Hass y que, por lo tanto, los porcentajes de polinización cruzada son significativamente mayores a los de autopolinización.

CUADRO 14. Participación del parental donador de polen según cultivar, en el porcentaje de polinización cruzada de cada hilera, considerando los frutos con más de un posible parental donador de polen.

Tratamiento	Frutos ensayados	Porcentaje parental donador polen (según cultivar)		
		Hass	Edranol	Bacon
Hilera 1	30	16,1	77,7	6,1
Hilera 2	30	18,8	65,5	13,8
Hilera 3	30	16,1	72,7	11,1
Hilera 4	30	27,7	57,7	14,4
Hilera 5	29	18,9	68,9	12,0
Hilera 6	26	40,4	50,0	9,6

Al analizar los casos con más de un posible parental donador de polen, los frutos polinizados con Edranol se ven "reducidos" y aumentan los casos de autopolinización, así como la participación de Bacon dentro de la polinización cruzada. El hecho de que el cultivar Bacon tenga participación en la polinización cruzada sólo cuando se analizan los casos con más de un posible parental donador de polen y que no exista ningún caso en que se haya podido asignar individualmente su participación, evidencia que probablemente su presencia en los resultados se deba sólo a deficiencias en cuanto a los análisis; es decir, que no se cuente con enzimas que permitan separarla de otras variedades. Del mismo modo, es posible inducir que el incremento en la participación de la autopolinización al considerar los casos dudosos se debe a problemas del mismo tipo, que los genotipos de las enzimas utilizadas no permiten separar las variedades Hass y Edranol en muchos casos.

El hecho de que no se presente una disminución en los porcentajes de polinización cruzada al alejarse de la fuente donadora de polen,

como sería lo esperado, ha sido analizado por GOLDRING, DEGANI y GAZIT (1987), quienes señalan que es posible que exista un gradiente inicial en la polinización cruzada que podría no ser detectado al tiempo de la cosecha, debido a una abscisión selectiva de los frutitos provenientes de autopolinización. Los autores señalan también que no se debería esperar un gradiente de polinización cruzada a través del huerto, debido a que el polen no es transferido directamente desde la variedad polinizante a la variedad Hass, sino que las abejas pueden realizar un recambio de polen en la colmena, lo que estaría permitiendo que el polen de la variedad polinizante se expandiera en forma más uniforme. Sin embargo, estudios realizados por GOLDRING, DEGANI y GAZIT (1987) y por DEGANI, GOLDRING y GAZIT (1989) señalan que la producción declina en la medida que los árboles se alejan de la fuente donadora de polen e incluso que el efecto de aumento de producción observado en árboles vecinos a un cultivar polinizante es significativa sólo en la primera hilera.

El hecho de que exista una declinación en la producción al alejarse de la fuente donadora de polen y, en cambio, no haya una disminución de los porcentajes de polinización cruzada, como señalan GOLDRING, DEGANI y GAZIT (1987), evidencia la ocurrencia de una abscisión selectiva de frutitos, dependiente del polen parental; ya que es probable que la fruta polinizada con Ettinger disminuya al alejarse de la fuente y origine una menor producción a pesar de no existir una variación porcentual de los rangos de polinización cruzada.

Este fundamento puede ser también aplicado en este estudio para justificar que no haya una variación porcentual de la polinización cruzada al alejarse hasta 72 metros del polinizante.

Debido a la fuerte influencia de la temperatura durante floración en el comportamiento floral, se ha reportado que, bajo ciertas condiciones climáticas, el traslape entre los estados femenino y masculino es suficiente para garantizar una polinización adecuada y una producción satisfactoria.

Las zonas en que se cultiva el palto en Chile difieren bastante en cuanto a sus condiciones climáticas y esto podría estar determinando que, en ciertas zonas de cultivo de la especie, las condiciones de temperatura, especialmente durante la floración, permitieran un alto rango de autopolinización, pudiendo lograr buenas producciones aun sin el uso de polinizantes.

En el Cuadro 15, se presenta los resultados obtenidos en el ensayo N°3, en cuanto a origen del polen que poliniza la fruta de huertos de Hass sin polinizante en cuatro condiciones climáticas diferentes.

CUADRO 15. Parentales donadores de polen obtenidos para los individuos analizados en cada zona climática.

Posible parental donador de polen	Panquehue	Longotoma	Mallarauco	Naltagua
Hass	10	16	11	9
Zutano	1	0	0	1
Bacon	2	0	1	0
H-E	8	12	27	6
H-B	16	15	7	3
Z-B	5	1	1	1
Z-R	0	0	1	0
E-B	1	0	0	0
H-E-B	20	18	22	13
Z-B-R	7	1	0	0
Total de casos	70	63	70	33

Dos o más letras significa que no se pudo discriminar a un solo parental donador de polen.

Al observar los resultados obtenidos, se puede apreciar que existen muy pocos casos en que se logró realizar asignaciones individuales respecto al donador de polen, incluso que el cultivar Hass pudo ser reconocido en muy pocos casos como único donador posible. Además, existe una gran diversidad en cuanto a combinaciones de posibles parentales. A pesar de que este hecho no permite afirmar que el origen de la fruta no sea de autopolinización, los resultados se alejan mucho de lo esperable, ya que los bloques de Hass seleccionados para este ensayo se hallaban a distancias muy elevadas de cualquier otra variedad, por lo que debió haberse encontrado una gran cantidad de fruta proveniente de autopolinización.

Al respecto, se debe señalar que para los huertos utilizados en este ensayo, las distancias a posibles variedades polinizantes fueron de

aproximadamente 1000 m. (Panquehue: 1000 m de Bacon; Mallarauco: 800 m de Bacon; Naltagua 1200 m de Bacon y Mallarauco: 800 m de Bacon y 300 m de Gwen). Sin embargo, es necesario destacar que los posibles donadores de polen de estos huertos no corresponden necesariamente a los utilizados para realizar las asignaciones, es posible que hayan existido árboles de otra variedad que hayan estado aportando polen y cuyos genotipos para las enzimas analizadas se desconocen. Esto puede estar explicando en parte, la gran cantidad de casos en que no se asignaron individualmente los parentales y la gran diversidad de combinaciones de posibles parentales.

En el Cuadro 16 se presentan los valores de polinización cruzada obtenidos, por calibre para las distintas zonas climáticas considerando los casos en que se asignó individualmente al parental donador de polen.

CUADRO 16. Porcentaje de polinización cruzada obtenido para cada zona y por calibre, considerando sólo los casos con parental donador de polen identificado.

Zona climática	Calibre	Porcentaje de polinización cruzada.
Panquehue	Grande	50
	Chico	0
Longotoma	Grande	0
	Chico	0
Mallarauco	Grande	0
	Chico	25
Naltagua	Grande	10

Es necesario destacar de este Cuadro, que existe una gran variabilidad entre los porcentajes de polinización cruzada por zona

e incluso por calibre, dentro de una misma zona. Sin embargo, esta variabilidad está asociada al reducido número de casos en que se asignó individualmente un parental, más que a una variación real de los rangos de polinización cruzada. Esto se puede apreciar al observar el Cuadro 17 en el que se presentan los porcentajes de polinización cruzada obtenidos al analizar los casos con más de un posible parental donador de polen.

CUADRO 17. Porcentaje de polinización cruzada obtenido en cada zona y por calibre, considerando los casos con más de un posible parental donador de polen.

Zona climática	Calibre	Porcentaje de polinización cruzada
Panquehue	Grande	68,6
	Chico	49,7
Longotoma	Grande	44,7
	Chico	54,2
Mallarauco	Grande	38,5
	Chico	48,9
Naltagua	Grande	45,9

Al analizar estadísticamente estos datos, se obtuvo que al 5% de significancia no existen diferencias significativas entre los calibres en cuanto a los porcentajes de polinización cruzada. En el Cuadro 18, se presentan los porcentajes de polinización obtenidos agrupando los calibres grande y chico, considerando los casos en que se identificó un sólo parental; por su parte, en el Cuadro 19, se presentan los resultados obtenidos para los casos con más de un posible parental donador de polen.

CUADRO 18. Porcentaje de polinización cruzada obtenido en cada zona, considerando sólo los casos con parental donador de polen identificado.

Zona climática	Total de frutos analizados	Frutos con donador de polen identificado	Porcentaje de polinización cruzada
Panquehue	70	13	23,1
Longotoma	70	16	0
Mallarauco	63	12	8,3
Naltagua	33	10	11,1

Al observar los resultados presentados en este cuadro, se puede apreciar que existe un porcentaje no despreciable de polinización cruzada. Cabe destacar que en este análisis (con sólo los casos de parental único identificado), el hecho de encontrar casos de polinización cruzada significa que Hass pudo ser descartado en forma absoluta como parental de esos frutos. Si bien es cierto que los porcentajes de polinización cruzada obtenidos en los huertos de Hass compactos distan mucho de los obtenidos al analizar parcelas con polinizante, estos porcentajes son considerablemente altos si se considera la gran distancia en que se encontraban de posibles polinizantes.

CUADRO 19. Porcentaje de polinización cruzada obtenido en cada zona considerando los casos con más de un posible parental donador de polen.

Zona climática	Total frutos analizados	Porcentaje de polinización cruzada
Panquehue	70	59
Longotoma	70	49,5
Mallarauco	63	43,7
Naltagua	33	45,9

La gran diferencia observada entre los resultados obtenidos en este caso y los del Cuadro 18, se puede explicar a través del bajo número de casos en que se determinó un parental único, lo que origina un alto rango de error al distribuir la probabilidad entre todos los posibles donadores de polen.

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que es posible tener polinización cruzada aun a grandes distancias de la variedad polinizante. El hecho de haber obtenido un número no despreciable de casos en que se descartó la autopolinización, estaría corroborando los reportes de VRECENAR-GADUS y ELLSTRAND (1985), quienes explican el buen rendimiento obtenido en huertos compactos de una sola variedad a través del aporte de polen que realizan cultivares complementarios ubicados a distancias considerables de la variedad principal.

A pesar de que estudios realizados por GOLDRING, GAZIT y DEGANI (1987) señalan que no existe una declinación al alejarse de la fuente donadora de polen (hasta 76 m), en cuanto al polinización cruzada, situación que explican a través de un intercambio de polen en la colmena, las distancias de las fuentes donadores de polen en el caso de este ensayo fueron mayores y los porcentajes de polinización cruzada difícilmente pueden ser explicados a través de esa teoría.

Resulta, en cambio, más probable pensar en la ventaja que presentan ciertos cultivares donadores de polen sobre la fruta proveniente de polen de Hass, lo que estaría justificando que la, probablemente,

baja cantidad de flores que recibe polen de algún otro cultivar sobreviva hasta la cosecha en un alto porcentaje.

5. CONCLUSIONES

Se logró determinar los porcentajes de autopolinización y de polinización cruzada en los tres ensayos realizados mediante el uso de la técnica de electroforesis con isoenzimas como marcadores genéticos, en embriones de frutos.

Al evaluar los porcentajes de polinización cruzada obtenidos en las combinaciones Hass/Zutano, Hass/Edranol y Hass sin polinizante, se observó que el mayor valor promedio se obtuvo con Edranol como polinizante, con un 100% de polinización cruzada, diferenciándose significativamente del porcentaje de polinización cruzada obtenido en el tratamiento sin polinizante, cuyo valor promedio fue 55,5%. Sin embargo, el tratamiento que contenía a Zutano como polinizante no se diferenció significativamente de ninguno de los anteriores, presentando un porcentaje de polinización cruzada promedio de 83,7%.

Ambos cultivares (Zutano y Edranol) mostraron ser fuertes donadores de polen contribuyendo a la polinización cruzada de sus tratamientos con porcentajes de 83,3% y 91,3%, respectivamente.

Se determinó, además, que no existe diferencia significativa entre los porcentajes de polinización cruzada con Edranol entre 12 y 72 metros de distancia, obteniéndose un valor promedio de 84,7%.

Se concluyó que existe polinización cruzada a grandes distancias de la fuente donadora de polen, en las cuatro zonas productoras de

palto evaluadas, no pudiendo ser determinada la procedencia exacta del polen que la originó.

Sobre la base de los resultados obtenidos, se concluye que los cultivares Edranol y Zutano resultan ser los polinizantes más efectivos para el cultivar Hass, seguido por el cultivar Bacon, el cual a pesar de no haber sido considerado dentro de un tratamiento, mostró una fuerte influencia en la polinización cruzada de los tratamientos que se encontraban vecinos a él. El cultivar Rincón, en cambio, a pesar de encontrarse vecino a algunos tratamientos evaluados, presentó una participación despreciable en los porcentajes de polinización cruzada, mostrando ser un muy mal polinizante para el cultivar Hass.

El cultivar Hass mostró ser un débil autopolinizante, al ser fácilmente desplazado por otro polen parental al encontrarse asociado a un polinizante.

6. RESUMEN

Se realizaron tres ensayos paralelos, en un total de siete huertos plantados con el cultivar Hass, llevándose a cabo una evaluación de la influencia de distintos cultivares polinizantes sobre el cultivar Hass, en cinco zonas productoras de palto.

El objetivo general del estudio fue determinar los porcentajes de polinización cruzada y autopolinización en la progenie del cultivar Hass para las distintas combinaciones y condiciones de huerto, mediante el análisis del origen del polen parental en embriones de fruto, utilizándose isoenzimas como maracadores genéticos.

Se realizaron electroforesis en geles de almidón al 11%, utilizando 14 sistemas isoenzimáticos de LAP (leucinoaminopeptidasa), TPI (triosa fosfato isomerasa), 6PGD (6 fosfogluconato deshidrogenasa), GOT (glutamato oxalacetato transaminasa), SKDH (shiquimato deshidrogenasa), MDH (malato deshidrogenasa), PGM (fosfoglucomutasa) y PGI (fosfoglucosa isomerasa).

El primer ensayo se realizó en la Estación Experimental La Palma, perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso que se encuentra ubicada en la localidad de La Palma, provincia de Quillota. En él fueron evaluadas las combinaciones Hass/Zutano, Hass/Edranol y Hass sin polinizante, las que se encontraban con un marco de plantación de 10x10 con el polinizante al centro (quincunce).

El segundo ensayo se realizó en un huerto ubicado en la localidad de Mallarauco, el cual se encontraba plantado con un bloque del cultivar Hass plantado a 12x12, adyacente a un bloque del cultivar Edranol plantado a 7x7. En este caso, fueron evaluados los porcentajes de polinización cruzada y autopolinización obtenidos entre los 12 y 72 metros de distancia de la fuente donadora de polen.

El tercer ensayo se llevó a cabo en huertos del cultivar Hass sin polinizante cercano, ubicados en las localidades de Longotoma, Naltagua, Mallarauco y Panquehue.

Los resultados obtenidos señalan a Hass como un débil autopolinizante, siendo fácilmente desplazado por otro polen parental cuando se encuentra asociado a un cultivar polinizante. El mayor porcentaje de polinización cruzada se observó en la combinación de Hass con Edranol como polinizante.

Por otro lado, se observó que no existe diferencia significativa entre los porcentajes de polinización cruzada con Edranol entre los 12 y 72 metros de distancia de la fuente donadora de polen y que para los cuatro zonas productoras de palto evaluadas, existe un aporte de polen externo al huerto, originando un porcentaje no despreciable de fruta híbrida.

7. BIBLIOGRAFIA CITADA

- ARULSEKAR, S. and PARFIT, D. 1986. Isozyme analysis procedures from stone fruit, almond, grape, walnut, pistachio and fig. Hort Science 21(4): 928-933.
- BECKEY, R. 1989. To bee or not to be. Pollination of avocados. California Grower 13 (2): 30-32.
- BERGH, B.O. 1967. Reasons for low yields of avocados. California Avocado Society Yearbook 51:161-172.
- _____. 1968. Cross-pollination increases avocado set. California Citrograph 53:97-100.
- _____. 1969. Avocado (*Persea americana* Mill.) In : Ferwerda, F.P. and Witt, F.(eds): outlines of perennial crop breeding in the tropics. Netherlands, Landbouwhogeschool. pp.23-51.
- _____. 1975. Avocados. In Janick, J. and Moore, J.N. (eds): Advances in fruit breeding. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Indiana, pp.541-566.
- _____. and GARBER, M.J. 1964. Avocado yields increased by interplanting different varieties. California Avocado Society Yearbook 48:78-85.
- _____. and GUSTAFSON, C.D. 1958. Fuerte fruit-set as influenced by cross pollination. California Avocado Society Yearbook 42:64-66.
- _____. , GARBER, M.J. and GUSTAFSON, C.D. 1966. The effect of adjacent trees of other avocado varieties of Fuerte Fruit-set. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 89:167-174.
- BRINGHURST, G.J. 1952. Sexual reproduction in the avocado. California avocado Society Yearbook 1952:210-214.
- CALABRESE, F. 1992. El Aguacate. Palermo. Ediciones Mundiprensa. 249p.

- CARR, B. y JOHNSON, G. 1980. Polyploidy, plants and electrophoresis. In: LEWIS, W.L.(ed): Polyploidy-biological relevance, Plenum, New York. 13:521-528.
- CAUTÍN, R. 1988. Evaluación técnica y económica del comportamiento del palto (Persea americana Mill)cv. Fuerte asociado con los cv. Bacon, Edranol y Negra de la Cruz. Tesis Ing.Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 82p.
- CHANDLER, W. H. 1962. Frutales de hoja perenne. México, Hispanoamérica. 675p.
- COETZER, L.A. and ROBERTSE P.J. 1987. Pollination and Biology of Persea americana Fuerte. South African Avocado Grower association year book 10:43-45.
- CONKLE, M.T. , HODGSKISS, P.D., NUNNALLY, L.B. and Hunter, S.C. 1980. Starch Gel Electrophoresis of conifer Seeds: a laboratory manual. Pacific Southwest Forest and Range Experimental station. Forest Service, United States department of agriculture. 18p.
- DAVENPORT, T.L. 1989. Pollen deposition of avocado stigmas in Southern Florida. HortScience 24:844-845.
- DAVENPORT, T.L. and LAHAV, E. 1992. Is a pollinator required to maximize avocado production?. Proc. of Second World avocado Congress 1992. pp667-668.
- DEGANI, C. and GAZIT, S. 1984. Selfed and Crossed proportion of avocado progenies produced by caged pairs of complementary cultivars. Hort Science 19:258-260.
- DEGANI, C., GOLDRING, A., GAZIT, S. and LAVI, U. 1986. Genetic selection during the abscission of avocado fruitless. Hort Science 12:1187-1188.
- DEGANI, C., GOLDRING, A, and GAZIT, S. 1989. Pollen parent effect on outcrossing rate in Hass and Fuerte avocado plots during fruit development. J. Amer.Soc.Hort.Sci114(1): 106-111

ELLSTRAND, N.C. 1992. Sex and the single variety. California Growers 16(1).22-23.

GANDOLFO, S. 1995. Determinación de los porcentajes de autopolinización y polinización cruzada obtenidos en diferentes combinaciones de palto (*Persea americana* Mill.) cv. Hass con diferentes cultivares polinizantes (cv. Zutano, Rincón, Edranol, Bacon y Hass). Tesis Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 35p.

GARDÍAZABAL, F. y ROSEMBERG, G. 1991. Cultivo del palto. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 201p.

GOLDRING, A., GAZIT, S. AND DEGANI, C. 1987. Isozyme analysis of mature avocado embryos to determinate outcrossing rate in a Hass plot. J.Amer. Soc. Hort. Sci. 112:389-392.

GUIL, Y. and GAZIT, S. 1992. Pollination of the Hass avocado cultivar. Proc. of Second World Avocado Congress 1992. 241p.

GUSTAFSON, C.D. 1967. The avocado Industry in Israel. California Avocado Society Yearbook 51:85-88.

LESLEY, J.W. and BRINGHURST, R.S. 1952. Environmental conditions affecting pollination of avocados. California Avocado society Yearbook 1951:169-173.

LOOMIS, W.D. 1969. Removal of phenolic compounds during the isolation of plants enzymes. Methods Enzymol. 13:555-563.

_____. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plants enzymes. Methods Enzymol. 31:528-544.

MUNOZ, R.B. y JANKIEWICZ, L.S. 1984. Caída de frutos del aguacate en relación a su crecimiento, anillamiento del pedúnculo y descomposición de la cubierta de la semilla. Chapingo (45- 46):47-50.

OCHESE, J.J., JOULE, M.J. Y WEHLBURG, C. 1965. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Limusa, México. Vol I y II, pp.638-708.

- OSUNA, T. 1982. Estudio de la diferenciación floral y la expresión de la dicogamia en la variedad Fuerte de Aguacate (Persea americana mill.) en la región de Atlixoo, Puebla. Tesis M.S., Colegio de postgraduados, Institución de enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Chapingo, México. 85p.
- PAPADEMETRIOU, M.K. 1975a. A study of the viability of avocado pollen under natural conditions. *california avocado Society Yearbook* 58:74-77.
- _____. 1975b. Pollen tube growth in avocados (Persea americana Mill.). *california Avocado Society Yearbook* 1956/1940, 58:99-102.
- _____. 1976. Percentage fruit set in avocados (Persea americana Mill.). *California Avocado Society Yearbook* 1975/76:153-142.
- ROBINSON, T. and SAVAGE, E. 1926. Pollination of the avocado. U.S.D.A. circular 387.1-16.
- RODRÍGUEZ, F. 1982. El Aguacate. México, AGT. 167p.
- ROSEMBERG, G. y GARDÍAZÁBAL, F. 1987. El cultivo del palto. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 153p.
- RUHELE, G.D. 1963. The Florida avocado industry. Univ. Florida Agr. Exp. Sta. Bull. 602:24-28.
- SCHOLEFIELD, P.B., SEDGLEY, M. and ALEXANDER, D. 1985. Carbohydrate cycling in relation to shoot growth, floral initiation and development and yield in the avocado. *Scientia Horticulturae* 25:99-110.
- SCHROEDER, C.A. 1954. Some aspects of pollination in the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 1953/54, 38:159-162.
- SEDGLEY, M. 1977a. The effect of temperature in floral behaviour, pollen tube growth and fruit set in the avocado. *Journal of horticultural Science*. 52: 135- 141.

- _____. 1977b. Reduced pollen tube growth and the presence of callóse in the pistil of the male floral stage of the avocado. *Scientia Horticulturae* 7:27-36.
- _____. 1979a; ínter varietal pollen tube growth and ovule penetration in the avocado. *Euphytica* 28. 25-35.
- _____. 1979b. Light microscope study of the pollen tube growth, fertilization and early embryo and endosperm development in the avocado varieties Fuerte and Hass. *Annals of botany*. 46. 353-359.
- _____. 1980. Anatomical investigation of abscised avocado flowers and fruitlets. *Annals of Botany* 46:771-777.
- _____. 1987. Flowering, pollination and fruit-set of avocado. *South African Avocado Growers Association Yearbook* 10:42-43.
- _____. and ANNELS, C.M. 1981. Flowering and Fruit set in response to temperature in the avocado cultivar Hass. *Scientis Horticulturae* 14:27-33.
- _____. and GRANT, W.J. 1983. Effect of low temperatures during during flowering on floral cycle and pollen tube growth in the avocado cultivars. *Scientia Horticulturae*. 18:207-213.
- STOUT, A.B. 1923. A study in Cross-pollination of avocados in southern California. *California Avocado Association Yearbook* 7:29-45.
- THORP, ASPINAL and SEDGLEY, M. 1993. Influence of shoot age on floral development and early fruit set in avocado (*Persea americana* Mill.). cv.Hass. *Journal of Horticulturae Science* 68:654-655.
- TORRES, A.M. 1983. Fruit Trees. In: Tanksley, S.D. and Orton, T.J.(eds). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part B*. Elsevier Scientific, Amsterdam. pp.401-421.
- _____. and BERGH, B.O. 1978a. Isozymes as indicators of outcrossing among pinkerton seedlings. *California Avocado Society Yearbook* 62:103-110.
- _____. and _____. 1978b. Ysozymes of Duke and its derivatives. *California Avocado Society yearbook* 62:111-117.

- _____. and _____. 1980. Fruit and leaf isozymes as genetic markers in avocado. J.Amer. Soc. Hort. Sci. 105: 614-619.
- _____. , SOOST, R.K. and DIEDENHOFEN, U. 1978. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. Amer. J. Bot. 65:869-881.
- TRUSCEIT, M. and LEWIS, E. 1992. Application of the isozyme technique for identification of avocado cultivars. Suid-Afrikaanse Ayokadokwekersverenigings jaarboek 15: 70-71.
- VITHANAGE, V. 1990. The role of European honeybee (Aphis mellifera L.) in avocado pollination. Journal of Horticultural Science 65(1):81-86.
- VRECENAR, M. 1984. The effect of planting design on outcrossing rate and yield in the avocado. M.S. Thesis, Univ.of California, Riverside. 34p.
- VRECENAR-GADUS, M. and ELLSTRAND, N.C. 1985. The effect of planting on outcrossing rate and yield in the Hass avocado. Scientia Horticulturae. 27: 215-221.
- _____. 1990. Some thoughts on flowering in avocado trees. Journal of the South African Avocado Growers Association 10: 3-4.

ANEXOS

ANEXO 1

CUADRO 1. Peso y número de frutos obtenidos con 0 y 2 colmenas por hectárea. Los datos están basados en 36 árboles. El nivel de significancia está indicado por ** ($p=0.05$); n.s.= no significativo.

	Peso promedio de la fruta (kg)	Número promedio de frutos/árbol.
Sin colmenas	0.270	227.2
Con 2 colmenas	0.258	788.2
	n.s	**

Fuente: VITHANAGE, V., 1990.

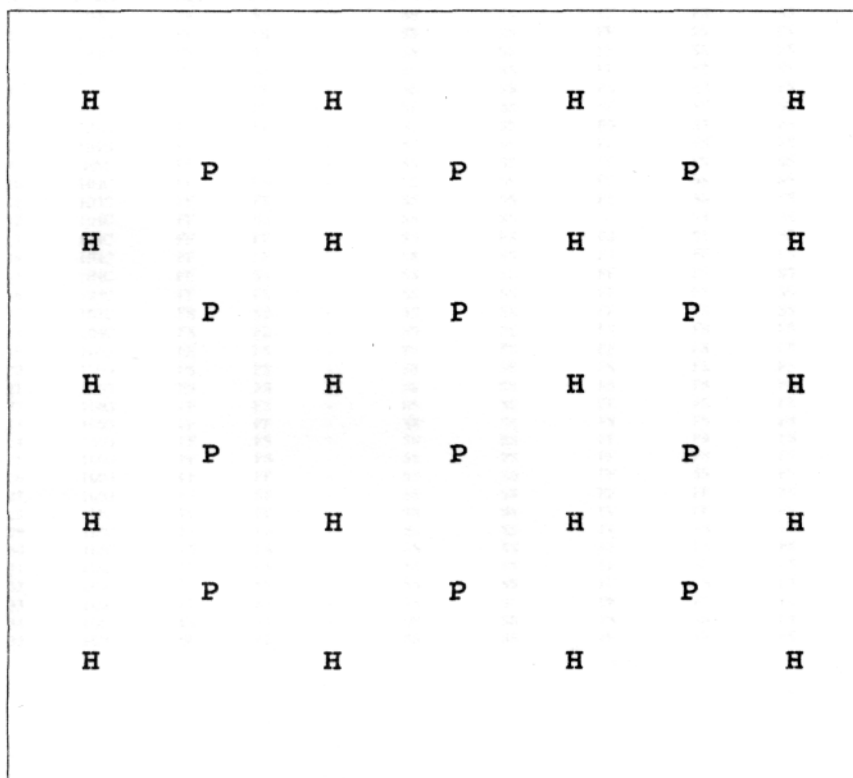
CUADRO 2. Peso y número promedio de frutos en tratamientos con 2 y 3 colmenas por hectárea. Los registros de producción están basados en 36 árboles. El nivel de significancia está indicado por ** ($p=0.05$); n.s.= no significativo.

	Peso promedio de la fruta (kg)		Número promedio de frutos/árbol	
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 1	Sitio 2
2 colmenas/ha	0.241	0.247	774.8	474.3
3 colmenas/ha	0.279	0.297	806.0	560.9
	**	**	n.s	n.s

Fuente: VITHANAGE, V., 1990.

ANEXO 2

CUADRO 1. Diseño de plantación correspondiente a una parcela tipo de la Estación Experimental La Palma. El esquema muestra la distribución del cv. Hass con el polinizante (P).



ANEXO 3

Planillas con los genotipos obtenidos en cada electroforesis para los distintos ensayos, tratamientos y calibres.

ENSAYO 1

PARCELAS 9 y 1.

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	HHG	FF	SS	-	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FS
2	HHG	FF	FS	-	SS	SS	FF	SS	FS	FS	FF	FS
3	HHG	FF	SS	-	SS	SS	FF	SS	FS	FF	FF	FF
4	HHG	FF	SS	-	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	SS
5	HHG	FS	FF	-	SS	SS	FS	SS	FS	FS	FS	SS
6	HHG	FF	FS	-	SS	SS	FF	SS	SS	SS	FF	FF
7	HHG	FS	FF	-	SS	SS	FS	SS	FS	FS	FF	-
8	HHG	FF	-	-	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
9	HM	FF	FS	-	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
10	HHC	FF	FS	-	SS	SS	FS	SS	SS	SS	FF	FS
11	HHC	FF	FS	-	SS	SS	FS	SS	SS	-	FF	-
12	HHC	FF	SS	-	SS	SS	-	SS	SS	FF	FS	FF
13	HHC	FF	FF	-	SS	FS	FS	SS	SS	FS	FS	FF
14	HHC	FF	FF	-	SS	SS	FS	FF	FS	FF	FF	FS
15	HHC	FF	SS	-	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FF
16	HHC	FF	FS	-	SS	SS	FF	FS	SS	-	FF	FS
17	HHC	FS	SS	-	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FF
18	HHC	FS	FS	-	SS	SS	FS	FS	FS	FS	FS	FF
19	HZG	FS	FS	-	SS	SS	FF	FS	FS	FS	FS	-
20	HZG	FS	FS	-	SS	SS	FS	FS	FS	FS	FF	FF
21	HZG	FS	FS	-	SS	SS	FS	FS	FS	FS	FF	FF
22	HZG	FF	FS	-	SS	SS	FF	FS	FS	FS	FF	FS
23	HZG	FF	FF	-	SS	SS	FS	FS	FS	FF	FF	FF
24	HZG	FF	FS	-	SS	SS	FF	FS	FS	FS	FF	SS
25	HZG	FF	FS	-	SS	SS	FF	FS	FS	FS	FS	FS
26	HZG	FF	FF	-	SS	SS	FF	SS	FS	FF	FS	FS
27	HZG	FS	SS	-	SS	SS	FF	FF	FS	FS	FS	FS
28	HZC	FF	FF	-	SS	SS	FF	FF	FS	FF	FF	FF
29	HZC	FS	FS	-	SS	SS	FF	SS	FS	FS	FF	-
30	HZC	FS	FS	-	SS	SS	FF	FS	FS	FS	FF	FS
31	HZC	FF	FS	-	SS	SS	FF	SS	FS	FS	FF	FS
32	HZC	FF	FS	-	SS	SS	FF	FS	FS	FS	FS	SS
33	HZC	FF	SS	-	SS	SS	FF	FF	FS	FS	FS	FF
34	HZC	FS	SS	-	SS	SS	FS	SS	FS	FF	FF	FS
35	HZC	FF	FS	-	SS	SS	FF	FF	FS	FF	FS	FF

Parcela 17 y parentales.

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	HEG	-	FF	SS	SS	SS	FF	FS	FS	FS	FF	FS
2	HEG	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FF
3	HEG	FF	FS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	SS
4	HEG	FS	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FS	FF
5	Z	FS	FS	FS	SS	SS	FS	FS	FF	FF	FS	FS
6	Z	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FS	FF	FF	FS	FS
7	Z	FS	FS	FS	SS	SS	FS	FS	FF	FF	FS	FS
8	Z	FS	-FS	FS	SS	SS	FF	FS	FF	FF	FS	FS
9	HEG	FF	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FS
10	HEG	FF	SS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FF
11	HEG	FF	SS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	SS	FS	FS
12	HEG	FF	FS	FS	SS	SS	-	FF	SS	SS	FF	FS
13	E	FS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FS	FS
14	E	FS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FS	FS
15	E	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FS	FS
16	E	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FS	FS
17	HEG	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FF	FS	FS	FF	FF
18	HEG	-	SS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FS	SS
19	HEC	-	SS	SS	SS	SS	FF	SS	SS	FF	FF	FF
20	HEC	FS	FS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FS	FF
21	B	FF	FS	FS	SS	SS	FS	SS	FS	FF	FS	FS
22	B	FF	FS	FS	SS	SS	FF	FS	FS	FF	FS	FS
23	B	FF	FS	FS	SS	SS	FS	FS	FS	FF	FS	FS
24	B	FF	FS	FS	SS	SS	FF	FS	FS	FF	FS	FS
25	HEC	FS	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	FF
26	HEC	FF	FS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	SS
27	HEC	FF	FF	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FF
28	HEC	FS	SS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	SS
29	H	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
30	H	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
31	H	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
32	H	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
33	HEC	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FF
34	HEC	FS	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	SS	FF	SS
35	HEC	FF	FS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FS	SS

Parcelas 10 y 3.

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	HZG	FS	FS	FS	-	-	FF	FS	FS	FS	FF	FS
2	HZG	FS	FF	SS	-	-	FF	SS	FS	FF	FS	FS
3	HZG	FF	FS	SS	-	-	FF	SS	SS	FS	FF	SS
4	HZG	FS	FS	FS	-	-	FS	SS	FS	FF	FS	FS
5	HZG	FS	FS	SS	-	-	FS	FS	FS	FS	FS	FS
6	HZG	FS	FF	FS	-	-	FS	FS	FS	FS	FF	FS
7	HZG	FS	FS	FS	-	-	FS	SS	FS	FF	FS	FS
8	HZG	FF	FS	SS	-	-	FS	FF	FS	FF	FS	FF
9	HZG	FF	FF	FS	-	-	FS	FS	FS	FF	FF	SS
10	HZC	FS	FS	FS	-	-	FS	FS	FS	FS	FS	FF
11	HZC	FF	FF	FS	-	-	FS	FS	FS	FF	FF	SS
12	HZC	FS	FS	SS	-	-	FS	FS	FS	FS	FF	SS
13	HZC	FS	FF	FS	-	-	FS	FS	FS	FF	FF	FF
14	HZC	FF	FS	SS	-	-	FS	FF	SS	FS	FF	FS
15	HZC	FF	FS	SS	-	-	FS	FF	SS	FS	FF	FS
16	HZC	FF	FF	SS	-	-	FS	FS	SS	SS	FF	SS
17	HZC	FF	FS	FS	-	-	FF	FS	FS	FS	FS	FS
18	HZC	FF	FS	SS	-	-	FS	SS	FS	FS	FS	SS
19	HEG	FF	FS	SS	-	-	FS	FS	SS	FF	FF	FS
20	HEG	FS	SS	SS	-	-	FF	FF	SS	SS	FF	FF
21	HEG	FS	FF	SS	-	-	FF	FF	SS	FS	FF	FS
22	HEG	FS	FS	FS	-	-	FF	FS	SS	FS	FF	FF
23	HEG	FS	FS	FS	-	-	FF	FF	SS	FS	FS	FF
24	HEG	FS	FS	FS	-	-	FF	FF	SS	FS	FF	FF
25	HEG	FS	FS	SS	-	-	FF	FS	SS	SS	FF	FF
26	HEG	FS	FS	FS	-	-	FF	FF	SS	FS	FF	FS
27	HEG	FF	FS	FS	-	-	FS	FS	SS	FF	FS	FS
28	HEC	FS	FF	SS	-	-	FS	FS	FS	FS	FS	FS
29	HEC	FF	FF	SS	-	-	FS	SS	FS	FF	FF	SS
30	HEC	FF	FS	FS	-	-	FF	FF	SS	FS	FF	FS
31	HEC	FS	FS	SS	-	-	FF	FF	SS	FS	FS	FF
32	HEC	FF	FS	FS	-	-	FS	FS	SS	SS	FF	FF
33	HEC	FF	FS	SS	-	-	FS	FF	SS	SS	FS	FS
34	HEC	FS	SS	SS	-	-	FS	FS	SS	FS	FS	FS
35	HEC	FF	FS	SS	-	-	FF	FF	SS	FS	FF	FS

Parcelas 11 y 19

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TP1	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH1	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	HHG	-	FF	SS	SS	-	FS	SS	SS	FS	FF	FF
2	HHG	-	FS	SS	SS	-	FS	FS	SS	FS	FF	SS
3	HHG	-	FS	FS	FS	-	FS	FF	FS	FS	FF	FF
4	HHG	-	FS	FS	FS	-	SS	FS	SS	FS	FF	FS
5	HHG	-	SS	FS	FS	-	FS	FS	FS	FS	FS	FS
6	HHG	-	FS	SS	SS	-	SS	FS	SS	F	FS	SS
7	HHG	-	SS	SS	SS	-	FF	FS	FS	FF	FF	FF
8	HHG	-	FF	SS	SS	-	FS	FF	SS	FS	FF	SS
9	HHG	-	FS	FS	FS	-	FF	SS	FS	FF	FS	FS
10	HHC	-	FS	SS	SS	-	FS	FS	SS	FF	FF	FS
11	HHC	-	FS	SS	SS	-	FS	FF	FS	FF	FS	FS
12	HHC	-	FS	SS	SS	-	FS	FS	SS	SS	FF	SS
13	HHC	-	FF	SS	SS	-	-	FS	FS	F	FS	FF
14	HHC	-	FF	SS	SS	-	FS	FF	SS	F	FF	FF
15	HHC	-	FF	FS	FS	-	FS	SS	FS	FS	F	FS
16	HHC	-	SS	FS	FS	-	FS	FF	SS	FS	FF	SS
17	HHC	-	FS	SS	SS	-	FF	SS	SS	FF	FF	FS
18	HHC	-	FF	SS	SS	-	SS	FS	SS	FS	FF	FF
19	HZG	-	FF	SS	SS	-	FS	FF	FS	FF	FS	FS
20	HZG	-	SS	SS	SS	-	FS	FS	FS	FS	FF	SS
21	HZG	-	FS	SS	SS	-	FS	SS	SS	SS	FF	FS
22	HZG	-	SS	FS	FS	-	FS	FS	FS	FF	FS	FS
23	HZG	-	SS	SS	SS	-	FS	FS	FS	FF	FF	FS
24	HZG	-	FS	SS	SS	-	FF	FS	FS	FF	FS	FS
25	HZG	-	FS	SS	SS	-	FS	SS	FS	F	FS	FS
26	HZG	-	FF	FS	FS	-	-	SS	FS	FS	FS	SS
27	HZG	-	SS	FS	FS	-	FF	FF	FS	FF	FF	FS
28	HZC	-	FS	SS	SS	-	FS	FF	SS	FS	FF	FS
29	HZC	-	FS	SS	SS	-	FS	FS	FS	FF	FS	FS
30	HZC	-	FS	SS	SS	-	FS	SS	F	FF	FF	SS
31	HZC	-	SS	FS	FS	-	FF	FS	SS	FS	FS	FF
32	HZC	-	FF	SS	SS	-	FS	SS	SS	FS	FF	FF
33	HZC	-	SS	FS	FS	-	FS	FF	F	FS	FF	FF
34	HZC	-	FF	SS	SS	-	FS	F	SS	FS	FF	FS
35	HZC	-	FF	SS	SS	-	FS	FS	FS	FS	FS	FS

PARCELAS 4 y 16

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TP1	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH1	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	HHG	FS	FS	SS	SS	-	-	SS	SS	-	FF	FS
2	HHG	SS	SS	SS	SS	-	-	FF	SS	-	FF	FS
3	HHG	FS	FS	SS	SS	-	-	FS	FS	-	FF	FS
4	HHG	FS	SS	SS	SS	-	-	SS	SS	-	FF	FS
5	HHG	FF	SS	SS	SS	-	-	SS	SS	-	FF	FS
6	HHG	FS	SS	SS	SS	-	-	FS	SS	-	FF	FS
7	HHG	FF	FF	-	SS	-	-	SS	SS	-	FF	FS
8	HHG	FF	FS	SS	SS	-	-	SS	SS	-	FF	FS
9	HHC	-	FF	SS	SS	-	FF	FS	FS	-	FF	FS
10	HHC	-	FF	SS	SS	-	FS	SS	SS	FF	FF	FS
11	HHC	-	FS	SS	SS	-	FF	FS	SS	-	FF	FS
12	HHC	FS	SS	SS	FS	-	SS	SS	SS	SS	FF	FS
13	HHC	FS	FS	SS	SS	-	FS	FS	FS	FS	FF	FS
14	HHC	FF	FF	SS	SS	-	FF	SS	FS	FS	FF	FS
15	HHC	FF	FS	SS	SS	-	FF	SS	SS	SS	FF	FS
16	HHC	FF	FS	SS	SS	-	FF	FS	SS	FS	FF	FS
17	GWEN	FF	FF	FS	FS	-	SS	FS	SS	FS	FF	FS
18	GWEN	FF	FF	FS	FS	-	SS	FS	SS	FS	FF	FS
19	GWEN	FF	FF	FS	FS	-	SS	FS	SS	FS	FF	FS
20	HEG	FS	F	SS	SS	-	FS	FS	SS	FF	FF	FS
21	HEG	FS	FS	FS	SS	-	FS	FS	SS	FS	FF	FS
22	HEG	FS	FS	SS	SS	-	FS	FF	SS	FF	FF	FS
23	HEG	FS	FS	SS	FS	-	FS	FS	FS	FF	FF	FS
24	HEG	FS	FS	FS	FS	-	FS	FS	SS	FS	FF	FS
25	HEG	F	SS	SS	SS	-	FS	FS	FS	FF	FF	FF
26	HEG	SS	SS	FS	SS	-	FS	FS	SS	FS	FF	FS
27	HEG	SS	SS	SS	SS	-	FS	FF	SS	FS	FF	FS
28	HEC	FF	FS	SS	SS	-	FS	SS	SS	FF	FF	FS
29	HEC	FF	FS	SS	SS	-	FS	FF	SS	FS	FF	SS
30	HEC	FS	FS	FS	SS	-	FS	SS	FS	FF	FF	SS
31	HEC	SS	SS	SS	SS	-	FS	FS	SS	FS	FF	FS
32	HEC	SS	FS	-	SS	-	FS	FF	SS	FF	FF	FS
33	HHC	FF	FS	SS	SS	-	FF	FF	SS	FS	FF	SS
34	HEC	-	FS	FS	SS	-	SS	FF	SS	FS	FF	FS
35	HEC	-	FS	SS	SS	-	FF	FF	SS	SS	FF	FS

ENSAYO 2

HILERAS 1 a 6, (H1-H-6).

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	H11	FS	FS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FF	FF
2	H11	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FF
3	H11	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FF
4	H11	FS	FS	SS	SS	-	FS	FS	SS	FS	FS	FS
5	H11	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FS
6	H11	FS	FS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FF
7	H11	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
8	H11	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	SS	FF	FS
9	H11	FS	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FF
10	H11	FS	FS	SS	SS	-	SS	SS	SS	FS	FF	SS
11	H12	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FF
12	H12	FF	FS	SS	SS	-	SS	FF	SS	FF	FF	SS
13	H12	FS	FS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FF
14	H12	FS	SS	SS	SS	SS	SS	FF	SS	FF	FF	SS
15	H12	FS	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FS
16	H12	FS	FS	SS	SS	SS	-	FS	SS	FF	FF	FS
17	H12	FS	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
18	H12	FS	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
19	H12	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS
20	H12	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FF
21	H13	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	SS	FS	FS
22	H13	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	-	FS	FF
23	H13	FF	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FS	FS
24	H13	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FS	FS
25	H13	FF	SS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	SS
26	H13	FS	FS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FS	FS
27	H13	FF	FS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FS	FS
28	H13	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FS	FS
29	H13	FF	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FS	FF
30	H13	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FS	FS
31	H21	FF	FS	SS	SS	SS	-	FF	SS	FS	FF	-
32	H21	FS	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FF
33	H21	FF	FS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FS	FF
34	H21	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	SS
35	H21	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FS	FS

Continuación

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	H21	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	SS
2	H21	FS	SS	FS	SS	SS	F	FF	SS	FS	FF	FS
3	H21	FS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	FF	FF	FS
4	H21	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	SS
5	H21	FF	FS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
6	H22	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FF
7	H22	FF	FS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	SS
8	H22	FS	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FF	FF	SS
9	H22	FF	SS	SS	SS	SS	FF	SS	SS	FF	FF	FS
10	H22	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
11	H22	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	SS
12	H22	FS	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FF
13	H22	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FF
14	H22	FF	FS	SS	SS	SS	FF	SS	SS	FF	FF	FS
15	H22	FF	FS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	FS
16	H23	FS	FS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FF	FS
17	H23	FS	SS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
18	H23	FS	SS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	SS	FF	FS
19	H23	FS	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	FF	FF	FS
20	H23	FF	SS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
21	H23	FF	FS	SS	SS	SS	SS	FS	SS	FS	FF	FS
22	H23	FS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FF	SS
23	H23	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FF
24	H23	FS	FS	FS	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS
25	H23	FS	SS	FS	SS	SS	SS	SS	SS	FS	FF	FS
26	H31	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	SS	FF	FF
27	H31	FS	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	SS	FF	SS
28	H31	FF	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS
29	H31	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	SS
30	H31	FS	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FF
31	H31	FF	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS
32	H31	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	SS	FF	FS
33	H31	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
34	H31	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FF	FF	FS
35	H31	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS

Continuación

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	H32	FF	SS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FF
2	H32	FF	SS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	SS
3	H32	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS
4	H32	FF	SS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FF
5	H32	FF	SS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS
6	H32	FF	FS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	FS
7	H32	FF	SS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS
8	H32	FS	SS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FF	FS
9	H32	FF	FS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
10	H32	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FF
11	H33	FS	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	SS
12	H33	FS	SS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS
13	H33	FF	FS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FF
14	H33	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS
15	H33	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS
16	H33	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS
17	H33	FF	SS	-	SS	SS	FF	FF	SS	SS	FF	FF
18	H33	FS	FS	-	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	SS
19	H33	FF	FS	-	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	SS
20	H33	FF	SS	-	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
21	H41	FF	FS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS
22	H41	FF	FF	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
23	H41	FF	FS	SS	SS	SS	SS	FS	SS	FS	FF	FS
24	H41	FF	FF	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FF
25	H41	FF	FS	SS	SS	SS	SS	FS	SS	FS	FF	FS
26	H41	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FS	FS
27	H41	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS
28	H41	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
29	H41	FF	SS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	FF	FF	FS
30	H41	FF	SS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
31	H42	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FS
32	H42	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
33	H42	FS	FS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FF
34	H42	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	FF
35	H42	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FS	FS

Continuación

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	H42	FF	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	FF
2	H42	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	SS
3	H42	FS	SS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FS	FS
4	H42	FS	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FS	FS
5	H42	FS	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
6	H43	FF	FF	SS	SS	SS	SS	FF	SS	FS	FF	FS
7	H43	FF	SS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FS	FS
8	H43	FS	FS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FF
9	H43	FS	FS	SS	SS	SS	-	FF	SSS	FS	FS	FS
10	H43	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FF	FF	FF
11	H43	FS	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	SS
12	H43	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FF
13	H43	FS	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FF	SS
14	H43	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FF
15	H43	FF	FS	SS	SS	SS	SS	FS	SS	FF	FF	FF
16	H51	FS	SS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS
17	H51	FF	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	FF	FF	SS
18	H51	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
19	H51	FS	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
20	H51	FS	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FF	FS	FF
21	H51	FS	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FS	SS
22	H51	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FF
23	H51	FF	FS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	SS
24	H51	FF	SS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FF
25	H51	FS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	FF	FS	FS
26	H52	FF	FS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	FS
27	H52	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
28	H52	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FS	FS
29	H52	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FS
30	H52	FF	FS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	SS	FF	FS
31	H52	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	SS
32	H52	FS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FS	FF
33	H52	FS	FS	SS	SS	SS	SS	FS	SS	FF	FF	FS
34	H52	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FS	FF
35	H52	FS	FS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FF	FF	SS

Continuación

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	H53	FF	FS	SS	SS	SS	SS	FS	SS	FS	FF	SS
2	H53	FF	FF	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
3	H53	FF	FS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FS	SS
4	H53	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FS	FS
5	H53	FF	SS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	FF	FF	FS
6	H53	FF	FF	SS	SS	SS	FS	SS	SS	FF	FF	FF
7	H53	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS
8	H53	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FS	FF
9	H53	FS	SS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
10	H61	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS
11	H61	FF	SS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FS	FF
12	H61	FF	SS	SS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	FF	SS
13	H61	FS	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FS	SS
14	H61	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS
15	H61	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FF
16	H61	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	SS	FF	SS
17	H61	FS	SS	FS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	SS
18	H61	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	SS	FF	FF
19	H62	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
20	H62	FS	SS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FS	FS
21	H62	FF	SS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FS	FF
22	H62	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FF
23	H62	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	FF
24	H62	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS
25	H62	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FF
26	H62	FS	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FF
27	H62	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	SS
28	H63	FF	FS	SS	SS	SS	SS	FS	SS	FS	FF	SS
29	H63	FF	FS	SS	SS	SS	FF	SS	SS	FS	FF	FS
30	H63	FF	FS	SS	SS	SS	SS	FF	SS	FF	FF	FS
31	H63	FF	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS
32	H63	FF	FS	SS	SS	SS	SS	FF	SS	FS	FF	FF
33	H63	FF	FS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS
34	H63	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FF	SS	SS	FF	SS
35	H63	FF	FS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	SS	FF	SS

ENSAYO 3.

HUERTO MALLARAUCA

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	M1G	-	FS	-	SS	SS	FF	SS	SS	FS	FF	FS
2	M1G	-	SS	-	SS	SS	FF	SS	SS	FF	FF	FS
3	M1G	-	FS	-	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FF
4	M1G	-	FS	-	SS	SS	FF	FS	FS	FF	FF	FS
5	M1G	-	SS	-	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS
6	M1G	-	FS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FF	FF	FF
7	M1G	-	FS	-	SS	SS	FS	SS	SS	SS	FF	FF
8	M1C	-	FS	-	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FF	FS
9	M1C	-	FS	-	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	SS
10	M1C	-	FS	-	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS
11	M1C	-	SS	-	SS	SS	FS	FS	SS	SS	FF	FS
12	M1C	-	FF	-	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	SS
13	M1C	-	FS	-	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FF
14	M1C	-	FS	-	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	FS
15	M2G	-	FS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
16	M2G	-	FF	-	SS	SS	FF	SS	SS	FF	FF	FS
17	M2G	-	FS	-	SS	SS	SS	FF	SS	SS	FF	FS
18	M2G	-	SS	-	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS
19	M2G	-	FF	-	SS	SS	FS	SS	SS	SS	FF	FS
20	M2G	-	FS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
21	M2C	-	FS	-	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	FS
22	M2C	-	FS	-	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	FF
23	M2C	-	SS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FF	FF	FF
24	M2C	-	FS	-	SS	SS	FS	FF	SS	FF	FF	FF
25	M2C	-	FF	-	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	FF
26	M2C	-	SS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FF	FF	FS
27	M2C	-	FS	-	SS	SS	FF	FF	SS	SS	FF	SS
28	M2C	-	FS	-	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS
29	M3G	-	SS	-	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS
30	M3G	-	SS	-	SS	SS	SS	SS	SS	FS	FF	FS
31	M3G	-	FS	-	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS
32	M3G	-	FS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
33	M3G	-	SS	-	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS
34	M3G	-	FS	-	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS
35	M3G	-	SS	-	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FF	FS

Continuación													
Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2	
1	M3C	-	FS	-	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS	
2	M3C	-	SS	-	SS	SS	FF	SS	SS	FS	FF	FF	
3	M3C	-	FS	-	SS	SS	FF	SS	SS	SS	FF	FS	
4	M3C	-	FS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FF	
5	M3C	-	FS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS	
6	M3C	-	FS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	S	
7	M3C	-	FS	-	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FF	
8	M4G	-	FS	-	SS	SS	FS	FF	SS	FF	FF	FF	
9	M4G	-	SS	-	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS	
10	M4G	-	FS	-	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	FS	
11	M4G	-	FS	-	SS	SS	FS	FS	SS	SS	FF	FF	
12	M4G	-	FS	-	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS	
13	M4G	-	SS	-	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	SS	
14	M4G	-	SS	-	SS	SS	SS	SS	SS	FS	FF	FF	
15	M4C	-	FS	-	SS	SS	SS	FF	SS	SS	FF	FS	
16	M4C	-	FS	-	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	FS	
17	M4C	-	FS	-	SS	SS	FF	FF	SS	FF	FF	SS	
18	M4C	-	FS	-	SS	SS	FF	SS	SS	FS	FF	FF	
19	M4C	-	FS	-	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS	
20	M4C	-	FS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS	
21	M4C	-	FS	-	SS	SS	FS	SS	SS	SS	FF	FS	
22	M5G	-	FS	-	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS	
23	M5G	-	FF	-	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS	
24	M5G	-	FS	-	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS	
25	M5G	-	SS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FF	FF	FS	
26	M5G	-	SS	-	SS	SS	SS	SS	SS	SS	FF	FF	
27	M5G	-	FS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS	
28	M5G	-	FF	-	SS	SS	SS	FS	SS	FS	FF	FS	
29	M5C	-	FS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	SS	
30	M5C	-	SS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS	
31	M5C	-	SS	-	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS	
32	M5C	-	FS	-	SS	SS	FS	SS	SS	FF	FF	FS	
33	M5C	-	FS	-	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS	
34	M5C	-	FF	-	SS	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FF	
35	M5C	-	FS	-	SS	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FF	

[illegible]

HUERTO PANQUEHUE

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	P1G	-	FS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS
2	P1G	-	FS	FS	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	FS
3	P1G	-	FS	SS	SS	FS	FS	FS	SS	FF	FF	FS
4	P1G	-	FS	SS	SS	FS	SS	FS	SS	FF	FF	FF
5	P1G	-	FS	SS	SS	SS	FF	FS	FS	FF	FF	FS
6	P1G	-	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	SS	FF	FS
7	P1G	-	FS	SS	SS	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FS
8	P1C	-	FS	SS	SS	FS	FS	FS	SS	FS	FF	FF
9	P1C	-	SS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS
10	P1C	-	FS	SS	SS	FS	FS	FS	SS	FS	FF	FF
11	P1C	-	FS	SS	SS	SS	SS	FS	SS	FS	FF	FS
12	P1C	-	SS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FS	FF	FS
13	P1C	-	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS
14	P1C	-	SS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	FF	FF	FS
15	P2G	-	FF	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FF	FF	FS
16	P2G	-	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FF	SS
17	P2G	-	FS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	FF
18	P2G	-	SS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	FS	FF	SS
19	P2G	-	FS	FS	SS	SS	FF	FS	FS	FF	FF	FF
20	P2G	-	FF	SS	SS	SS	FF	FS	FS	FF	FF	FS
21	P2G	-	FF	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
22	P2C	-	FS	SS	SS	SS	FF	SS	SS	FF	FF	SS
23	P2C	-	FF	SS	SS	SS	FS	FS	SS	SS	FF	FS
24	P2C	-	FS	SS	SS	SS	SS	FF	SS	SS	FF	FS
25	P2C	-	SS	SS	SS	SS	-	FS	SS	FF	FF	FS
26	P2C	-	FF	SS	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FF	FF
27	P2C	-	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	SS	FF	SS
28	P2C	-	FS	SS	SS	SS	-	FS	SS	FF	FF	FF
29	P3G	-	FS	SS	SS	SS	-	FF	SS	FS	FF	SS
30	P3G	-	FS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	FF	FF	SS
31	P3G	-	FS	FS	SS	SS	FF	FS	FS	FF	FF	FF
32	P3G	-	FF	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
33	P3G	-	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	FF	FF	FS
34	P3G	-	FS	SS	SS	SS	FS	FS	FS	FF	FF	FS
35	P3G	-	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	-	FF	SS

Continuación

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	P3C	-	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FF	FS
2	P3C	-	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FF	FS
3	P3C	-	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	-	FF	FS
4	P3C	-	FS	SS	SS	FS	SS	FS	SS	-	FF	FF
5	P3C	-	FS	SS	SS	FS	SS	SS	SS	-	FF	FF
6	P3C	-	FS	SS	SS	SS	FF	FS	SS	-	FF	FF
7	P3C	-	FF	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FF	FS
8	P4G	-	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FF	FF
9	P4G	-	SS	SS	SS	SS	FF	SS	FS	-	FF	SS
10	P4G	-	SS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FF	FS
11	P4G	-	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FF	FS
12	P4G	-	FF	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FF	SS
13	P4G	-	SS	SS	SS	SS	FS	SS	FS	-	FF	SS
14	P4G	-	FS	SS	FS	SS	FF	SS	SS	-	FS	FF
15	P4C	-	SS	SS	SS	SS	FS	FS	FS	-	FF	FS
16	P4C	-	SS	SS	SS	SS	FS	FS	FS	-	FF	FS
17	P4C	-	FS	SS	SS	SS	FF	SS	SS	-	FF	FS
18	P4C	-	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	-	FF	FS
19	P4C	-	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FF	FS
20	P4C	-	FS	SS	SS	SS	FF	FF	SS	-	FF	FS
21	P4C	-	FS	SS	SS	SS	FS	FF	SS	-	FF	FF
22	P5G	-	SS	SS	SS	SS	FS	FS	FS	-	FF	FS
23	P5G	-	SS	SS	SS	SS	FF	SS	FS	-	FF	FS
24	P5G	-	SS	SS	SS	SS	FF	SS	FS	-	FF	SS
25	P5G	-	FF	FS	SS	SS	FF	SS	FS	-	FS	FS
26	P5G	-	FS	SS	SS	SS	FS	FS	FS	-	FF	SS
27	P5G	-	FF	SS	SS	SS	FS	SS	SS	-	FF	FS
28	P5G	-	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FF	FS
29	P5C	-	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FF	SS
30	P5C	-	FF	SS	SS	SS	FF	FS	SS	-	FF	FS
31	P5C	-	SS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	-	FF	FS
32	P5C	-	FF	SS	SS	SS	SS	SS	SS	-	FF	FS
33	P5C	-	FS	SS	SS	SS	FS	SS	SS	-	FF	FS
34	P5C	-	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FF	FS
35	P5C	-	FS	SS	SS	SS	FS	FS	SS	-	FF	FS

HUERTO LONGOTOMA

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	L1G	-	FS	SS	FF	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
4	L1G	-	FF	SS	FF	FS	FS	FS	SS	SS	FF	FF
5	L1G	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	SS	FF	SS
6	L1G	-	SS	SS	FF	SS	FS	SS	SS	FF	FF	SS
7	L1G	-	FS	SS	FF	SS	FF	FS	SS	FS	FF	SS
8	L1G	-	SS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	SS	FF	FS
9	L1G	-	SS	SS	FF	SS	FS	SS	SS	FS	FF	FF
10	L1C	-	FS	SS	FF	SS	FS	SS	SS	SS	FF	FS
11	L1C	-	SS	SS	FF	SS	FF	FS	SS	FF	FF	FS
12	L1C	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	SS	FF	FS
13	L1C	-	FS	SS	FF	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FF
14	L1C	-	FF	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	SS
15	L1C	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FF
16	L1C	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
17	L2G	-	SS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FF	FF	FF
18	L2G	-	FF	SS	FF	SS	FF	SS	SS	SS	FF	FF
19	L2G	-	SS	SS	FF	SS	SS	SS	SS	FS	FF	FF
20	L2G	-	FF	SS	FF	FS	FS	FS	SS	FF	FF	SS
21	L2G	-	FS	SS	FF	FS	SS	SS	SS	FS	FF	FS
22	L2G	-	SS	SS	FF	SS	SS	FF	SS	FS	FF	FF
23	L2G	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	SS	FF	FF
24	L2C	-	SS	SS	FF	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FS
25	L2C	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
26	L2C	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	SS
27	L2C	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	S	FF	FF	FS
28	L2C	-	SS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	SS	FF	FS
29	L2C	-	FS	SS	FF	SS	FS	SS	SS	FF	FF	FS
30	L3G	-	FS	SS	FF	SS	FS	FF	SS	FS	FF	FF
31	L3G	-	FF	SS	FF	SS	FF	FF	SS	SS	FF	FS
32	L3G	-	FS	SS	FF	SS	FF	SS	FS	FS	FF	FS
33	L3G	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	FS	FS	FF	FS
34	L3G	-	SS	SS	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FF	FF
35	L3G	-	FS	SS	FF	FS	SS	FS	SS	FS	FF	FF

Continuación

Nº	INDIV	LAP2	PGI	TPI	6PGD1	6PGD3	6PGD4	SKDH	MDH	GOT	PGM1	PGM2
1	L3C	-	FS	SS	FF	SS	FF	FS	SS	FS	FF	FS
2	L3C	-	FS	SS	FF	SS	FF	SS	SS	FS	FF	FS
3	L3C	-	FF	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
4	L3C	-	SS	SS	FF	FS	SS	FS	SS	SS	FF	FS
5	L3C	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FF	FF	FF
6	L3C	-	SS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FF	FF	FS
7	HASS	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
8	L4G	-	FF	SS	FF	SS	FF	FS	SS	FF	FF	FS
9	L4G	-	FS	SS	FF	SS	FF	FF	SS	FF	FF	FS
10	L4G	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
11	L4G	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	SS	FF	FS
12	L4G	-	FS	SS	FF	SS	FF	SS	SS	FS	FF	FS
13	L4G	-	FS	SS	FF	FS	SS	FS	SS	FF	FF	FF
14	X	-	FS	FS	FS	SS	FF	FS	FS	FS	FS	FS
15	X	-	FS	FS	FS	SS	FF	FS	FS	FS	FS	FS
16	L4C	-	FS	SS	FF	SS	FF	SS	SS	FS	FF	FF
17	L4C	-	FF	SS	FF	SS	FS	SS	SS	FF	FF	FS
18	L4C	-	SS	SS	FF	FS	SS	FS	SS	FS	FF	SS
19	L4C	-	FS	SS	FF	SS	FS	FF	SS	FF	FF	FS
20	L4C	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FF	FF	FS
21	L4C	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
22	HASS	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
23	L5G	-	FF	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	SS
24	L5G	-	FF	SS	FF	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS
25	L5G	-	FS	SS	FF	FS	SS	SS	SS	FF	FF	FS
26	L5G	-	FS	SS	FF	SS	FF	FS	SS	SS	FF	FS
27	L5G	-	FF	SS	FF	SS	FS	FF	SS	SS	FF	FF
28	L5G	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FF
29	HASS	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FS	FF	FS
30	L5C	-	FS	SS	FF	SS	FF	SS	SS	FS	FF	FS
31	L5C	-	SS	SS	FF	SS	FF	SS	SS	FS	FF	FF
32	L5C	-	FS	SS	FF	SS	FF	SS	SS	FS	FF	FS
33	L5C	-	FS	SS	FF	SS	FS	FS	SS	FF	FF	FS
34	L5C	-	FF	SS	FF	FS	-	FF	SS	FS	FF	FS
35	L5C	-	FS	SS	FF	FS	SS	FS	SS	FF	FF	FS