

EFFECTO DE LA DISPERSIÓN DE POLEN SOBRE EL FLUJO
GÉNICO EN RAULÍ (*Nothofagus alpina* Poepp et Endl (Oerst)):
UNA APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética

Facultad de Ciencias

por

Ingrid Hebel Carreño

Mayo, 2002

Director de Tesis: Dr. Lafayette Eaton

DEDICATORIA

A Eliana, mi madre
A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al profesor Dr. Lafayette Eaton por acogerme como su alumna tesista. Gracias por sus sugerencias, consejos y por abrir una puerta al conocimiento.

A la Cooperativa de Mejoramiento, CONAF y Universidad Austral, especialmente a la Ing.For. Verónica Emhardt y al Ing.For. Roberto Ipinza, por darnos el material para realizar este estudio.

A la profesora Dra. Margarita Carú por permitirme desarrollar parte de mi tesis en su laboratorio y darme alguna guía en el perfeccionamiento de éste.

A los profesores Dr. Nelson Díaz y Dr. Ramiro Bustamante, por hacerme sugerencias para mejorar el trabajo escrito. Gracias por su tiempo.

Al Prof. Dr. Paul Hebel G, mi padre, por esas conversaciones tan fructíferas para poder llegar a cumplir mi meta.

Gracias a mis muy queridos colegas de laboratorio: Rafael Guevara, Gloria Mosquera y Juanita Leal que me dieron siempre un gran impulso a que este trabajo llegara a buen término, me fortalecieron y me ayudaron. Gracias por su apoyo incondicional y por las buenas horas de trabajo que compartimos.

A Mónica Chavez, Patricia Lodato, Salvador Barahona y Patricio Retamales por tener siempre una buena disposición a mis consultas y requerimientos.

A Basilio Carrasco y Oscar Chandía por su apoyo en terreno.

Al Dr. José Valencia por su apoyo y ayuda.

A mi esposo Ricardo Jaña, por su constante apoyo en las horas de decaimiento, gracias por su comprensión, cariño y ayuda. Gracias por las sugerencias para un trabajo mejor y no renunciar en el intento.

A mi Madre y a mi Hija Renate, por ser tan buenas y dejar desarrollarme como profesional y mamá.

Gracias a Lynn Cid, mi amiga, que me apoyó en el momento justo.

INDICE DE MATERIAS

INTRODUCCION **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

ANTECEDENTES GENERALES DE LA ESPECIE	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FLUJO GÉNICO Y ANÁLISIS DE PATERNIDAD	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
OBJETIVOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
OBJETIVO GENERAL	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
HIPÓTESIS DE TRABAJO.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

MATERIALES Y MÉTODOS **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

UBICACIÓN DEL HUERTO Y SUS CARACTERÍSTICAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL DE LOS PADRES E HIJOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
DEFINIDO.	
PROGENITORES	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
DESCENDIENTES	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
MATERIAL VEGETAL ANEXO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
CARACTERIZACIÓN ISOENZIMÁTICA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
CARACTERIZACIÓN DE SSR	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
CONDICIONES DE PCR	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DENATURANTE (10%) Y TINCIÓN CON PLATA (1%).	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
PROBABILIDAD DE EXCLUSIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

RESULTADOS **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

SIEMBRA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
GERMINACIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ANÁLISIS DE LAS SEMILLAS ATROFIADAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

PLANTAS GEMELAS O MELLIZAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
HÍBRIDOS O POLINIZACIÓN CON POLEN EXTRAÑO AL HUERTO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
CARACTERIZACIÓN ISOENZIMÁTICA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ANÁLISIS DE PATERNIDAD SECUENCIAL CON MARCADORES SSR	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
VARIABILIDAD DEL MARCADOR	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
PROBABILIDAD DE EXCLUSIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ANÁLISIS DE PATERNIDAD POR EXCLUSIÓN SECUENCIAL	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ANÁLISIS DE LA FLORACIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ANÁLISIS DE TRES VARIABLES EN CONJUNTO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

DISCUSIÓN ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

CONCLUSIONES ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

BIBLIOGRAFÍA ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ANEXOS ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

LISTA DE TABLAS

- TABLA 1. NÚMERO DE HIJOS CON EXTRACCIÓN DE DNA **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- TABLA 2. EXCLUSIÓN BASADO EN EL ANÁLISIS DE LOS PRIMERS 30 Y MAQ4..... **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- TABLA 3. RESUMEN DEL NÚMERO DE HIJOS RESPECTO A LOS ACIERTOS DE PADRES.....**¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- TABLA 4. PATERNIDAD POR EXCLUSIÓN PARA ACIERTOS DE UNO A TRES PADRES.. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- TABLA 5 TABLA DE CONTINGENCIA..... **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

LISTA DE FIGURAS

- FIG. 1. HOMOGENEIDAD DE LA NUBE DE POLEN (PANMIXIA). **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 2. DIAGRAMA DE LOS CLONES CON MAYOR TENDENCIA A CRUZARSE. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 3. HUERTO SEMILLERO COOPERATIVA DE MEJORAMIENTO, CONAF Y U.AUSTRAL. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 4. INVERNADERO FRÍO. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 5. SIEMBRA EN GROWERS (DE FLORA CENTER). **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 6. SIEMBRA EN GROWERS (DE FLORA CENTER). **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 7. GEL DE POLIACRILAMIDA CON PRIMER 30. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 8. VARIABILIDAD EN EL TAMAÑO DE LAS SEMILLAS (CLON 36) ... **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 9. CORRELACIÓN ENTRE CANTIDAD DE SEMILLAS Y % DE GERMINACIÓN. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 10. SEMILLAS DEL CLON 31 CON MÁS DE UNA RAÍZ **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 11. PLANTA HÍBRIDA (HIJO 2.21). **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 12. GEL POLIACRILAMIDA DE HIJOS DEL CLON 2 **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 13. ALELOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE PATERNIDAD **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 14. HIJOS DE LOS CLONES 23 Y 31. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- FIG. 15. SECCIÓN DEL HUERTO PARA ANÁLISIS DE PATERNIDAD CLON 31 **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

RESUMEN

Se evaluó la dispersión y la uniformidad de la nube de polen de Raulí (*Nothofagus alpina* Poepp et Endl (Oerst)), y cómo ello afectaría la variabilidad genética que se encuentra en poblaciones naturales, a través del análisis de paternidad por exclusión secuencial, utilizando SSR (Simple Sequence Repeat), para estimar la influencia de este agente en el flujo génico en esta especie, descartando el flujo por “semillas”. Dado que esta especie es anemófila, de polinización cruzada, monoica y presumiblemente autoincompatible, la forma más directa y precisa para determinar la herencia y el movimiento de los genes es a través del análisis de la descendencia, donde se conoce la madre. Para ello se cuenta con un huerto semillero de la Cooperativa de Mejoramiento y Universidad Austral, ubicado en San José de la Mariquina que dispone de 33 clones, provenientes de la cordillera de la X Región, con árboles en producción de semillas, de altura mediana (no mas de 5 m) y de igual tamaño, lejos de fuentes polinizantes de la misma especie, aislados de fuentes de contaminación como roble.

La siembra de las semillas se realizó de acuerdo a la metodología recomendada en el vivero. Las isoenzimas se realizaron de acuerdo a la metodología de Conkle (1982) y Carrasco (1998). Para los SSR, se probaron 25 primers heterólogos aislados en otras especies de la familia de las Fagaceae, según Steinkellner et al (1997a).

El análisis de paternidad por exclusión se realizó sólo con el marcador molecular, ya que para las isoenzimas se obtuvo un conjunto diferente de isoenzimas para hijos y padres. Se utilizaron los primers *ssrQrZAG 30 (GA)₂₆* y *MAQ 4*, que mostraron una variabilidad en conjunto de no mas de 3 alelos en 5 loci. Para el primero se utilizaron dos alelos en cuatro loci (A, B, C, D), y en cada uno un alelo nulo. Para el segundo se encontraron cuatro alelos. Se determinó que la probabilidad máxima de exclusión del marcador es de 0.98.

El análisis de exclusión dio por resultado que el clon 26 es el padre de aproximadamente 24% de la descendencia. Un 8% corresponde a los padres 4 y 31 en conjunto, 7% sería híbrido, 6% sería del clon 24 y 4% del clon 3 (plántulas múltiples por semilla). El 38% serían hijos a los cuales, sin poder realizar la exclusión completa, se llegó a obtener un grupo de varios posibles padres, estableciéndolos como indeterminados.

Se observaron plántulas con dos o tres raíces por semilla que eran hijos del padre 3, exceptuando tres hijos, que para ellos se llegó a determinar que existían 4 posibles padres (3, 26, 21, 33). Este fenómeno puede explicarse por una fertilización múltiple de un solo padre o una división extra del cigoto. Sólo para los hijos 3b, 4a y 4b está establecida, claramente, la fertilización múltiple.

Se observaron híbridos resultado de una fertilización raulí-roble, lo que constituye la contaminación por polen ajeno al huerto. Esto reforzaría la teoría de una dispersión de los granos de polen a largas distancias.

Se concluye que dentro del huerto existen ciertos clones que tienen tendencia a cruzarse y se confirma que la tendencia es a cruzarse con los clones que se encuentran más cercanos, de modo que gran parte de las semillas eran de un mismo padre. La nube de polen es homogénea; es decir, la fertilización es sólo de algunos pocos padres. No se pudo determinar si el modo de herencia del marcador genéticos utilizado es mendeliana. Se recomienda realizar polinizaciones dirigidas para asegurar el cruzamiento entre los clones.

SUMMARY

We assessed the uniformity and pollen clouds scattering of Southern beech (*Nothofagus alpina* Poepp et Endl (Oerst)) and how this may affect the genetic variability of their natural populations. To this end we used SSR (Simple Sequence Repeat) paternity analysis by sequential exclusion. We estimated the influence of these factors upon the gene flow of this species, excluding “seeds” flow. Considering that this species is: monoecious, anemophilous, cross fertilized, and presumably of auto-incompatible pollination, the most precise and direct way to determine inheritance and gene flow is the analysis of descent, knowing the genetic composition of the mother. Our set up included a seed orchard plot of Cooperativa de Mejoramiento and Universidad Austral, located in San Jose de la Mariquina; that has 33 clones from the Andes mountains of the X Region with seeds producing trees, small and isolated from pollen sources of the same species, isolated from contaminants, of medium height and equal size.

We followed the methods of seeds sowing used by the personnel in charge of the orchard. For isoenzymes preparation we followed Conkle (1982) and Carrasco (1998). For SSR we tested 25 heterologous primers isolated from other species of the Fagaceae according to Steinkellner et al (1997).

The paternity analysis by exclusion was made using only the molecular marker, because the isoenzymes tests revealed different set of enzymes for parents and offsprings. The primers used *ssrQrZAG 30*, *(GA)26* and *MAQ 4* did not show much variability. For the first we used two alleles in four loci (A,B,C,D) and for each one a null allele. For the second we found four alleles. We determined that the maximum probability of exclusion for the first primer was 0.98.

The exclusion analysis shows that clon 26 is the parent of % 24% of the offsprings. Parents 4 and 31 together amount to 8%, 7% are hybrids, 6% are of clon 24 and 4% of clon 3 (multiple plantlets per seed). The parenthood of 38% was not possible to determine (indeterminate).

We recorded plantlets with two or three roots per seed offsprings of parent 3, for three offsprings we were unable to establish their parents, for them there were four possibilities (3, 26, 21, 33). This may be the result of multiple fertilization of a single parent or an extra division of the zigote. Multiple fertilization was established without any doubt for offsprings 3b, 4a, and 4b.

We observed rauli-roble hybrids consequence of a contamination by alien pollen external to the orchard. This reinforced the hipotesis of long distance pollen grain dispersal. From the standpoint of genetic improvement this may give rise to better growth rates, three size, wood hardness and adaptation, etc.

We concluded that within this orchard there are some clones with a tendency to cross-fertilization. We confirmed the tendency to crossfertilization between short distance neighbor clones, such that most of the tested seeds were of the same parent. The pollen cloud is homogeneous, that is fertile parents were very few. We were not able to determine if the genetic markers used had mendelian inheritance.

We recommend to make directed polinization to ensure crossfertilization between clones.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

INGRID ADELA HEBEL CARREÑO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética, el examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de Mayo de 2002.

Director de Tesis:

Dr. Lafayette Eaton

Comisión de Evaluación de Tesis

Dr. Nelson Díaz

Dr. Ramiro Bustamante

INTRODUCCION

Antecedentes Generales de la Especie

En Chile, el género *Nothofagus* está representado por 10 especies, siendo la mayoría árboles de gran importancia en la fisonomía de la vegetación, ya que forman extensos bosques. En poblaciones naturales, se presenta mezclado con otros árboles nativos, y generalmente con la canopia a gran altura.

En general, la semilla en las Fagáceas, es de tamaño variado, pequeñas o grandes, ovoides, globosas, redondas, etc. desnudas, hilo basal, rodeadas de pericarpio indehiscente con la cubierta seminal coriácea o membranosa, delgada firmemente unida al embrión, de color castaño-rojizo, sin perispermo y endospermo nuclear ausente o reducido a una capa celular visible sólo con el microscopio. El embrión es recto, central, inverso, con reservas de almidón y aceite, provisto de dos cotiledones masivos, rectos, plano-convexos, etc. Radícula pequeña, superior, incluida entre los cotiledones (Niembro, 1989).

El Raulí (*Nothofagus alpina* Poepp et Endl (Oerst)), es anemófilo, de polinización cruzada, monoico y presumiblemente autoincompatible (Riveros *et al*, 1997).

Según Turesson (1922), citado por Donoso (1979), las características de una planta en diferentes habitats se debía simplemente a una respuesta directa de la planta como individuo al medioambiente, fenómeno que se conoce como plasticidad. Pero luego se demostró que cuando la variación no se debe simplemente a una respuesta plástica al medio, se puede atribuir a la selección natural que actúa sobre la variabilidad natural de las poblaciones, seleccionando a los

genotipos mejor adaptados al medio local.

Flujo Génico y Análisis de Paternidad

La distribución de la variación genética entre poblaciones puede ser usada para estimar la cantidad de flujo génico entre poblaciones, a partir de las frecuencias alélicas.

El flujo génico tiene influencia sobre la magnitud de la diferenciación entre las poblaciones y el tamaño de la vecindad dentro de ellas. El polen dispersado por el viento tiene el potencial de moverse docenas o cientos de kilómetros, pero hasta ahora no se conoce qué tan exitoso puede ser la dispersión a largas distancias. Sin embargo, para estudios de poblaciones, la verdadera interrogante sería cuál es la distribución de las distancias efectivas de la dispersión del polen y qué grado de éxito del cruzamiento con los diferentes padres está influenciado por la distancia (Mitton, 1992).

Según Adams (1992), en estudios realizados en pino, la proporción de los hijos fertilizados por los árboles marcados disminuía rápidamente con la distancia.

Para Raulí, al igual que en otras poblaciones naturales de árboles con polinización abierta, se ha encontrado una deficiencia de heterocigotos, con lo cual, según Brown (1979), se puede establecer una alta consanguinidad como producto de una dispersión limitada de semillas y polen. Wright (1943), señala que un aislamiento por distancia restringido al tamaño de la vecindad, puede ser la causa de una estructura familiar dentro de las poblaciones, en la que los vecinos tienden a ser parientes. Sin embargo, esta estructura espacial es débil cuando se estudia en poblaciones naturales, ya que es posible encontrar vecinos emparentados mezclados con vecinos no emparentados (Eaton *et al*, 2000).

Según Devlin y Ellstrand (1990), el flujo genético tiene dos líneas de evidencia que cambian la noción de que éste es limitado. Una de ellas corresponde a estudios utilizando el análisis de paternidad por exclusión que revela frecuentemente que una significativa porción de la población de semillas de cultivo han sido creados en poblaciones fuera de ellas (flujo génico por polen). El aporte de una serie de métodos ha permitido identificar patrones poblacionales cuando se tiene la ventaja de conocer la identidad de la madre. Técnicas de exclusión simple (Ellstrand, 1984; Hamrick y Schnabel, 1985) comparan los genotipos multilocus de la progenie con el de su madre, substrayendo la contribución de ésta, comparando la contribución gamética paterna deducida de todos los posibles genotipos de los padres. El **análisis de paternidad por exclusión** tiene la ventaja que es una medida directa del intercambio de gametos dentro de poblaciones. Este procedimiento identifica plantas dentro de la población como los posibles o imposibles padres de una progenie en particular, basado en los genotipos, del padre, la madre y del descendiente.

Smith y Adams (1983), han desarrollado un método para la estimación de flujo génico en gimnospermas. Por otro lado, Devlin y Ellstrand (1990), desarrollaron y aplicaron un método refinado para estimar el flujo génico desde un análisis de paternidad en angiospermas.

Según Ritland y El-Kassaby (1986), diferentes factores pueden incidir sobre la dispersión del polen, por ejemplo, la lluvia puede dilatar el desarrollo reproductivo y reducir la contaminación de polen ajeno; el aislamiento limita el flujo de polen entre la misma especie o desde otra; cierto arreglo espacial puede limitar los cruzamientos consanguíneos o favorecerlos. Así, la habilidad de esos factores para controlar el patrón de relaciones genéticas entre vecinos, puede ser estimado por métodos directos e indirectos. Los métodos indirectos incluyen trampas de polen para medir la contaminación del polen y el movimiento de éste, monitoreo de la fenología reproductiva y el examen de la proporción de semillas abortadas o vacías. Biólogos

forestales han usado tinciones químicas o polen marcado radioactivamente para estimar el flujo génico. Además, los métodos clásicos para la estimación de la diversidad genética o el parentesco entre grupos de plantas están relacionadas con las características morfológicas. Sin embargo, esos caracteres pueden ser influenciados por factores ambientales, por lo que se necesitarían métodos directos.

Los métodos directos utilizan marcadores genéticos mendelianos, como isoenzimas y/o marcadores moleculares, aplicando el análisis de paternidad. Ellos, evitan algunas complicaciones de los efectos ambientales cuando actúan sobre los caracteres, al mirar directamente la variación controlada por genes, o por mirar el material genético por sí mismo. Los marcadores moleculares representan un método potencial y rápido para caracterizar la diversidad de los genes *in situ* y *ex situ*. Además, son muy útiles en la construcción de mapas genéticos y para la búsqueda y selección de germoplasma en los programas de mejoramiento (Ford-Lloyd y Painting, 1999).

En muchas especies vegetales, las aloenzimas son particularmente ventajosas, ya que poseen un alto grado de polimorfismo. Se ha visto, que en el estudio de los patrones de variabilidad aloenzimática en Raulí el porcentaje de loci polimórficos ha sido muy alto (80-100%) (Carrasco, 1998). No obstante, la variación enzimática que se puede obtener no sería suficiente para determinar el padre de todas las semillas, puesto que en la mayoría de las enzimas se encuentra un alelo en alta frecuencia. Por lo tanto, para otorgar a esta investigación un mayor poder discriminatorio, es indispensable el uso de marcadores genéticos basados en DNA como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) y/o Microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeat). Dado que los marcadores RAPD operan como dominantes no es posible diferenciar entre homocigotos y heterocigotos, porque co-migran, y no permite separar el DNA cualitativamente (de acuerdo a la secuencia de bases). Por lo anterior, esta investigación se basó

fundamentalmente en SSR, que usualmente define un locus simple multialélico y en el que se puede distinguir codominancia; es decir, homocigosis y heterocigosis. Esto ayudaría en la interpretación de la descendencia, dado que la especie en estudio es anemófila y autoincompatible y es capaz de formar semillas viables (y heterocigotas) con Roble (*N. obliqua*) (Donoso et al, 1990).

Según Adams (1992), existen tres aproximaciones para medir la dispersión de genes con marcadores genéticos:

1. Aproximación con un marcador de alelos raros (unilocus).
2. Marcadores multilocus.
3. Modelo de aproximación

El primero es muy efectivo, aunque es limitado en la aplicación por la necesidad de individuos con un único marcador. Si más de un árbol con el marcador está presente en la población, la interpretación puede resultar confusa. Además, si sólo uno o algunos pocos individuos llevan estos marcadores raros, la generalización de los patrones de dispersión no sería posible.

El segundo es inferido por la comparación de genotipos multilocus en los hijos en aquellos potenciales padres. Así, todos los padres potenciales deben ser conocidos y la población debe ser aislada y pequeña para que este método sea eficiente. La efectividad del análisis de paternidad dependerá de la probabilidad de excluir los padres potenciales sobre la base de una incompatibilidad genética. La probabilidad de exclusión aumenta con el número de alelos, con la frecuencia de ellos y el número de loci polimórficos usados en el análisis.

Ya que esta especie es anemófila, de polinización cruzada, monoico y presumiblemente autoincompatible, la forma más directa y precisa para determinar la herencia y el movimiento de los genes es a través del análisis de la descendencia, donde se conoce la

madre. La existencia de un huerto semillero en la X Región, que consta sólo de 33 clones, permitiría conocer el padre de la mayoría de los hijos examinados mediante el análisis de paternidad por exclusión, además de la presencia de híbridos por contaminación de polen extraño al huerto, por lo tanto se determinará el flujo génico asemejando condiciones de poblaciones naturales, excluyendo el flujo debido al movimiento de semillas como agente de variabilidad en la población.

Además, la producción de semillas, ofrece la comprobación de la herencia de los marcadores genéticos a través de la segregación que se puede observar en los hijos. También, aporta conocimiento sobre la dispersión del polen en esta especie y cómo ello afectaría la variabilidad genética que se encuentra en poblaciones naturales, pudiendo conocer la formación de subpoblaciones dentro del huerto por el único agente variable: el polen.

El establecimiento de este huerto semillero clonal de árboles de crecimiento superior de raulí, por parte de la Cooperativa de Mejoramiento y la Universidad Austral, ofrece el material necesario para este tipo de investigaciones, en el cual se cuenta con árboles en producción de semillas, de pequeño tamaño, lejos de fuentes polinizantes de la misma especie, relativamente aislados de fuentes de contaminación como roble, de altura mediana y de igual tamaño. Además, presenta la ventaja de que son púas extraídas de la zona (X Región) y no introducidas, por lo que son representativas de poblaciones naturales cercanas.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la dispersión y la uniformidad de la nube de polen en un huerto semillero de Raulí, con el análisis de paternidad por exclusión secuencial, utilizando marcadores isoenzimáticos y SSR, para estimar la influencia de este agente en el flujo génico en esta especie.

Objetivos específicos

- Determinar el modo de herencia de los marcadores genéticos utilizados.
- Estimar el movimiento de los genes o polen en el huerto.
- Evaluar la distribución espacial de la polinización en el huerto.
- Determinar el modo de polinización observada en el huerto.
- Determinar la existencia de contaminación por polen ajeno al huerto.

Hipótesis de trabajo.

Ho: Si la dispersión de los granos de polen es ilimitada, entonces se puede esperar que los hijos de un árbol sean, principalmente, medios hermanos, habría panmixia (Fig.1).

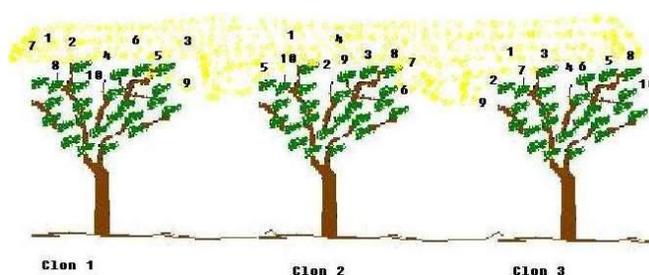


Fig. 1. Homogeneidad de la nube de polen (panmixia).

H₁: Si la dispersión de los granos de polen es limitada, entonces se puede esperar que los hijos de un árbol sean principalmente hermanos (Fig. 2).

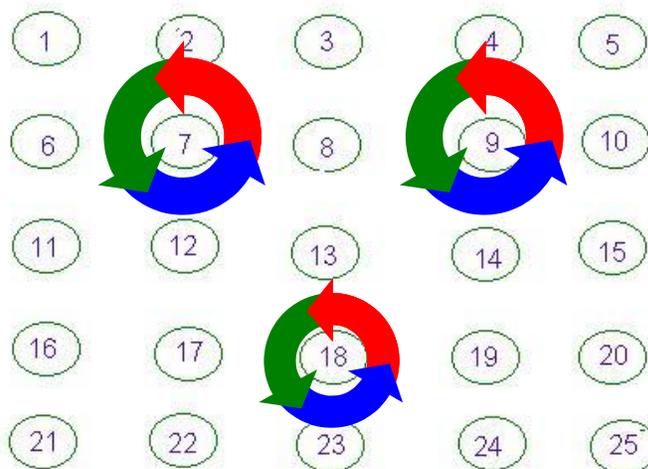


Fig. 2. Diagrama espacial de la nube de polen de los clones en el huerto semillero con mayor tendencia a cruzarse entre vecinos.

Por otra parte, la distribución espacial de los árboles polinizadores en el huerto puede hacer que algunos clones tengan mayor tendencia a cruzarse entre sí, aunque normalmente son diseñados para minimizar esta posibilidad.

En términos teóricos, al encontrarse todos los posibles padres dentro del huerto, el patrón de movimiento de polen se debiera esperar que fuera panmictico, otorgando este estudio otro antecedente sobre los ya desarrollados en este aspecto.

En términos prácticos, este estudio puede otorgar un avance en la evaluación del funcionamiento del huerto semillero, en cuanto al patrón de polinización efectiva y a la certificación de los hijos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del huerto y sus características

El huerto semillero clonal de la Cooperativa de Mejoramiento, CONAF y Universidad Austral de Chile está ubicado en San José de la Mariquina, X Región ($39^{\circ} 32' 58''$ S y $73^{\circ} 04' 04''$ W), cuyo plano se detalla en el ANEXO 1. Abarca una superficie de 3 hectáreas, subdividido en 56 bloques, donde los clones son distribuidos espacialmente de diferente manera. No en todos los bloques se encuentran todos los clones. La exposición del huerto es norte-sur, sobre una superficie plana, con los árboles plantados a 5 x 5 m cada uno (Fig. 3).



Fig. 3. Huerto semillero Cooperativa de Mejoramiento, CONAF y U.Austral.

Este huerto fue originado por injertos cuyas púas provienen de 3 localidades

precordilleranas de la X Región. Pineda (1998), hace una revisión del sector, latitud, longitud, exposición, año de recolección de algunas de las púas que se encuentran desde esa época, evaluando la variabilidad genética isoenzimática que posee esta pseudopoblación convertida en un huerto.

El tamaño de los árboles no es superior a los 5 m.

Obtención del material vegetal de los padres e hijos

Progenitores

Las hojas de los progenitores fueron recolectadas en el huerto el 7 de octubre del año 2000. El material recolectado fue de todos los clones, incluso de aquellos que aparentemente no habían florecido. Se evaluó el estado fenológico de los clones. En el ANEXO 2, se resumen todos los progenitores respecto a la formación de semillas en la temporada, a la extracción de material de hijos establecidos de años anteriores, padres nuevos (recientemente injertados) y estado fenológico.

Para isoenzimas, se extrajeron 5 hojas de los 33 clones y se almacenaron en criotubos que se colocaron en nitrógeno líquido para su conservación hasta el traslado al laboratorio. Para la extracción de DNA se extrajeron 5 hojas mas y se almacenaron en tubos Eppendorf y se mantuvieron en frío hasta su llegada al laboratorio.

Descendientes

Las semillas fueron enviadas al laboratorio por parte de la Cooperativa, una vez que se

clasificaran por clon, con la gentil colaboración del Dr. Roberto Ipinza C y Verónica Emhardt.

Estas llegaron en Agosto de 2000 a Santiago, tenían un promedio de 3 gr, y se pusieron a germinar hasta que alcanzaran un crecimiento adecuado para su procesamiento (5-7 hojas verdaderas). Para la obtención del material vegetal de los descendientes se debió recurrir al protocolo de viverización para su germinación recomendado por la Ing. For. Verónica Emhardt, el cuál es utilizado en el vivero de Forestal y Agrícola Monteáguila S.A donde las semillas reciben un tratamiento con ácido giberélico (ANEXO 3).

La siembra consideró la separación de las semillas por flotación en cuatro categorías: trialadas hundidas, trialadas flotan, bialadas hundidas y bialadas flotan, dado que el fruto de Raulí está compuesto por dos semillas trialadas que encierran una bialada.

La viverización se efectuó en un invernadero frío, donde se almacenaron los contenedores sembrados. Cuando la temperatura comenzó a ascender en primavera, éste se cubrió con malla raschel, asemejando las condiciones que se presentan normalmente en el bosque (Fig. 4).



Fig. 4. Invernadero frío cubierto con malla raschel.

Ya que el procedimiento recomendado era semejante a los utilizados en hidroponía, se

consideró que la siembra podía realizarse en Growers (de Flora Center), los cuales corresponden a cubos de esponja estériles que mantienen la humedad por largo tiempo (Fig. 5 (a y b) y Fig. 6).

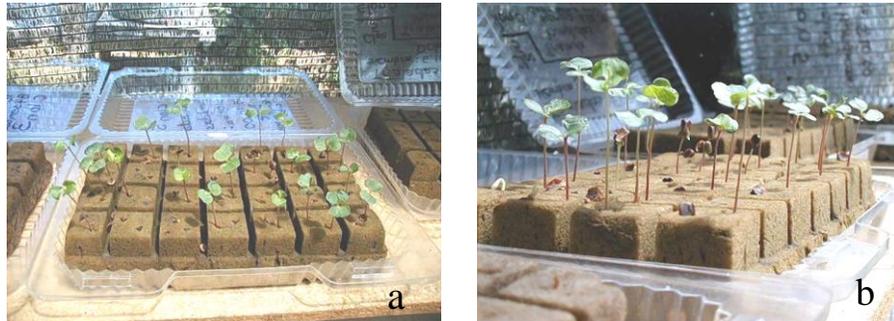


Fig. 5. Siembra en Growers (de Flora Center).



Fig. 6. Siembra en Growers (de Flora Center).

A pesar de considerar un sustrato inerte hubo un bajo éxito en el establecimiento de las plántulas, por la presencia de plagas (gusanos cortadores) y enfermedades (caída de plantas del grupo de hongos *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Phytium*, etc. y verticilosis con *Verticillium* sp. los que mermaron el correcto desarrollo tanto de las plantas como de esta investigación.

Material vegetal anexo

Ya que se tuvo problemas en el establecimiento de las plántulas de los 16 clones que habían producido semillas, se consideró oportuno la extracción de DNA de 366 semillas que no

habían germinado pero que aún contenían embriones (Tabla 1).

El resto de los clones (17) no presentaron semillas, los cuales se pueden resumir en:

- 8 de ellos, son clones o padres nuevos, de los cuales seis no florecieron, sólo el clon 39 y 43 lo hicieron.
- De los 9 restantes, cuatro clones (2, 26, 19 y 32) habían producido semillas viables en años anteriores las cuales se sembraron hace más de 1 año por parte de la Cooperativa. De este modo, para aumentar los resultados de paternidad en aquellos clones que no produjeron semillas en la temporada de estudio, se recolectaron 30 muestras de hojas de los hijos de esos clones, con la diferencia que el material se tuvo que compartir entre isoenzimas y luego DNA. Por esto, el material fue en primer término sometido a una extracción de proteínas y luego se continuó con el procedimiento normal de extracción de DNA.

De lo anterior, se obtuvo la Tabla 1, en la cual se especifican los clones que dieron semillas la temporada de estudio, el número total de semillas en 3 gr., semillas germinadas, semillas de las cuales se obtuvo DNA y aquellas atrofiadas; es decir, que no poseían embrión y la semilla correspondía sólo al pericarpio, las cuales se dividen en trialadas y bialadas.

Tabla 1. Número de hijos con extracción de DNA de los embriones contenidos en las semillas por clon.

Clon	Semillas en 3 gr.	Semillas germinadas	Semillas DNA extraído	Trialadas atrofiadas	Bialadas atrofiadas
3	371	12	68	184	107
4	301	0	42	167	92
5	357	56	8	194	99
6	342	41	30	158	113
7*	266	2	5	171	88
8	299	7	10	157	125
22	398	104	2	163	129
23	515	4	38	352	121
28	389	55	18	225	91
30	386	6	17	235	128
31	294	52	49	116	77
34	257	42	1	153	61
36	326	6	50	195	75
36-1	391	22	11	183	175
37	346	17	12	249	68
38	337	51	5	201	80
Total	5575	477	366	3103	1629

*: Para el clon 7, sólo se recolectan 2,15 gr.

Por lo tanto, existe un total de 366 semillas que se le han extraído el DNA, más los cuatro clones que habían producido semillas viables años antes, más las seis semillas que habían emitido dos o tres plántulas del clon 31 y 10 hijos que se pudieron salvar de la germinación en los Growers, por lo que en total se tienen cerca de 500 extracciones de DNA, las cuales por cierto no amplifican en su totalidad, a veces ésta es débil, pero también pueden tener poca importancia estadística.

Caracterización isoenzimática

Se realizaron los siguientes pasos consecutivos en la caracterización isoenzimática de los progenitores: Extracción enzimática, preparación de geles, carga de muestras, corrida de la electroforesis y tinción de las enzimas, siguiendo la metodología desarrollada por Conkle et al (1982), en el desarrollo de la electroforesis en almidón, con algunas modificaciones aportado

por el trabajo de Carrasco (1998), y se ensayaron algunos sistemas adicionales para aumentar el número de loci variables. Se tomaron fotografías de los geles.

Caracterización de SSR

Para el estudio de microsatélites se realizaron los siguientes pasos consecutivos: Extracción de DNA genómico, PCR, electroforesis en geles de poliacrilamida (10%) y tinción con plata (1%).

Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó de acuerdo a técnicas estándares, lo que no dió muy buen resultado, porque el tejido vegetal extraído de los padres era viejo, por lo que se tuvo que recurrir a kits de extracción de DNA (Dneasy Plant Kit, marca QIAGEN, Hilden, Alemania), con lo cual se aseguró la extracción de los padres. Para la extracción de DNA de hojas de los hijos, se ocupó el procedimiento normal con una limpieza posterior de cloruro de litio, ya que éstas eran más nuevas y no presentaban tanta resina. Respecto a lo anterior, estudios argentinos que han trabajado en la misma especie señalan que la extracción de DNA es difícil, por la cantidad de polisacáridos de los embriones y la de resina en hojas (Marchelli *et al*, 1998).

Dado el poco éxito del establecimiento de las semillas germinadas y a la difícil extracción de DNA de las hojas por las razones anteriormente señaladas, se procedió a la extracción de DNA de semillas con el protocolo modificado de Chee et al (ANEXO 4). Se abrieron todas las semillas no germinadas y cuando aparecía el embrión se procedió a ponerlo

en tubos Eppendorf, y se continuó con la maceración de la muestra y el protocolo de extracción. La obtención de DNA de este material hace que la amplificación sea más limpia, ya que no se encuentran en muy alta cantidad inhibidores de la reacción de amplificación.

Condiciones de PCR

Se probaron 25 primers heterólogos aislados en otras especies de la familia de las Fagaceae, según Steinkellner et al (1997a), de los cuales 8-10 amplificaban con mucho bandeo con las condiciones para PCR recomendadas por Isagi y Suhandono (1997) y de Steinkellner et al (1997b), con posteriores modificaciones de acuerdo a los resultados. Se trabajó cambiando las cantidades de cada reactivo en la solución de reacción y en las condiciones de la reacción en cuanto a la temperatura requerida por cada primer, además del tiempo de extensión. El resultado variaba aún más cuando el material había sido extraído de semilla o de hoja.

En la Fig. 7, se muestra lo obtenido con una amplificación con 52°C de “annealing” y 72°C por un minuto de extensión, lo que resultaba en un bandeo poco específico que, generalmente, se pueden observar en primers dinucleótidos que revelan bandas poco específicas¹.

¹ Comunicación personal. Sra. Ketty Bacallao, Bioqco. Universidad de la Habana



Fig. 7. Gel de poliacrilamida con condiciones de 52 °C para annealing y 72° por 1 minuto de extensión, primer 30. Carril de izquierda a derecha 1 (madre), 2 al 9 hijos, 10 al 17 posibles padres.

Se probó, además, un “touch down” desde 60°C a 53°C, con cinco ciclos adicionales de 53°C de “annealing”, para corregir aún más las condiciones de PCR, sin embargo, se llegó a la conclusión que se tenían más problemas ya que amplificaban los padres, pero no los hijos o viceversa. Por último, se decidió aumentar excesivamente la temperatura (63°C), para hacer más específica la reacción.

Se desarrollaron amplificaciones de todos los primers con algunos padres, para observar la característica multialélica de los microsatélites y ver la variabilidad en ellos. Sólo algunos primers de los 25 mostraron algún grado de variabilidad, sin embargo, ésta siempre se vio reflejada en los mismos padres, principalmente en aquellos clones nuevos que no habían florecido. Tampoco se llegó a observar la característica de multiallelismo esperada, contrariamente, sólo se lograron obtener segmentos desde los 400 a 100 pares de bases,

aproximadamente que se repetían entre algunos de los padres.

Finalmente, se decidió estandarizar la amplificación para un volumen de 20 μ l, que incluía 0.5 μ l de cada primer, 2.5 μ l de Buffer, 1.0 μ l de $MgCl_2$, 0.25 μ l de dNTPs, 0.3 μ l BSA, 0.5 μ l Taq polimerasa y 10.45 μ l de agua. La amplificación procedió en 32 ciclos de 92°C por 1 min., 59°C por un min. y 72°C por 1 min. Se utilizaron los primers 30 y MAQ4, que presentaban más bandas y se hizo el análisis usando las bandas como marcadores y no como “microsatélites”.

Electroforesis en geles de poliacrilamida denaturante (10%) y tinción con plata (1%).

Para realizar la electroforesis, se utilizaron 8 μ l de amplificado mezclado con 8 μ l de buffer de carga (95% formamida, 10 mM NaOH, 0.05% bromofenol, 0.05% xylene cyanol) y se sometió a baño maría a 95°C por 10 minutos.

La electroforesis de geles de poliacrilamida denaturante (10%) y tinción con plata se realizaron según la metodología de Sambrook *et al* (1989) indicada en el ANEXO 5.

Probabilidad de exclusión

Según Weir (1996), es muy útil la caracterización de un marcador genético por su habilidad de excluir los posibles padres. Tal probabilidad de exclusión depende de las frecuencias alélicas para tal locus, pero no depende de los genotipos en algún caso en particular. Para un locus autosómico con alelos codominantes, los clones que se pueden excluir como

posibles padres para todas las combinaciones de madre-hijo se puede indicar como la probabilidad máxima de exclusión (Q_{\max}), dados una cierta cantidad de alelos (V), esto es;

$$Q_{\max} = 1 - (2V^3 + V^2 - 5V + 3) / V^4$$

La utilidad del locus se incrementa con el número de alelos, aunque aún con 10 alelos el valor de Q_{\max} es de sólo 0.79.

La probabilidad de exclusión se puede incrementar con el uso de varios loci. Si Q_1 , es la probabilidad de exclusión máxima en el locus 1, entonces Q (probabilidad de exclusión para varios loci) es uno menos la probabilidad que ninguno de los loci permita la exclusión.

$$Q = 1 - \prod (1 - Q_i)$$

Así, para dos loci, cada uno con 10 alelos igualmente frecuentes el valor de Q se incrementa a 0.96. En la práctica, para la exclusión es requerido al menos dos loci para disminuir la posibilidad de una mutación falsa indicando la exclusión en un locus.

Análisis estadístico

La determinación de los padres no requiere análisis estadístico y se llevó a cabo a través de un análisis de paternidad por exclusión secuencial; es decir, se utilizó inicialmente el primer mas polimórfico (30), agrupando aquellos hijos de una misma madre que tenían el mismo genotipo y se procedió a amplificarlos con otro primer (MAQ4) para continuar la exclusión.

Si el resultado no fuese obvio, se utilizaría X^2 (chi-cuadrado), prueba de G o bondad de ajuste, para conocer si la segregación de los marcadores corresponde a una herencia mendeliana,

y para saber si el polen recibido por las madres es heterogéneo. Además, si se considera que los granos de polen de todos los clones tienen la misma probabilidad de fertilizar (panmixia) y se considera que el polen que llega a un árbol madre es al azar, el número de hijos de un mismo padre, entre las semillas de esta madre, seguirá una distribución de Poisson, si no la presentan, el cruzamiento no será al azar y, por lo tanto, el cruzamiento entre los individuos se representará por muchos hijos de pocos padres.

RESULTADOS

Siembra

Las semillas fueron pesadas y luego del tratamiento con ácido giberélico separadas en trialadas hundidas, trialadas flotan, bialadas hundidas y bialadas flotan. Existía una gran diferencia en cuanto al tamaño de semillas, y color en cada clon y entre ellos (Fig. 8). Se pensó que si la semilla era más pesada tendería a poseer un embrión o cotiledones más grandes, lo que le daría una probabilidad mayor de germinación y emergencia. Por el contrario, en algunos clones se observó que la testa era más dura, lo que haría que a pesar de que la semilla fuera grande, no sufriría el proceso de imbibición.



Fig. 8 . Variabilidad en el tamaño de las semillas (Clon 36)

Así, un análisis de correlación comprobó que no existe relación entre las variables cantidad de semillas en los 3 gr y el porcentaje de germinación ($r=0.055$, $N=16$, $p=0.81$) (Fig.

9).

Es decir, el porcentaje de germinación está dado por otros factores propios de la semilla, como su viabilidad, imbibición, características propias del clon, dureza de la testa, etc. y no por su tamaño.

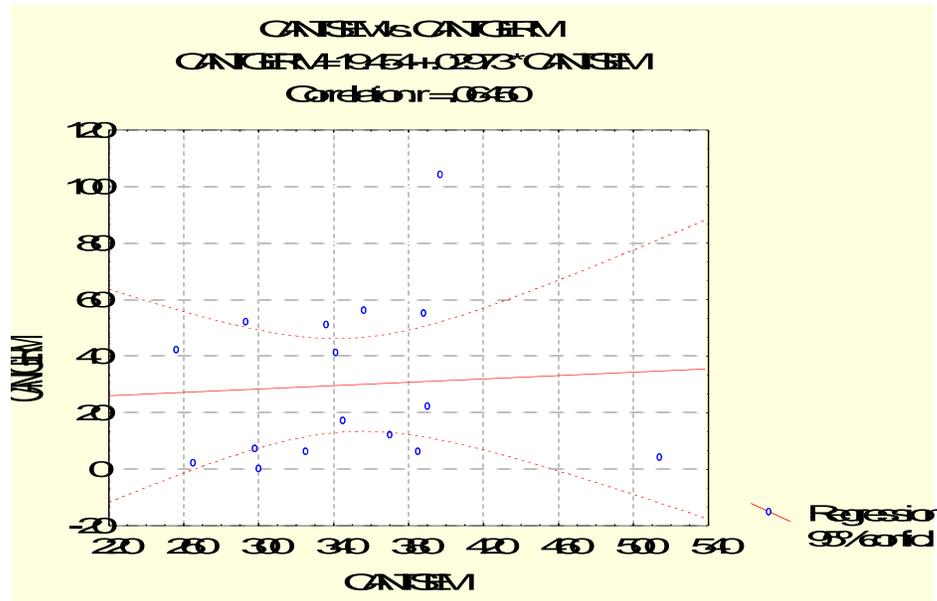


Fig. 9. Correlación entre cantidad de semillas en tres gramos y porcentaje de germinación.

Germinación

Se sabe que las semillas luego del tratamiento con Acido Giberélico pueden hundirse o flotar, dando un mayor grado de precisión para aquellas semillas que son realmente viables, lo que se pudo comprobar en el porcentaje de germinación de las semillas que flotaban, en que en muy pocos casos germinaron.

Por otro lado, existen clones que tienen un alto porcentaje de germinación, y otros que tienen un porcentaje muy bajo. Así, en aquellos clones con bajo porcentaje de germinación, al abrir las semillas no germinadas, en la mayoría de los casos no se le encontraban embriones,

pero en otros se les encontró embrión y se pudo extraer el DNA (Tabla 1 y ANEXO 6). Del ANEXO 6 se obtiene que el porcentaje de germinación general es de 8,63%.

Análisis de las semillas atrofiadas

Se identificaron gran cantidad de semillas atrofiadas. Si se sabe que de cada fruto se obtienen dos semillas trialadas y una bialada, se puede conocer si existe alguna tendencia de que alguno de estos dos tipos de semillas produzca mayor o menor cantidad de semillas atrofiadas; es decir, que no posean embrión. Al realizar un análisis de chi-cuadrado, se vio que la diferencia obtenida no es significativa, por lo que esta tendencia no existiría (Chi-Square = 2.539315 df = 1 p < 0.111053).

Plantas gemelas o mellizas

Dadas las características especiales que parece tener el clon 31 (alto % de germinación, pocas semillas atrofiadas y semillas de mayor peso), se determinó por exclusión que las plántulas eran hijos del padre 3, exceptuando los hijos denominados 3a y 3c (trillizos) y 4a (mellizo), que para ellos se llegó a determinar que existían 4 posibles padres (3, 26, 21, 33). Las plántulas cuyo padre está determinado como el clon 3 puede explicarse por un fenómeno de una fertilización múltiple de un solo padre o una división extra que hizo aparecer semillas con dos (6 plantas) o tres (1 planta) raíces en una misma semilla (Fig. 10). En aquellos casos en que el padre no está bien determinado, éste pudiera ser el mismo clon 3, lo que por probabilidad se podría explicar con la llegada de otro grano de polen del mismo clon con otra constitución genética que hizo que el genotipo de las plántulas fuese diferente. Sólo para los hijos 3b, 4a y

4b, está establecida, claramente, la fertilización múltiple.



Fig. 10. Semillas del clon 31 con más de una raíz. (a) Semilla con dos raíces, (b) Semilla con tres raíces.

Híbridos o polinización con polen extraño al huerto

De los cuatro clones (2, 26, 19 y 32) que habían producido semillas viables en años anteriores sembradas hace más de 1 año por parte de la Cooperativa en Valdivia, dos hijos del clon 2, parecieron híbridos por las características fenotípicas observadas (Fig. 11), ya que las hojas tenían menos venas laterales (entre 6-8), como si fueran hojas de roble. Wardle (1984),

citado por Gallo (1997), menciona a las hojas como la característica principal de diagnóstico para reconocer un individuo híbrido en especies de *Nothofagus* y enfatiza la incidencia y forma de los dientes en el margen de la hoja como una característica de especial importancia.

Al realizar las amplificaciones con el primer 30, se encontró que sólo existían bandas en la posición del alelo D, que se repitió en otros padres, por lo que se extrapoló esta característica a los hijos de otros padres que mostraron la misma amplificación. Se desconoce cuál es el efecto en la amplificación de esta hibridación, dado que no se encuentran las bandas que debieran ser otorgadas por la madre (Fig. 12).



Fig. 11. Planta híbrida (Hijo 2.21).



Fig. 12. Gel poliacrilamida de hijos del clon 2. Híbrido 2-21.

Caracterización isoenzimática

Respecto a esta etapa de la investigación, no se obtuvieron los resultados esperados, ya que se obtuvieron 5-6 isoenzimas para los padres, pero 5-6 isoenzimas diferentes para los hijos,

lo que impide utilizar los resultados en el análisis de paternidad.

Análisis de paternidad secuencial con marcadores SSR

Variabilidad del marcador

Ninguno de los 25 primers probados mostró la característica de multialelismo esperado y fueron muy poco variables. Esto concuerda en parte con lo desarrollado por Pineda (1998), quien señaló que la zona 1 (clones 2, 3, 17, 19, 40, 41, 43), lo conforman un subgrupo independiente del resto de las poblaciones de altura ubicadas en la precordillera andina de la IX Región, cuya asociación se pudo observar, también en las amplificaciones. Sin embargo, la variabilidad observada en esta investigación solamente está ligada a los clones “nuevos” (clones 39, 40, 41, 43, 46, 53, 54, 58) y desarrollada principalmente con otros primers.

Además, Pineda (1998), señala que la variabilidad isoenzimática dentro de estos grupos es cercana al 90%, dado que $F_{(st)}$ presenta un valor cercano a 0,1, aunque muy consanguínea, lo que no pudo ser apreciado por este marcador.

Probabilidad de exclusión

Es posible indicar la probabilidad máxima de exclusión (Q_{max}), dados una cierta cantidad de alelos (V), esto es;

$Q_{max} = 1 - (2V^3 + V^2 - 5V + 3) / V^4$, si tenemos 3 alelos para el primer 30, entonces:

$$Q_{max} = 1 - (2 \cdot 3^2 + 3^2 - 5 \cdot 3 + 3) / 3^4 = 0.63$$

Dado que se tienen cuatro loci, entonces:

$$Q = 1 - \prod (1 - Q_i) = 1 - (1 - 0.63)^4 = 0.98$$

Análisis de paternidad por exclusión secuencial

Lo primero que se realizó fue la eliminación de aquellos padres que no habían florecido (40, 41, 46, 53, 54, 58), luego, se realizó la exclusión con dos primers (ssrQrZAG 30 (GA)₂₆ y MAQ 4), los cuales mostraban la mayor cantidad de bandas. Así, se establecieron 3 alelos para el primero en cuatro loci (teniendo cada locus un alelo nulo) y 2 para el segundo. En la figura 13, se observan los alelos A, B, C y D para algunos clones. Se establecieron los genotipos de todos los padres e hijos, los que se encuentran en el ANEXO 7. En el ANEXO 8 se encuentra el resumen de padres por hijos para el primer 30 y en el ANEXO 9 se muestran los genotipos de los hijos y los posibles padres para el primer MAQ 4.

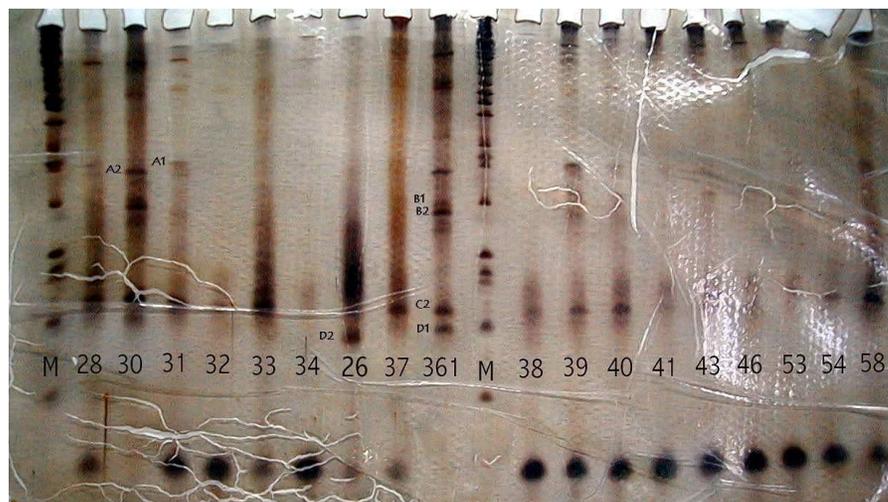


Fig. 13. Alelos utilizados para el análisis de paternidad amplificados por el primer 30. M (marcador 50 bp)

Respecto a los alelos nulos, según Dow y Ashley (1996), éstos serían aquellos en los cuales no se ve un producto visible, y que fueron detectados en *Quercus macrocarpa* con los primers MSQ3 y MSQ4. En esta investigación se distinguieron alelos nulos, principalmente, por las segregaciones de los hijos de los clones 2, 23 y 31 con el primer 30 (Fig. 14 a y b).

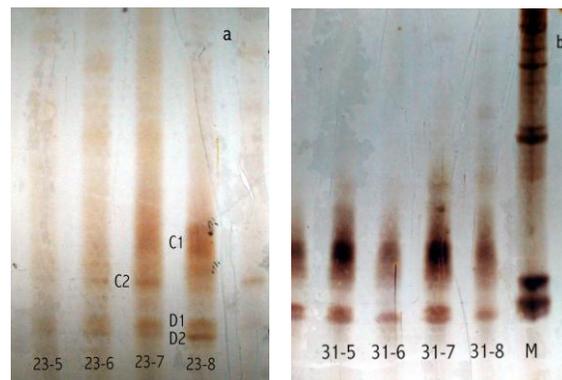


Fig. 14. Hijos de los clones 23 y 31. (a) Hijos que tienen una segregación C1C2 y D1D2 (23-7; 23-8). (b) Hijos que tienen una segregación C1C0 (31-6) y D1D2 (31-7).

Aunque se quiso establecer si la segregación de este marcador es mendeliana, esto no se pudo evaluar ya que se tienen muy pocos hijos para determinados genotipos, lo que hace que la prueba no tenga valor estadístico.

Luego de terminar el análisis de ambos primers, se llegó a la tabla 2.

Tabla 2. Exclusión basado en el análisis de los primers 30 y MAQ4.

Madre	Nro. de hijos	Padres
2	5	22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17
	1	4, 28, 3, 24
	1	4, 31, 17, 26, 22, 23, 30, 361, 39, 5, 6, 8
	1	4, 31
	5	4, 31, 22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17
	1	19, 3, 24, 5, 6, 8, 17
	1	36, 4, 28, 31, 3, 24, 5, 6, 8, 1
	2	hibrido
3	17	4, 31
	4	31
	4	31, 26, 22, 30, 361, 5, 6, 8, 17
	2	26
4	23	26
	8	3, 23, 30
	1	23, 30
	3	24, 26
6	4	4, 28, 21
	2	24, 26
	11	26
19	17	4,28,31, 36,37,21,33,19,11,3,26,24,39,5,6,8,17
23	11	26
	12	28, 21, 33
28	9	21, 3, 26, 5, 6, 8, 17
	1	37, 11
	5	11, 3, 22, 23, 30, 361
	2	11, 22, 23, 30, 361
30	11	2, 38
	1	4, 28
31	14	24
	8	HIBRIDO
	9	3
	3	21, 33, 3, 26
36	4	2, 34, 38, 43, 4, 28, 26, 24
	7	26
	6	HIBRIDO
	2	4, 26
	1	21, 33, 19, 3, 26, 24
	1	7, 2, 34, 38, 43, 32, 36, 4, 28, 31, 26,24, 39, 5, 6, 8, 17
	4	24, 26

De ella se desprende; por ejemplo, que si tomamos el clon 3 como la madre, el clon 4 y 31 podrían ser padres de 17 hijos, cuatro tendrían como padre al clon 31, otros cuatro tendrían varios padres que no fueron posibles distinguir entre ellos, y dos serían hijos del clon 26.

Además, se destaca que en un 92% de los casos se pudo eliminar a la madre como polinizante, por lo que la característica de autoincompatibilidad sugerida por algunos autores (Riveros *et al*, 1997) se refuerza.

La tabla 2 se puede resumir en (Tabla 3):

Tabla 3. Resumen del número de hijos respecto a los aciertos de padres.

Item	Nro. de Hijos
Hijos con acierto de único padre	81
Hijos con aciertos de dos padres	43
Hijos con aciertos múltiples	84
Hijos con aciertos de padres no pertenecientes al huerto	16
Total de aciertos	224

Un flujo génico críptico; es decir, desde afuera del huerto, no sería posible, dado que no se encuentran poblaciones naturales de Raulí tan cercanas al huerto.

Comparando la probabilidad de exclusión máxima (0,98) en que los alelos deben estar en igual frecuencia, con la exclusión real observada (0,43), se nota que la última es prácticamente la mitad de la esperada, basada este resultado en la baja variabilidad de los padres (ya que varios presentaban en mismo genotipo), y que tres de los padres presentaron alelos raros.

Del análisis de exclusión secuencial efectuado, se puede observar claramente una tendencia de ciertos padres a fertilizar los clones del huerto, sin embargo, este resultado se ve sesgado, ya que al presentarse alelos raros en ciertos padres (24, 26) hace que la exclusión sea más eficaz para ellos (Tabla 4).

Tabla 4. Paternidad por exclusión para aciertos de uno a tres padres.

Madre	Nro. de Hijos	Padres
2	1	4, 31
	2	hibrido
3	17	4, 31
	4	31
	2	26
4	23	26
	1	23, 30
	3	24, 26
6	2	24, 26
	11	26
23	11	26
28	1	37, 11
30	11	2, 38
	1	4, 28
31	14	24
	8	HIBRIDO
	9	3
36	7	26
	6	HIBRIDO
	2	4, 26

De las tablas anteriores, se deduce que el clon 26 es el padre de un 24% de la descendencia. Un 8% corresponde a los padres 4 y 31 en conjunto, 7% sería híbrido, 6% sería del clon 24 y 4% del clon 3 (plántulas múltiples por semilla). El 38% sería de padres para los cuales no fue posible llegar a determinar sólo uno (indeterminados).

Análisis de la floración

Dado que se cuenta con la floración de la temporada Oct-99 a Dic-99, en la que se indica la floración de cada clon por cada bloque (ANEXO 10), se procedió a realizar un análisis de chi-cuadrado, para conocer si la nube de polen es heterogénea y que todos los clones aportan igual cantidad de granos o, si la nube es homogénea y sólo algunos padres contribuyen con más granos que otros. Del análisis se desprende que existe una diferencia significativa en la floración de los clones en el huerto (Chi-cuadrado = 105.5000 df = 26 p < .000000) (ANEXO 11), lo que hace pensar que la nube de polen es homogénea y sólo algunos padres están más representados que otros.

Análisis de tres variables en conjunto

Si se toman tres variables como floración, distribución espacial en el huerto y análisis de paternidad, podemos establecer los siguientes aseveraciones:

La nube de polen es homogénea, hay ciertos padres que tienen mayor probabilidad de fertilizar a las madres. No todos los clones florecen en igual cantidad en el huerto. Existen algunos que florecen mas veces en el huerto que otros.

El análisis de paternidad establece una tendencia de ciertos clones a fertilizar, dada la cantidad de hijos de los mismos padres.

Ya que la distribución de los clones es en bloques mas o menos al azar, se esperaría que todos los clones que florecen alrededor de un clon madre, sea polinizado por ellos y que le deje descendencia. Sin embargo, esto no sucede y se ejemplificará con un análisis en detalle del clon 31 (Fig. 15):

2	3	5	2	4	17	3	5	34
7	8	11	8	6	7	11	19	30
54	1	23	21	23	26	22	24	21
53	30	31	30	4	28	31	8	8
58	36	361	361	38	38	36	37	2
2	7	21	23	26	32	8	31	34
5	17	24	11	361	17	6	4	21
3	2	8	3	37	5	36	7	33
6	19	26	19	22	33	28	38	28
4	11	23	21	34	40	2	30	19
8	2	3	6	23	6	19	17	8
361	3	5	37	6	26	39	3	30
		6	38					34

Fig. 15. Sección del huerto entre los bloques 1 al 6 (azul) con los clones florecidos (verde) alrededor del clon 31 (fucsia). Las flechas indican el patrón de movimiento del polen después del análisis de paternidad por exclusión.

Para este clon se determinó que sólo cinco clones del huerto podrían haber sido los padres de los 34 hijos del clon 31. Estos son los clones 24, 3, 21, 33, 3, 26. La efectividad del clon 24 fue muy alta, ya que prácticamente el 40% de los hijos son de él, a pesar de que en muy pocas ocasiones está cerca del clon 31 y muchas veces el clon 31 está rodeado de otros clones que florecieron en la temporada.

En este clon se encontraron, también, aquellos hijos múltiples, donde el clon 3 fue el padre de todas o casi todas de las nueve semillas que presentaron fertilización múltiple, lo que daría mayor evidencia de una polinización selectiva. Por otro lado, si no existiera la tendencia al cruzamiento entre ellos, estos hijos múltiples podrían ser de cualquiera de los clones que florecieron a su alrededor.

Se realizó una tabla de contingencia para mostrar la tendencia de ciertos clones a polinizar y a obtener descendencia. En la Tabla 5, se muestran los clones que dieron semillas la temporada de estudio y para los cuales fue posible llegar a determinar un solo padre.

Tabla 5. Tabla de contingencia para mostrar la tendencia de ciertos clones a cruzarse.

Clones madres/Clones padres	3	24	26	31
3			2	4
4			23	
6			11	
23			11	
31	9	14		
36			7	

De esta tabla se desprende que el clon 26 es el que más descendencia deja, y que

prácticamente 4 clones participan en la polinización de esos clones madres. No se presenta descendencia de otros clones que se presentan alrededor de los clones madres, aunque hayan florecido la temporada de estudio.

DISCUSIÓN

Este estudio demostró la dificultad en la obtención de DNA cuando es extraído de hojas que ya han crecido en la temporada y han acumulado resina en su superficie. Esto hizo que se debiera mostrar dos veces el huerto semillero para conseguir el material adecuado de los padres, asegurándose esta vez de usar un kit de extracción para lograrlo. La extracción de material de los hijos fue más sencilla, ya que se trataba, principalmente, de semillas cuyo embrión se extrajo y se procesó, y unas pocas plántulas que sobrevivieron al ataque fungoso que destruyó la casi totalidad de ellas en la etapa de viverización.

Al realizar la selección en semillas trialadas y bialadas, y éstas en aquellas que se hunden y flotan, como método para separar las con y sin capacidad germinativa, respectivamente, se pudo comprobar que la totalidad de las hundidas germinaron o poseían embrión, y las que flotaron no lo hicieron. Se notó una gran variabilidad fenotípica de las semillas de acuerdo al clon del cual provenían, observándose testas más duras o blandas, semillas más grandes o pequeñas, y algunos incluso con colores café mas o menos intenso. El análisis de correlación efectuado entre cantidad de semillas por gramo versus porcentaje de germinación nos indica que la capacidad germinativa está dada por factores propios de la semilla y no por el tamaño de ésta, consecuentemente, no está dado por el tamaño del embrión.

El protocolo de germinación de las semillas fue adecuado, así como el sustrato usado para ello. Al ser inerte, se evitó tener que aplicar algún fungicida a las semillas, las cuales son muy sensibles a los agroquímicos. El sistema hidropónico ajustado a esta investigación, también permitió observar las semillas que se presentaron con dos o tres raíces que

representarían plántulas independientes. Al sembrarse una semilla en cada cubo de esponja, se sabe que debe germinar sólo una plántula, por lo que de haberlo realizado en el sistema recomendado sobre corteza de pino, este resultado no habría sido posible.

Una consideración especial, es que la siembra en un lugar que presenta condiciones más altas de temperatura a lo usual para esta especie, habría permitido el ataque tanto de insectos cortadores y problemas fungosos, haciéndose altamente susceptible a éste último, sin poder ser controlado. El uso de un invernadero adecuado podría haber suprimido este problema.

Cuando se procedió a extraer el DNA de las semillas para obtener material de los hijos, se observó una gran cantidad de semillas que no poseían embrión. El 55% correspondieron a semillas trialadas y 29% a las bialadas; es decir, un 84% de las semillas no poseen embrión. Esto considera un gran gasto energético en la producción de flores que no producirán semillas, sugiriendo una selección por autoincompatibilidad, la cual había sido sugerida previamente (Riveros, 1997). Esta característica se refuerza y argumenta por los resultados de este trabajo que determina que los hijos (semillas con embrión y plántulas) son resultado de una polinización cruzada (salvo dos excepciones en que el padre no está bien determinado).

Otro resultado notable, es el hallazgo de plántulas múltiples por semilla, no notado previamente para esta especie, para las cuales se puede determinar que correspondería a una fertilización múltiple para los hijos 4a y 4b, ya que ambos presentan una carga genética diferente. Para los hijos 3a, 3b y 3c, se sugiere que es una fertilización múltiple para 3b, y no se distingue entre una división adicional del cigoto y una doble fertilización para los otros dos. Las demás plántulas presentan la misma dificultad.

Al realizar la recolección del material de los hijos del clon 2, se observó en terreno, que probablemente dos de ellos corresponderían a un cruzamiento híbrido. Así, cuando se llevó a cabo el análisis de paternidad se notó que uno de ellos, no cumplía con ninguna de las

segregaciones de las bandas que se presentaban frecuentemente. Más aún, ni siquiera se presentaban las bandas de la madre. Esto lleva a considerar lo desconocido que resulta el efecto de una fertilización de otra especie, donde no se conocen los efectos genéticos, cuando principalmente la hibridización ocurre aparentemente en la dirección *N. alpina* x *N. obliqua* (Gallo *et al*, 1997).

La hibridización encontrada, discute el grado de éxito en la capacidad de fertilización de los granos de polen que esté influenciado por la distancia (Mitton, 1992). Dado que el bosque de roble más cercano se encontraría a 5 km aproximadamente, el aislamiento limitaría el flujo de polen desde otra especie (Ritland y El-Kassaby, 1986). Si no el porcentaje de híbridos sería mucho mayor, ya que la hibridización interespecífica podría ser muy alta en el caso de árboles aislados, pudiendo producir híbridos vigorosos (Gallo *et al*, 1997). Sin embargo, este mismo autor señala, que se estaría en presencia de un aislamiento precigótico dado por la extensión de la floración, la cual estaría afectada por cambios ambientales. Por lo tanto, el hallar híbridos en el huerto, afirma el éxito de la polinización a largas distancias, pero la cantidad de híbridos podría haber estado influenciado, tanto por la distancia o aislamiento físico, como por el aislamiento precigótico.

Sería interesante evaluar la distancia al bosque de roble que originó estas semillas y darlo a conocer como la distancia mínima de aislación si se quiere establecer un nuevo huerto de esta especie, similar a las condiciones que se piden para cualquier producción de semillas.

Respecto a la caracterización isoenzimática no se tuvo el éxito esperado, dado que se obtuvieron 5-6 isoenzimas para los padres, pero 5-6 isoenzimas diferentes para los hijos. Luego de este resultado, no se insistió más en estos marcadores y se enfocó el estudio, al marcador molecular.

Los marcadores moleculares fueron en un comienzo denominados como “microsatélite”,

ya que habían sido secuenciados a partir de una caracterización de *Quercus robur* (Kampfer *et al.*, 1998). Al ser éstos primers heterólogos, no mostraron la característica de multialelismo que se esperaba. Por esto, el análisis debió realizarse como marcadores multiloci, con bandas que se repetían frecuentemente entre los 400 a 100 bp. De todos los microsatélites probados (25), la variabilidad presentada fue muy baja, sugiriendo que el uso de primers heterólogos en esta especie no es un marcador tan eficiente. Probablemente, si se hubieran secuenciado primers para esta especie el resultado hubiese sido diferente y no habría requerido tanto tiempo en adecuar las condiciones de PCR.

Los alelos nulos propuestos para cada locus del partidor 30, ayudaron a definir ciertas bandas que se presentaban en los hijos y no en las madres o viceversa, y que no tenían explicación con una segregación normal de dos alelos.

Para mejorar o fortalecer este trabajo con marcadores moleculares y paternidad por exclusión, debió haberse realizado al comienzo de la investigación un cruzamiento dirigido, donde se supiera la madre, el padre y los hijos, para establecer un patrón de herencia de las bandas.

El porcentaje de germinación general fue de un 8.63%, si sólo se toman en cuenta las semillas germinadas. Sin embargo, si se le adiciona el número de semillas a las cuales se les extrajo el DNA, las cuales potencialmente pueden producir plantas, el porcentaje de germinación se eleva a un 15%. Se sugiere que gran parte de las semillas que no germinaron pueden presentar dormancia, a pesar de haberlas puesto en las condiciones adecuadas para su germinación. Se podría sospechar que el cruzamiento con ciertos clones le otorgarían esta característica, sin embargo, esta aseveración requiere que se puedan establecer cabalmente los padres que no ha sido posible determinar.

La tendencia al cruzamiento se ve favorecida por la distribución espacial de los clones

en el huerto, dado que al realizar el análisis considerando las variables de distribución espacial, floración de los clones en el huerto en los diferentes bloques y el análisis de paternidad, se observó que los clones polinizantes se encontraban al lado sobre la misma hilera o en la contigua. Además, cuando los clones madres habían florecido, pero se encontraban rodeados por otros clones, éstos no resultaron ser padres de ninguna semilla. Para el clon 31, el 40% de los hijos son del clon 24, el cual sólo en cuatro bloques está cerca del clon 31 de 23 bloques en que el clon 31 floreció. Los otros 19 bloques en que floreció, este clon estuvo rodeado con otros clones, de los cuales no se obtuvieron semillas. Lo mismo sucede si se observa el clon 4, donde la mayor proporción corresponde a hijos del clon 26, y que a pesar de estar rodeados por otros clones, éstos no le dieron descendencia. Adams (1992), ya había reconocido que la proporción de los hijos fertilizados por los árboles marcados disminuía rápidamente con la distancia, y Ritland y El-Kassaby (1986) señalan que cierto arreglo espacial puede limitar los cruzamientos consanguíneos o favorecerlos.

Según la teoría de Wright (1943), el flujo limitado produce un aislamiento por distancia restringido al tamaño de la vecindad, lo que provoca una estructura familiar dentro de las poblaciones en que los vecinos tienden a ser parientes. Mientras que Eaton *et al* (2002), señala que en una población natural de Raulí, es posible encontrar vecinos emparentados mezclados con vecinos no emparentados. Los resultados de este estudio sugieren que existe una limitación del flujo de polen, que no es totalmente limitado y una tendencia de ciertos cruzamientos. Esto podría fortalecer la creación de vecindades en poblaciones naturales.

Se sugiere que este fenómeno sea atribuido a:

- Una distribución espacial no estrictamente al azar.
- Una afinidad en el desarrollo fenológico (floración) como aislamientos precigóticos o postcigóticos.

- Contribuciones de polen desiguales entre los árboles
- Cambios ambientales en el clima, como una temporada con mayor o menor precipitación, temperatura, heladas, etc.

Para una evaluación de la paternidad más exacta en este huerto, evaluando efectivamente la distribución espacial, podría realizarse un estudio en el cual las semillas fueran extraídas por árbol y por bloque y no mezcladas como fueron recibidas para este estudio luego de su cosecha. Otro factor que debe tomarse en cuenta es la floración, la cual es muy diferente entre los clones y entre los bloques. La nube de polen es muy homogénea y están representados unos clones más que otros, debido a la desigualdad en la floración entre los bloques. Estos argumentos explicarían en parte el añerismo que presentan los clones, ya que no todos producen semillas todos los años.

Se reconoce que este estudio es el análisis básico que se podría recomendar para evaluar un huerto semillero. Además de enmendar las falencias en la metodología para determinar los padres con los marcadores moleculares escogidos, se puede sugerir que un estudio de este tipo, además de contar con las variables que se pudo obtener para este trabajo (análisis de floración por bloque, distribución espacial, etc.), se requiere material de estudio de más de un año, tanto semillas como plántulas, conocer las condiciones climáticas del lugar (dirección del viento, temperaturas, etc.), y trabajar cada clon por separado en cada bloque.

CONCLUSIONES

- 1) Dentro del huerto existen ciertos clones que tienen tendencia a cruzarse, por lo tanto, se rechaza la hipótesis H_0 y se confirma que la tendencia es a cruzarse con los clones que se encuentran más cercanos, de modo que gran parte de las semillas eran de un mismo padre.
- 2) La nube de polen es homogénea; es decir, la fertilización es sólo de algunos pocos padres, lo que confirma la hipótesis H_1 .
- 3) No se pudo determinar si el modo de herencia del marcador genéticos utilizado es mendeliana.
- 4) Se determinó la existencia de contaminación por polen ajeno al huerto (roble), principalmente, gracias a la observación en terreno y a la confirmación en el análisis de laboratorio.
- 5) Se recomienda realizar polinizaciones dirigidas para asegurar el cruzamiento entre los clones.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, W. T. 1992. Gene dispersal within forest tree population. *New Forest* 6 :217-240.
- BROWN, A. H. D. 1979. Enzyme polymorphism in plant population. *Theor. Pop. Biol.* 15: 1-42.
- CARRASCO, B. 1998. Patrones de variabilidad aloenzimática en Raulí (*Nothofagus alpina* Poepp et Endl (Oerst)) efecto de su sistema reproductivo distribución geográfica y última glaciación). Tesis Ms. Cs.; Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 106 p.
- CONKLE, T., HODGKISS, P., NUNNALLY, L. and HUNTER, S. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. USDA, Forest Service. 18 p.
- CHEE, et al. 2000. Seed Extraction Protocol. [Http://res2.agr.ca/winnipeg/seed.htm](http://res2.agr.ca/winnipeg/seed.htm).
- DEVLIN, B. and ELLSTRAND, C. 1990. The development and application of a refined method for estimating gene flow angiosperm paternity analysis. *Evolution*. 44(2): 248-259.
- DONOSO, C. 1979. Variación y tipos de diferenciación en poblaciones de Roble. *Bosque* 3(1):1-14.
- DONOSO, C., MORALES, J. y ROMERO, M. 1990. Hibridación natural entre Roble (*Nothofagus olicua* (Mirb.) Oerst) y Raulí (*N. alpina* (Poepp et Endl (Oerst))) en bosques del sur de Chile. *Rev. Hist.Nat.* 63: 49-60.
- DOW, B. D. and ASHLEY, M.V. 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology* 5: 615-627.
- ELLSTRAND, N.C. 1984. Multiple paternity within the fruits of the wild radish, *Raphanus sativus*. *Am. Nat.* 123:819-828.
- FORD-LLOYD, B and PAINTING, K. 1999. Measuring Genetic variation using molecular markers. <http://www.cgiar.org/ipgri/training/10-1/content.htm>
- GALLO, L.A.; MARCHELLI, P. and BREITEMBÜCHER, A. 1997. Morphological and allozymic evidence of natural hybridization between two southern beeches (*Nothofagus* spp.) and its relation to heterozygosity and height growth. *Forest Genetics* 4(1):15-23.
- HAMRICK, J.L. and SCHNABEL, A. 1985. Understanding the genetic structure of plant population: some old problems and a new approach. In: Gregorius HR (de) *Population Genetics in Forestry*, Springer, Berlin Heidelberg New York, 50-70.

- ISAGI, Y. and SUHANDONO, S. 1997. PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology*. 6: 897-899.
- KAMPFER, S.; LEXER, C.; GLÖSSI, J and STEINKELLNER, H. 1998. Characterization of (GA)_n microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas* 129: 183-186.
- MITTON, J. B. 1992. The dynamic mating systems of conifers. *New Forest* 6: 197-216.
- NIEMBRO, A. 1989. Semillas de plantas leñosas, Morfología Comparada. Noriega Editores. Ed. Limusa, Argentina. 224 p.
- PINEDA, G. 1998. Determinación de los patrones de variabilidad genética en poblaciones de raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst.) y ruil (*Nothofagus alessandrii* Espinosa), por medio de electroforesis horizontal en geles de almidón. Tesis Ing. For.; Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 135 p.
- RIVEROS, M., PAREDES, M., ROSAS, M., CARDENAS, E., ARMESTO, J., ARROYO, M. y PALMA, B. 1995. Reproductive biology in species of the genus *Nothofagus*. *Env. Exp. Bot.* 35(4):519-524.
- RIVEROS, M., ERAZO, S., O'REILLY, S., PALMA, B. 1997. Género *Nothofagus*. ¿Especies en extinción? *Biología de la reproducción*. VI Congreso Latinoamericano de Botánica S.T. N° 12.
- RITLAND, K. and EL-KASSABY, Y.A. 1986. The nature of inbreeding in a seed orchard of as shown by an efficient multilocus model. *Theor.Appl.Genet*
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T. 1989 *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 6: 1-62.
- SMITH, D.B. and ADAMS, W.T. 1983. Measuring pollen contamination in clonal seed orchards with the aid of genetic markers. **In**: Proceedings of the 17th Southern Forest Tree Improvement Conference. University of Georgia, Athens. 69-77.
- STEINKELLNER, H., FLUCH, S., TURETSCHKEK, C., LEXER, C., STREIFF, R., KREMER, A., BURG, K. and GLOSSL, J. 1997a. Identification and caracterización of (GA/CT)_n-microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology*. 33: 1093-1096.
- STEINKELLNER, H., LEXER, C., TURETSCHKEK, E. and GLOSSL, J. 1997b. Conservation of (GA)_n microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular ecology*. 6: 1189-1194.
- WEIR, B. 1996. *Genetic Data Analysis*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 445 p.
- WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*. 28:114-138.

ANEXOS

INDICE DE MATERIAS

<u>INTRODUCCION</u>	1
ANTECEDENTES GENERALES DE LA ESPECIE	1
FLUJO GÉNICO Y ANÁLISIS DE PATERNIDAD	2
OBJETIVOS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
HIPÓTESIS DE TRABAJO.	7
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	9
UBICACIÓN DEL HUERTO Y SUS CARACTERÍSTICAS	9
OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL DE LOS PADRES E HIJOS	10
PROGENITORES	10
DESCENDIENTES	10
MATERIAL VEGETAL ANEXO	12
CARACTERIZACIÓN ISOENZIMÁTICA	14
CARACTERIZACIÓN DE SSR	15
EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	15
CONDICIONES DE PCR	16
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DENATURANTE (10%) Y TINCIÓN CON PLATA (1%).	18
PROBABILIDAD DE EXCLUSIÓN	18
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
<u>RESULTADOS</u>	21
SIEMBRA	21
GERMINACIÓN	22
ANÁLISIS DE LAS SEMILLAS ATROFIADAS	23

PLANTAS GEMELAS O MELLIZAS	23
HÍBRIDOS O POLINIZACIÓN CON POLEN EXTRAÑO AL HUERTO	24
CARACTERIZACIÓN ISOENZIMÁTICA	25
ANÁLISIS DE PATERNIDAD SECUENCIAL CON MARCADORES SSR	26
VARIABILIDAD DEL MARCADOR	26
PROBABILIDAD DE EXCLUSIÓN	26
ANÁLISIS DE PATERNIDAD POR EXCLUSIÓN SECUENCIAL	27
ANÁLISIS DE LA FLORACIÓN	31
ANÁLISIS DE TRES VARIABLES EN CONJUNTO	32
<u>DISCUSIÓN</u>	35
<u>CONCLUSIONES</u>	41
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	42
<u>ANEXOS</u>	44

LISTA DE FIGURAS

FIG. 1. HOMOGENEIDAD DE LA NUBE DE POLEN (PANMIXIA).....	7
FIG. 2. DIAGRAMA DE LOS CLONES CON MAYOR TENDENCIA A CRUZARSE.	8
FIG. 3. HUERTO SEMILLERO COOPERATIVA DE MEJORAMIENTO, CONAF Y U.AUSTRAL. ...	9
FIG. 4. INVERNADERO FRÍO.....	11
FIG. 5. SIEMBRA EN GROWERS (DE FLORA CENTER).....	12
FIG. 6. SIEMBRA EN GROWERS (DE FLORA CENTER).....	12
FIG. 7. GEL DE POLIACRILAMIDA CON PRIMER 30.	17
FIG. 8 . VARIABILIDAD EN EL TAMAÑO DE LAS SEMILLAS (CLON 36).....	21
FIG. 9. CORRELACIÓN ENTRE CANTIDAD DE SEMILLAS Y % DE GERMINACIÓN.....	22
FIG. 10. SEMILLAS DEL CLON 31 CON MÁS DE UNA RAÍZ.....	24
FIG. 11. PLANTA HÍBRIDA (HIJO 2.21).....	25
FIG. 12. GEL POLIACRILAMIDA DE HIJOS DEL CLON 2	25
FIG. 13. ALELOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE PATERNIDAD.....	27
FIG. 14. HIJOS DE LOS CLONES 23 Y 31.	28
FIG. 15. SECCIÓN DEL HUERTO PARA ANÁLISIS DE PATERNIDAD CLON 31	32

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. NÚMERO DE HIJOS CON EXTRACCIÓN DE DNA.....	14
TABLA 2. EXCLUSIÓN BASADO EN EL ANÁLISIS DE LOS PRIMERS 30 Y MAQ4.	28
TABLA 3. RESUMEN DEL NÚMERO DE HIJOS RESPECTO A LOS ACIERTOS DE PADRES.....	30
TABLA 4. PATERNIDAD POR EXCLUSIÓN PARA ACIERTOS DE UNO A TRES PADRES.....	31
TABLA 5 TABLA DE CONTINGENCIA.	33

ANEXO 1

Plano del huerto

2	3	5	2	4	17	3	5	34	37	36	39	361	30	23	10	31	23	31	361	14	4	11	361	40	18	23	30	11	26	2			
7	8	11	17	19	8	6	7	11	19	30	33	28	32	31	36	4	7	36	4	7	21	30	34	11	36	19	31	24	8	28			
54	1	23	24	26	21	23	4	26	22	24	21	24	7	26	23	34	26	58	11	19	37	5	361	15	24	33	36	19	4	2	31	4	
53	30	31	33	33	30	28	31	8	19	7	17	11	37	24	6	37	24	6	31	17	31	32	38	8	17	30	11	21	32	6	21	7	
58	36	361	37	39	361	38	36	37	2	3	6	4	39	21	31	11	6	19	2	3	6	19	2	3	8	8	17	23	26	2	2	2	
2	7	21	22	23	26	32	8	31	34	32	6	4	30	7	28	5	36	4	34	21	16	6	11	36	20	31	4	21	26	6	33	34	26
5	17	24	32	37	11	361	17	6	4	21	32	8	7	31	40	17	32	12	11	8	32	36	3	31	22	33	32	3	8	4	24	24	
3	8	2	34	30	3	37	5	36	7	33	37	8	7	31	24	23	3	30	4	23	8	28	38	30	37	5	7	19	24	22	37	37	
6	19	26	33	39	19	22	33	28	38	28	24	3	26	5	24	23	3	30	4	19	8	28	38	30	23	17	34	38	8	8	8	8	
4	11	23	31	361	21	34	40	2	30	19	36	2	22	11	31	33	2	34	19	31	33	2	34	19	31	33	2	34	19	31	33	2	34
8	2	3	36	4	6	23	19	17	28	8	6	9	4	7	2	36	8	31	13	26	30	32	26	17	7	28	4	36	33	21	7	25	25
361	5	3	37	6	38	2	26	6	39	3	30	34	17	19	24	24	4	38	28	23	17	19	17	7	3	6	37	21	31	11	5	23	7

44

4	7	41	36	22	7	56	2	8	23	32	4	36	11	26	52	24	2	23	37	19	22	46	23	32	24	22	33	30	4	21	33	33				
40	30	8	46	17	19	46	11	43	23	46	32	21	36	7	2	6	3	30	11	33	47	6	21	36	45	11	361	31	3	6	32	40	26	5	32	
4	7	21	7	2	6	4	31	6	7	53	33	32	7	19	48	28	17	11	21	4	22	8	30	32	44	6	8	5	32	17	361	19	17	34	38	
46	30	26	30	30	26	7	4	30	19	32	17	4	36	24	26	17	11	21	4	22	8	30	32	44	6	8	5	32	17	361	19	17	34	38		
43	3	19	43	24	32	37	4	30	19	11	21	30	33	54	24	21	30	33	54	34	11	22	7	36	38	17	28	21	2	4	32	32	32	32		
40	4	7	23	46	24	3	4	17	11	7	22	2	26	8	4	17	11	21	30	33	54	24	21	30	33	54	34	11	22	7	36	38	17	28	21	
40	43	40	32	33	7	36	43	19	21	2	30	24	21	30	33	54	34	11	22	7	36	38	17	28	21	2	3	31	31	11	37	38	28	23		
11	11	28	21	2	21	41	6	30	32	17	4	30	32	17	4	30	32	17	4	30	32	17	4	30	32	17	4	30	32	17	4	30	32	17	4	
40	30	7	40	4	46	6	2	4	3	5	30	28	32	31	36	28	32	31	36	28	32	31	36	28	32	31	36	28	32	31	36	28	32	31	36	
30	41	21	30	31	32	30	32	31	41	43	8	19	7	55	23	8	19	7	55	23	8	19	7	55	23	8	19	7	55	23	8	19	7	55	23	
7	7	21	43	43	41	31	2	51	2	51	2	51	2	51	2	51	2	51	2	51	2	51	2	51	2	51	2	51	2	51	2	51	2	51	2	51

Letras en negro indican clones; Letras en azul indican los bloques.

ANEXO 2

Clones del huerto con producción de semillas y estado fenológico.

Clon	Clon con producción de semillas	Clon con producción de hijos de años anteriores	Estado fenológico a Octubre 2000
2	NO	SI	Yemas poco abiertas
3	SI		Yemas poco abiertas
4	SI		Yemas poco abiertas
5	SI		Hojas de 5 cm
6	SI		Hojas bien adelantadas de 5 cm. Flores masculinas presentes y algo de femeninas
7	SI		Yemas con hojas abiertas de 2 cm
8	SI		Yemas poco abiertas
11			Yemas poco abiertas
17			Yemas poco abiertas
19		SI	Yemas poco abiertas
21			Hojas de 1 cm. Lo denominan un clon fiel porque brota temprano en la temporada y las bota tarde
22	SI		Yemas poco abiertas
23	SI		Yemas medianamente abiertas de 4 cm. Yemas grandes
24			Yemas poco abiertas
26		SI	Yemas poco abiertas
28	SI		Yemas poco abiertas
30	SI		Yemas medianamente abiertas de 4 cm. Yemas grandes
31	SI		Yemas poco abiertas
32		SI	Yemas poco abiertas
33			Yemas poco abiertas
34	SI		Yemas poco abiertas
36 Q	SI		Yemas poco abiertas
36-1	SI		Yemas poco abiertas
37	SI		Yemas poco abiertas
38	SI		Yemas de 2 cm con hojas
39	Padre nuevo		Padre nuevo que floreció
40, 41	Padres nuevos		Clon atrasado
43	Padre nuevo		Hojas de 2 cm, yemas recién abriendo, floreció en la temporada 1999
46	Padre nuevo		Clon atrasado
53, 54, 58	Padres nuevos		Son los más atrasados en cuanto a la formación de hojas y flores

ANEXO 3

Metodología de viverización de plantas de raulí

- Remojo en ácido giberélico, en una solución de 200 ppm, por 48 horas, a temperatura ambiente. Hacerlo en depósitos individuales por familia, formando sólo una monocapa de semillas sobre la superficie.
- Después de las 48 horas, la semilla viable es lavada y sembrada en contenedores con corteza de pino compostada con una granulometría de G10 (partículas menores o iguales a un centímetro).
- Se pasa a una cámara de germinación, que consiste en una pieza oscura, con temperatura controlada entre 20-30 °C, por un periodo de cinco días. Se debe inspeccionar todos los días para detectar la posible emergencia prematura de cotiledones.
- Posteriormente, se llevan al invernadero, a los 20 días de germinado comienza la aplicación de fertilizantes, dos a tres aplicaciones semanales (P>K>N), cuando se forman las hojas verdaderas se aumenta la cantidad de N y al final de la etapa de crecimiento aumenta el K.
- La aplicación de insecticidas piretroides como AMBUSH, se realiza en forma ocasional, cuando se observan ataques.
- La aplicación de fungicidas se realiza cada 15 días alternando CAPTAN y BENLATE (son los que usamos normalmente).

Dato anexo: 1 gramo de semillas de raulí contiene aproximadamente 100 semillas.

ANEXO 4

Protocolo de extracción de semillas

Extraction Buffer:

0.5 M Tris pH 7.5

0.35 M NaCl

0.5 % SDS

H₂O to required volume

1. Crush one seed between two sheets of acetate paper.
2. Place in 1.5 mL tube.
3. Add 250 µl of extraction buffer and vortex sample to mix.
4. Let stand at room temperature for 15 minutes.
5. Centrifuge for 3 minutes at 13.000 rpm.
6. Transfer supernatant to fresh tubes.
7. Add 5M potassium acetate to a final concentration of 0.5M.
8. Incubate on ice for 20 minutes.
9. Centrifuge for ten minutes at 9,000 rpm.
10. Transfer supernatant to a fresh tube.
11. Precipitate with equal volume of isopropanol.
12. Leave on ice for 2 minutes.
13. Centrifuge ten minutes at 13,000 rpm.
14. Aspirate supernatant and dry pellet.
15. Resuspend in 75 µl of 0.1X TE buffer.
16. Store at 4°C.

Dilute DNA 1:4 for use in PCR.

ANEXO 5

Reactivos para gel de poliacrilamida denaturante 10% (30 ml)

Urea 12.6 gr.

Acrilamida 40% 7.5 ml

TBE 5X 7.5 ml

Temed 15 μ l

Persulfato 150 μ l

Protocolo de tinción de plata

Aplicar Etanol 10% por 5 min. Botar.

Aplicar Acido Nítrico 1% por 5 min. Botar.

Lavar con abundante agua desionizada por tres veces y desechar cada vez.

Aplicar plata 0.2 % por 20 min. en oscuridad. Desechar.

Lavar con agua desionizada justo 1 min.

Aplicar 8.91 gr. de carbonato (Na_2CO_3 0.28 M) y 150 μ l de formaldehído 0.5% disueltos previamente en 300 ml. de agua. El formaldehído debe disolverse en el carbonato en el momento de usar. La reacción con la plata hace que la solución se vuelva oscura, razón por la cual debe aplicarse una pequeña cantidad (100 ml. aprox.) y desechar cuando se haya oscurecido.

Aplicar ácido acético 10 % por 5 minutos. Desechar.

Aplicar agua desionizada por 5 minutos. Desechar.

ANEXO 6

Cuadro resumen por clon de la cantidad de semillas en 3 gr. y germinación para las cuatro categorías de selección

Clon	Peso Sem	Cant. Sem	Cant. Sem germ	% Germ	Total		Total		Trialada				Flota				Bialadas		
					Hund.	Flota	Trial	Bial	Hundida Total	S/germ	C/germ	% Germ	Total	S/germ	C/germ	% Germ	Hundida Total	S/germ	C/germ
3	3	371	12	3,2	148	223	247	124	105	94	11	10,5	142	142	0	0,0	43	42	1
4	2,93	301	0	0,0	176	125	180	121	117	117	0	0,0	63	63	0	0,0	59	59	0
5	3	357	56	15,7	108	249	237	120	78	33	45	57,7	159	159	0	0,0	30	19	11
6	2,986	342	41	12,0	276	66	201	141	164	147	17	10,4	37	37	0	0,0	112	88	24
7	2,15	266	2	0,8	2	264	183	83	2	0	2	100,0	181	181	0	0,0	0	0	0
8	3,05	299	7	2,3	242	57	192	107	144	140	4	2,8	48	48	0	0,0	98	95	3
22	3,07	398	104	26,1	171	227	282	116	123	67	56	45,5	159	159	0	0,0	48	0	48
23	3	515	4	0,8	446	69	357	158	302	302	4	1,3	55	55	0	0,0	144	144	0
28	3,024	389	55	14,1	84	305	271	118	56	23	33	58,9	215	215	0	0,0	28	6	22
30	3,096	386	6	1,6	132	254	275	111	85	79	6	7,1	190	190	0	0,0	47	47	0
31	3,015	294	52	17,7	138	156	198	96	101	49	52	51,5	97	97	0	0,0	37	37	0
34	3,077	257	42	16,3	121	136	179	78	83	49	34	41,0	96	95	1	1,0	38	31	7
36Q	3,041	326	6	1,8	158	168	237	89	120	115	5	4,2	117	116	1	0,9	38	38	0
36-1	3,046	391	22	5,6	229	162	261	130	145	124	21	14,5	116	116	0	0,0	84	83	1
37	3,033	346	17	4,9	53	293	224	122	24	15	9	37,5	200	197	3	1,5	29	26	3
38	3,022	337	51	15,1	64	273	240	97	47	7	40	85,1	193	193	0	0,0	17	6	11
Total	47,54	5575	477	138,1	2548	3027	3764	1811	1696	1361	339	527,9	2068	2063	5	3,396	852	721	131
Prom	2,971	348,4	29,8125	8,634	159,3	189	235,3	113	106	85,063	21,188	32,99	129	128,94	0,3125	0,212	53,3	45,063	8,188

49

ANEXO 7

GENOTIPOS POR CLON CON EL PRIMER 30

Clon	Genotipo				
2	A0A0	B0B0	C1C2	D0D0	P1
3	A2A0	B1B0	C1C2	D1D0	Q1
4	A1A0	B2B0	C1C2	D1D0	
5	A2A0	B2B0	C2C0	D1D0	Q1
6	A2A0	B2B0	C2C0	D1D0	Q1
7	A0A0	B0B0	C0C0	D0D0	
8	A2A0	B2B0	C2C0	D1D0	Q1
11	A1A2	B1B0	C2C0	D1D0	
17	A2A0	B2B0	C2C0	D1D0	
19	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0	
21	A1A2	B0B0	C1C2	D0D0	
22	A2A0	B1B2	C2C0	D1D0	Q1
23	A2A0	B1B2	C2C0	D1D0	
24	A2A0	B0B0	C1C2	D1D2	Q1
26	A2A0	B0B0	C1C0	D2D0	P1?
28	A1A0	B0B0	C1C2	D1D0	P1?
30	A2A0	B1B2	C2C0	D1D0	Q1
31	A1A0	B2B0	C2C0	D1D0	
32	A0A0	B0B0	C2C0	D0D0	
33	A1A2	B0B0	C1C2	D0D0	P1
34	A0A0	B0B0	C1C2	D0D0	
36	A1A0	B0B0	C2C0	D1D0	Q1
361	A2A0	B1B2	C2C0	D1D0	Q1
37	A1A2	B0B0	C2C0	D0D0	P1
38	A1A0	B0B0	C1C2	D0D0	P1
39	A2A0	B2B0	C2C0	D0D0	P1
43	A1A0	B0B0	C1C2	D0D0	P1

GENOTIPOS DE LOS HIJOS DEL CLON 2

Hijos	Genotipo					RESUMEN GENOTIPOS HIJOS				Nro.Hijos
2.2	A2A0	B2B0	C1C2	D1D0	Q1	A2A0	B2B0	C1C2	D1D0	5
2.3	A0A0	B0B0	C1C1	D1D0		A0A0	B0B0	C1C1	D1D0	2
2.4	A2A0	B2B0	C1C2	D1D0	Q1	A0A0	B2B0	C1C2	D0D0	1
2.5	A2A0	B2B0	C1C2	D1D0	Q1	A0A0	B2B0	C1C1	D1D0	1
2.6	hibrido					A0A0	B2B0	C1C2	D1D0	5
2.9	A0A0	B0B0	C1C1	D1D0		A2A0	B0B0	C1C2	D1D0	1
2.10	A2A0	B2B0	C1C2	D1D0	Q1	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0	1
2.12	A0A0	B2B0	C1C2	D0D0	Q1	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0	1
2.18	A2A0	B2B0	C1C2	D1D0	Q1	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0	1
2.21	hibrido de semillas de años anteriores, ver foto									
2.14	A0A0	B2B0	C1C1	D1D0	Q1					
2.17	A0A0	B2B0	C1C2	D1D0	Q1					
2.19	A2A0	B0B0	C1C2	D1D0						
2.20	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0						
2.26	A0A0	B2B0	C1C2	D1D0						
2.27	A0A0	B2B0	C1C2	D1D0	Q1					
2.28	A0A0	B2B0	C1C2	D1D0	Q1					
2.30	A0A0	B2B0	C1C2	D1D0	Q1					

ANÁLISIS DE EXCLUSIÓN

MADRE	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES
A0A0	A2A0	A2A0 A1A2	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0
B0B0	B2B0	B2B0 B1B2	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0	B0B0	B0B0 B1B2	B0B0	B0B0 B1B2	B0B0	B0B0 B1B2	B0B0	B0B0 B1B2	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0
C1C2	C1C2	C1C2 C1C0 C2C0	C1C0	C1C0 C1C2	C1C0	C1C0 C1C2	C1C0	C1C0 C1C2	C1C0	C1C0 C1C2	C1C0	C1C0 C1C2	C1C0	C1C0 C1C2 C2C0
D0D0	D1D0	D1D0 D1D2	D1D0	D1D0 D1D2	D0D0	D0D0 D1D0 D2D0	D0D0	D0D0 D1D2	D0D0	D0D0 D1D2	D0D0	D0D0 D1D2	D0D0	D0D0 D1D2
		22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17	4, 28, 3, 24	4, 31, 17 26, 22, 23, 30, 361, 39, 5, 6, 8	4, 31	4, 31, 22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17	19, 3, 24, 5, 6, 8, 17	36, 4, 28, 31, 3, 24, 5, 6, 8, 17						

GENOTIPOS DE LOS HIJOS DEL CLON 4

Hijos	Genotipos			
4.5	A1A2	B1B2	C1C2	D1D2
4.6	A1A2	B1B2	C1C2	D1D2
4.7	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2
4.8	A0A0	B0B0	C1C0	D1D2
4.9	A1A2	B1B2	C1C0	D1D2
4.10	A1A2	B1B2	C1C2	D1D2
4.11	A1A2	B0B0	C1C2	D1D2
4.12	A1A2	B0B0	C1C2	D1D2
4.13	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2
4.14	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2
4.15	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2
4.16	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2
4.17	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2
4.18	A0A0	B2B0	C1C2	D1D2
4.19	A1A2	B1B2	C1C2	D1D2
4.20	A1A2	B1B2	C1C2	D1D2
4.21	A1A2	B1B2	C1C2	D1D2
4.22	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2
4.23	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0
4.24	A1A2	B2B0	C1C2	D1D2
4.25	A1A2	B2B0	C1C2	D1D2
4.26	A1A2	B1B2	C1C2	D0D0
4.27	A1A2	B1B2	C1C2	D0D0
4.28	A1A2	B1B2	C1C2	D0D0
4.29	A1A2	B1B2	C1C0	D1D0
4.30	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0
4.31	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0
4.32	A1A2	B0B0	C1C0	D1D0
4.33	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0
4.35	A0A0	B0B0	C1C1	D2D0
4.36	A0A0	B0B0	C2C0	D1D2
4.37	A1A2	B0B0	C1C2	D2D0
4.38	A1A2	B2B0	C1C2	D2D0
4.39	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0
4.40	A1A0	B2B0	C1C2	D2D0

Q1
Q1
Q1

RESUMEN GENOTIPOS HIJOS

					nro.hijo
Padre 26	A0A0	B0B0	C1C0	D1D2	1
	A1A2	B0B0	C1C0	D1D2	1
	A1A2	B0B0	C1C0	D1D0	1
	A0A0	B0B0	C2C0	D1D2	1
	A0A0	B0B0	C1C0	D2D0	1
Padre 24 ó 26	A1A2	B1B2	C1C2	D1D2	4
	A0A0	B2B0	C1C2	D1D2	1
	A1A2	B2B0	C1C2	D1D2	2
	A1A2	B0B0	C1C2	D1D2	4
	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2	7
	A1A2	B0B0	C1C2	D2D0	1
	A1A2	B2B0	C1C2	D2D0	1
Padres 3, 11, 22, 23, 30, 36'	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0	5
	A1A2	B1B2	C1C2	D0D0	3
	A1A2	B1B2	C1C1	D1D0	1

ANÁLISIS DE EXCLUSIÓN

RESUMEN DE GENOTIPOS DE LOS HIJOS DE LA MADRE 4 Y PADRE 26

MADRE	HIJOS	PADRES								
A1A0	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A1A2	A2A0 A1A2	A1A2	A2A0 A1A2	A0A0	A1A0 A2A0 A0A0	A0A0	A1A0 A2A0 A0A0
B2B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0								
C1C2	C1C0	C1C0 C2C0 C0C0	C1C0	C1C0 C2C0 C0C0	C1C0	C1C0 C2C0 C0C0	C2C0	C1C0 C2C0 C0C0	C1C0	C1C0 C2C0 C0C0
D1D0	D1D2	D1D2 D2D0	D1D2	D1D2 D2D0	D2D0	D2D0 D1D2	D1D2	D1D2 D2D0	D2D0	D2D0 D1D2

RESUMEN DE GENOTIPOS DE LA MADRE 4 Y PADRE 24 ó 26

MADRE	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES
A1A0	A1A2	A2A0 A1A2	A0A0	A1A0 A2A0 A0A0	A1A2	A2A0 A1A2	A1A2	A2A0 A1A2	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0
B2B0	B1B2	B2B0 B1B2 B1B0 B0B0	B2B0	B2B0 B1B0 B0B0	B2B0	B2B0 B1B2 B1B0 B0B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0
C1C2	C1C2	C1C2 C1C0 C2C0	C1C2	C1C2 C1C0 C2C0	C1C2	C1C2 C1C0 C2C0	C1C2	C1C2 C1C0 C2C0	C1C2	C1C2 C1C0 C2C0
D1D0	D1D2	D1D2 D2D0	D1D2	D1D2 D2D0	D1D2	D1D2 D2D0	D1D2	D1D2 D2D0	D1D2	D1D2 D2D0

CONTINUACIÓN RESUMEN DE GENOTIPOS DE LOS HIJOS DEL CLON 4 Y PADRE 24 ó 26

MADRE	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES
A1A0	A1A2	A2A0 A1A2	A1A2	A2A0 A1A2	A1A0	A1A0 A2A0 A1A2 A0A0
B2B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0	B2B0	B0B0 B1B0 B2B0	B2B0	B0B0 B1B0 B2B0
C1C2	C1C2	C1C2 C1C0 C2C0	C1C2	C1C2 C1C0 C2C0	C1C2	C1C2 C1C0 C2C0
D1D0	D2D0	D2D0 D1D2	D2D0	D2D0 D1D2	D2D0	D2D0 D1D2
	P1?					

RESUMEN DE GENOTIPOS DE LOS HIJOS DEL CLON 4 Y PADRES 3, 11, 22, 23, 30, 361

MADRE	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES
A1A0	A1A2	A2A0 A1A2	A1A2	A2A0 A1A2	A1A2	A2A0 A1A2
B2B0	B1B2	B1B0 B1B2	B1B2	B1B0 B1B2	B1B2	B1B0 B1B2
C1C2	C1C2	C1C2 C1C0 C2C0	C1C2	C1C2 C1C0 C2C0	C1C0	C1C0 C2C0 C0C0
D1D0	D1D0	D1D0 D2D0 D1D2 D0D0	D0D0	D1D0 D2D0 D0D0	D1D0	D1D0 D2D0 D1D2 D0D0
	P1?					Q1 (MENOS EL PADRE 3)

GENOTIPOS DE LOS HIJOS DEL CLON 6

Hijo	Genotipo					RESUMEN GENOTIPOS HIJOS				Nro.Hijos
6.1	A1A2	B2B0	C1C2	D1D0	P1	A1A2	B2B0	C1C2	D1D0	3
6.2	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2		A0A0	B0B0	C1C2	D1D2	11
6.3	A0A0	B0B0	C0C0	D1D2						
6.4	A1A2	B2B0	C1C2	D1D0	P1	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2	2
6.5	A1A2	B2B0	C1C2	D1D0						
6.6	A0A0	B0B0	C0C0	D1D2						
6.7	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2						
6.8	A0A0	B0B0	C0C0	D1D2						
6.9	A0A0	B0B0	C0C0	D1D2						
6.10	A0A0	B0B0	C0C0	D1D2						
6.11	A0A0	B0B0	C0C0	D1D2						
6.12	A0A0	B0B0	C0C0	D1D2						
6.13	A0A0	B0B0	C0C0	D1D2						
6.14	A0A0	B0B0	C0C0	D1D2						
6.15	A0A0	B0B0	C0C0	D1D2						
6.16	A0A0	B0B0	C0C0	D1D2						
6.17	A1A2	B2B0	C1C2	D1D0						
6.18										

ANÁLISIS DE EXCLUSIÓN

MADRE	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES
A2A0	A1A2	A1A0 A1A2	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0
B2B0	B2B0	B2B0 B1B2 B1B0 B0B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0
C2C0	C1C2	C1C0 C1C2	C0C0	C0C0 C1C0 C2C0	C1C2	C1C0 C1C2
D1D0	D1D0	D1D0 D1D2 D0D0	D1D2	D2D0 D1D2	D1D2	D2D0 D1D2
Q1		4, 28, 21, 33, 19		26		24, 26

GENOTIPOS DE LOS HIJOS DEL CLON 19

Hijos	Genotipo			
19.1	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.2	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.3	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.4	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.6	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.8	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.9	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.10	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.11	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.12	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.13	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.14	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.15	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.16	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.17	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.18	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0
19.19	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0

ANÁLISIS DE EXCLUSIÓN

MADRE	HIJOS	PADRES
-------	-------	--------

A1A2	A1A2	A1A0 A1A2 A2A0
------	------	----------------------

B0B0	B0B0	B1B0 B2B0 B0B0
------	------	----------------------

C1C2	C1C2	C1C0 C2C0 C1C2
------	------	----------------------

D1D0	D1D0	D1D0 D2D0 D0D0 D1D2
------	------	------------------------------

4,28,31, 36,37,21,33,19,11,3,26,24,39,5,6,8,17

GENOTIPOS DE LOS HIJOS DEL CLON 23

Hijos	Genotipo				RESUMEN GENOTIPOS HIJOS				Nro. Hijos
23.3	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2					
23.5	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2					
23.6	A0A0	B2B0	C1C2	D1D2					
23.7	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0	12
23.8	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2	8
23.12	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2	A0A0	B2B0	C1C2	D1D2	1
23.13	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2	A2A0	B0B0	C1C2	D1D2	2
23.14	A2A0	B0B0	C1C2	D1D2					
23.15	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2					
23.16	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2					
23.17	A2A0	B0B0	C1C2	D1D2					
23.19	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0					
23.20	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0					
23.21	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0					
23.22	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0					
23.23	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0					
23.24	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0					
23.25	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0					
23.28	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0					
23.29	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0					
23.30	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0					
23.33	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0					
23.34	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0					

ANÁLISIS DE EXCLUSIÓN

MADRE	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES
A2A0	A1A2	A1A0 A1A2	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A2A0	A1A0 A1A2 A2A0 A0A0
B2B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0	B2B0	B2B0 B1B2 B1B0 B0B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0
C2C0	C1C2	C1C0 C1C2	C1C2	C1C0 C1C2	C1C2	C1C0 C1C2	C1C2	C1C0 C1C2
D1D0	D1D0	D0D0 D1D0 D2D0 D1D2	D1D2	D2D0 D1D2	D1D2	D2D0 D1D2	D1D2	D2D0 D1D2
		4, 28, 21, 33, 19		24,26		24, 26		24, 26

GENOTIPOS DE LOS HIJOS DEL CLON 28

Hijos	Genotipo					RESUMEN GENOTIPOS HIJOS					Nro. Hijos	
28.1	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0	Q1							
28.2	A1A2	B0B0	C1C0	D1D0	Q1	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0	Q1		7
28.3	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0	Q1	A1A2	B0B0	C1C0	D1D0	Q1		3
28.4	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0	Q1	A1A2	B1B0	C1C2	D1D0	Q1		5
28.5	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0	Q1	A1A2	B1B0	C2C0	D1D0	Q1		1
28.6	A1A2	B0B0	C1C0	D1D0	Q1	A1A2	B1B0	C1C0	D1D0	Q1		1
28.7	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0	Q1							
28.8	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0	Q1							
28.9	A1A2	B1B0	C1C2	D1D0	Q1							
28.10	A1A2	B1B0	C2C0	D1D0	Q1							
28.11	A1A2	B1B0	C1C2	D1D0	Q1							
28.12	A1A2	B0B0	C1C0	D1D0	Q1							
28.13	A1A2	B1B0	C1C2	D1D0	Q1							
28.14	A1A2	B1B0	C1C0	D1D0	Q1							
28.15	A1A2	B1B0	C1C2	D1D0	Q1							
28.16	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0	Q1							
28.17	A1A2	B1B0	C1C2	D1D0	Q1							
28.18												

ANÁLISIS DE EXCLUSIÓN

MADRE	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES
A1A0	A1A2	A1A2 A2A0	A1A2	A1A2 A2A0	A1A2	A1A2 A2A0	A1A2	A1A2 A2A0	A1A2	A1A2 A2A0
B0B0	B0B0	B1B0 B2B0 B0B0	B0B0	B1B0 B2B0 B0B0	B1B0	B1B0 B1B2	B1B0	B1B0 B1B2	B1B0	B1B0 B1B2
C1C2	C1C2	C1C0 C2C0 C1C2	C1C0	C2C0 C1C0 C0C0	C1C2	C1C0 C2C0 C1C2	C2C0	C1C0 C2C0 C0C0	C1C0	C2C0 C1C0 C0C0
D1D0	D1D0	D1D0 D2D0 D1D2 D0D0	D1D0	D1D0 D2D0 D1D2 D0D0	D1D0	D1D0 D2D0 D1D2 D0D0	D1D0	D1D0 D2D0 D1D2 D0D0	D1D0	D1D0 D2D0 D1D2 D0D0
		37, 21, 33, 19, 11, 3, 26, 24, 39, 5, 6, 8, 17	37, 11, 26, 39, 5, 6, 8, 17	2, 34, 38, 43, 32, 36, 4, 28, 31, 3, 26, 24, 39, 5, 6, 8, 17	7, 32, 36, 31, 26, 39, 5, 6, 8, 17	11, 3, 22, 23, 30, 361				

GENOTIPOS DE LOS HIJOS DEL CLON 30

Hijos	Genotipo				RESUMEN GENOTIPOS HIJOS				Nro. Hijos
30.1	A0A0	B0B0	C1C2	D0D0	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0	1
30.4	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0	10
30.5	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0	10
30.7	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0	A0A0	B0B0	C1C2	D0D0	1
30.8	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0					
30.9	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0					
30.12	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0					
30.13	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0					
30.14	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0					
30.15	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0					
30.16	A0A0	B0B0	C1C2	D1D0					
30.17	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0					

ANÁLISIS DE EXCLUSIÓN

MADRE	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES
A2A0	A1A2	A1A0 A1A2	A0A0	A0A0 A2A0 A1A0	A0A0	A0A0 A2A0 A1A0
B1B2	B1B2	B1B2 B1B0 B2B0	B0B0	?	B0B0	?
C2C0	C1C2	C1C0 C1C2	C1C2	C1C0 C1C2	C1C2	C1C0 C1C2
D1D0	D1D0	D1D0 D2D0 D1D2 D0D0	D1D0	D1D0 D2D0 D1D2 D0D0	D0D0	D0D0 D1D0 D2D0
Q1		4, 28		2, 34, 38, 43, 4, 28, 26, 24,		2, 34, 38, 43, 4, 28, 26

GENOTIPOS DE LOS HIJOS DEL CLON 31

Hijos	Genotipo									Nro. Hijos
31.1	A1A0	B0B0	C1C0	D1D2						
31.2	A0A0	B2B0	C1C0	D1D2						
31.3	HIBRIDO									
31.4	A0A0	B0B0	C1C0	D1D2						
31.5	A0A0	B0B0	C1C0	D1D2						
31.6	A0A0	B0B0	C1C0	D2D0						
31.7	A0A0	B2B0	C1C0	D1D2						
31.8	A1A2	B2B0	C1C2	D1D2						
31.9	A0A0	B0B0	C1C2	D2D0						
31.10	A0A0	B0B0	C1C0	D2D0						
31.12	A0A0	B0B0	C1C0	D2D0						
31.13	HIBRIDO									
31.14	HIBRIDO									
31.15	HIBRIDO									
31.16	A0A0	B0B0	C1C0	D2D0						
31.17	HIBRIDO									
31.18	HIBRIDO									
31.19	HIBRIDO									
31.20	HIBRIDO									
31.21	A0A0	B0B0	C1C2	D1D2						
31.22	A1A2	B2B0	C1C2	D1D2						
31.23	A1A2	B2B0	C1C2	D1D2						
1a	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0	P1					
1b	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0	P1					
2a	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0	P1Q					
2b	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0	P1					
3a	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0						
3b	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0	P1					
3c	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0						
4a	A1A2	B0B0	C1C2	D1D0						
4b	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0	P1					
5a	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0	P1					
5b	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0	P1					
6a	A1A2	B1B2	C1C2	D1D0	P1					

RESUMEN GENOTIPOS HIJOS

A1A0	B0B0	C1C0	D1D2
A0A0	B2B0	C1C0	D1D2
A0A0	B0B0	C1C0	D1D2
A0A0	B0B0	C1C0	D2D0
A1A2	B2B0	C1C0	D2D0
A0A0	B0B0	C1C2	D2D0
A0A0	B0B0	C1C2	D1D2
A1A2	B2B0	C1C2	D1D2
A1A2	B1B2	C1C2	D1D0
A1A2	B0B0	C1C2	D1D0

P1

ANÁLISIS DE EXCLUSIÓN PARA LOS HIJOS DEL CLON 31

MADRE	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES
A1A0	A1A0	A1A0 A2A0 A1A2 A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0 A1A0 A2A0	A1A2 A2A0 A1A2	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0 A1A0 A2A0
B2B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0	B2B0 B1B0 B1B2 B0B0	B2B0 B1B0 B1B2 B0B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0	B0B0 B1B0 B2B0	B0B0 B1B0 B2B0	B2B0 B2B0 B1B0 B1B2 B0B0	B0B0 B1B0 B2B0	B0B0 B1B0 B2B0	B0B0 B1B0 B2B0
C2C0	C1C0	C1C0 C1C2	C1C0 C1C2	C1C0 C1C2	C1C0	C1C0 C1C2	C1C0 C1C2	C1C0 C1C2	C1C0 C1C2	C1C0 C1C2	C1C2	C1C0 C1C2
D1D0	D1D2	D1D2 D2D0	D1D2 D2D0	D1D2 D2D0	D1D2	D1D2 D2D0	D2D0 D1D2 D2D0	D1D2 D2D0	D2D0 D1D2 D2D0	D1D2 D2D0	D2D0	D1D2 D2D0
P1		24, 26	24, 26	24, 26		24, 26		24, 26			P1	24, 26

MADRE	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES
A1A0	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A1A2 A2A0 A1A2	A2A0 A1A2	A1A2 A2A0 A1A2	A2A0 A1A2	A1A2 A2A0 A1A2	A2A0 A1A2
B2B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0	B2B0 B1B0 B1B2 B0B0	B2B0 B1B0 B1B2 B0B0	B1B2 B1B0 B1B2	B1B0 B1B2	B0B0 B0B0 B1B0 B2B0	B0B0 B1B0 B2B0
C2C0	C1C2	C1C0 C1C2	C1C2 C1C0 C1C2	C1C0 C1C2	C1C2 C1C0 C1C2	C1C0 C1C2	C1C2 C1C0 C1C2	C1C0 C1C2
D1D0	D1D2	D1D2 D2D0	D1D2 D2D0	D1D2 D2D0	D1D0 D1D2 D2D0 D0D0	D1D0 D1D2 D2D0 D0D0	D1D0 D1D2 D2D0 D0D0	D1D0 D1D2 D2D0 D0D0
P1		24, 26	24, 26	24, 26	3	21, 33, 19, 3, 26, 24,		

CONTINUACUÓN DEL ANÁLISIS DE EXCLUSIÓN PARA EL CLON 31

MADRE	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES	HIJOS	PADRES
A1A0	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A0A0	A0A0 A1A0 A2A0	A1A2	A2A0 A1A2
B0B0	B2B0	B2B0 B1B2	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0	B0B0	B0B0 B1B0 B2B0
C2C0	C1C2	C1C0 C1C2	C2C0	C2C0 C1C2 C0C0 C1C0	C2C0	C2C0 C1C2 C0C0 C1C0
D1D0	D1D2	D2D0 D1D2	D1D2	D2D0 D1D2	D1D2	D2D0 D1D2
Q1		26		24, 26		24, 26

ANEXO 8

RESUMEN DE LOS PADRES POR HIJO PARA EL PRIMER 30

Hijos/2	Padre c/p. 30	Hijos/3	Padre c/p. 30	Hijos/4	Padre c/p. 30
2.2	22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17	3.11	4, 31	4.5	24, 26
2.3	4, 28, 3, 24	3.33	4, 31	4.6	24, 26
2.4	22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17	3.34	4, 31	4.7	24, 26
2.5	22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17	3.35	4, 31	4.8	26
2.6	hibrido	3.36	4, 31	4.9	26
2.9		3.37		4.10	24, 26
2.10	22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17	3.38	4, 31	4.11	24, 26
2.12	4, 31, 17, 26, 22, 23, 30, 361, 39, 5, 6, 8	3.39		4.12	24, 26
2.18	22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17	3.40	4, 31	4.13	24, 26
2.21	hibrido	3.41		4.14	24, 26
2.14	4, 31	3.42	4, 31	4.15	24, 26
2.17	4, 31, 22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17	3.43	4, 31	4.16	24, 26
2.19	19, 3, 24, 5, 6, 8, 17	3.44	4, 31	4.17	24, 26
2.20	36, 4, 28, 31, 3, 24, 5, 6, 8, 1	3.45	31, 26, 22, 23, 30, 361, 39, 5, 6, 8, 17	4.18	24, 26
2.26	4, 31, 22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17	3.46	31, 26, 22, 23, 30, 361, 39, 5, 6, 8, 17	4.19	24, 26
2.27	4, 31, 22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17	3.48	31, 26, 22, 23, 30, 361, 39, 5, 6, 8, 17	4.20	24, 26
2.28	4, 31, 22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17	3.49	31, 26, 22, 23, 30, 361, 39, 5, 6, 8, 17	4.21	24, 26
2.30	4, 31, 22, 23, 30, 361, 5, 6, 8, 17	3.50	4, 31	4.22	
		3.51	4, 31	4.23	3, 11, 22, 23, 30, 361
		3.52	4, 31	4.24	24, 26
		3.53	4, 31	4.25	24, 26
		3.54	4, 31	4.26	3, 11, 22, 23, 30, 361
		3.55	4, 31	4.27	3, 11, 22, 23, 30, 361
		3.56	4, 31	4.28	3, 11, 22, 23, 30, 361
		3.57		4.29	11, 22, 23, 30, 361
		3.58	4, 31	4.30	3, 11, 22, 23, 30, 361
		3.59	26	4.31	3, 11, 22, 23, 30, 361
		3.60		4.32	26
		3.61	26	4.33	3, 11, 22, 23, 30, 361
		3.62	4, 31	4.34	
		3.63		4.35	26
		3.64	4, 31	4.36	26
		3.65		4.37	24, 26
		3.66		4.38	24, 26
		3.67	4, 31	4.39	3, 11, 22, 23, 30, 361
				4.40	24, 26

CONTINUACIÓN DEL RESUMEN DE LOS PADRES POR HIJO CON EL PRIMER 30

Hijos/6	Padre c/p. 30	Hijos/19	Padre c/p. 30	Hijos/23	Padre c/p.30
6.1	4, 28, 21, 33, 19	19.1	4,28,31, 36,37,21,33,19,11,3,26,24,39,5,6,8,17	23.1	
6.2	24, 26	19.2		23.2	
6.3	26	19.3		23.3	24, 26
6.4	4, 28, 21, 33, 19	19.4		23.4	
6.5	4, 28, 21, 33, 19	19.6		23.5	24, 26
6.6	26	19.8		23.6	24, 26
6.7	24, 26	19.9		23.7	24, 26
6.8	26	19.10		23.8	24, 26
6.9	26	19.11		23.9	
6.10	26	19.12		23.10	
6.11	26	19.13		23.11	
6.12	26	19.14		23.12	24, 26
6.13	26	19.15		23.13	24, 26
6.14	26	19.16		23.14	24, 26
6.15	26	19.17		23.15	24, 26
6.16	26	19.18		23.16	24, 26
6.17	4, 28, 21, 33, 19	19.19		23.17	24, 26
6.18				23.18	
				23.19	4, 28, 21, 33, 19
				23.20	4, 28, 21, 33, 19
				23.21	4, 28, 21, 33, 19
				23.22	4, 28, 21, 33, 19
				23.23	4, 28, 21, 33, 19
				23.24	4, 28, 21, 33, 19
				23.25	4, 28, 21, 33, 19
				23.26	
				23.27	
				23.28	4, 28, 21, 33, 19
				23.29	4, 28, 21, 33, 19
				23.30	4, 28, 21, 33, 19
				23.31	
				23.32	
				23.33	4, 28, 21, 33, 19
				23.34	4, 28, 21, 33, 19
				23.35	
				23.36	

ANEXO 9

GENOTIPOS DE LOS HIJOS CON PRIMER 4 Y LOS POSIBLES PADRES

Madre	Hijo	Genotip/Padre	Hijo	Genotip/Padre	Hijo	Genotip/Padre	Hijo	Genotip/Padre	Hijo	Genotip/Padre
3	3.33		3.45		3.46		3.50		3.62	
A1A5	A1A5	A0A1	A1A5	A0A1					A5A5	A1A5
		A1A1		A1A1						A4A5
		A1A2		A1A2						A5A5
		A1A4		A1A4						
		A1A5		A1A5						
		A4A5		A4A5						
		A5A5		A5A5						
B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1
		B1B2		B1B2		B1B2		B1B2		B1B2
PADRES		23, 3, 4, 5, 26, 31, 361, 6, 7, 8, 22, 21, 28, 17, 33, 2, 38, 30, 32, 34, 36		23, 3, 4, 5, 26, 31, 361, 6, 7, 8, 22, 21, 28, 17, 33, 2, 38, 30, 32, 34, 36		TODOS- 24		TODOS- 24		3, 21, 26, 28 23, 17 31, 33 2, 38 30, 32, 34, 36
4	4.6		4.14		4.18		4.19		4.23	
A1A4	A1A1	A1A1			A4A5	A1A5	A4A5	A1A5	A4A5	A1A5
		A1A2				A4A5		A4A5		A4A5
		A1A5				A5A5		A5A5		A5A5
		A1A4								
		A1A0								
B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1
		B1B2		B1B2		B1B2		B1B2		B1B2
PADRES		23 5, 31, 361 6, 7 8, 22 4 3, 21, 26, 28 17		TODOS- 24		3, 21, 26, 28 23, 17 31, 33 2, 38 30, 32, 34, 36		3, 21, 26, 28 17, 31 23, 33 2, 38 30, 32, 34, 36		3, 21, 26, 28 17, 31 23, 33 2, 38 30, 32, 34, 36
4	4.24		4.28		4.32		4.35			
A1A4	A4A5	A1A5	A4A5	A1A5	A1A1	A1A0				
		A4A5		A4A5		A1A1				
		A5A5		A5A5		A1A2				
						A1A5				
						A1A4				
B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1	B1B1
		B1B2		B1B2		B1B2		B1B2		B1B2
PADRES		3, 21, 26, 28 17, 31 23, 33 2, 38 30, 32, 34, 36		3, 21, 26, 28 17, 31 23, 33 2, 38 30, 32, 34, 36		23 5, 31, 361 23, 6, 7 8, 22 4 3, 21, 26, 28 17		TODOS- 24		

CONTINUACIÓN GENOTIPOS DE LA MADRE E HIJO DEL CLON 6 CON PRIMER 4

MADRE	HIJO	GENOTIP/PADRE	HIJO	GENOTIP/PADRE	HIJO	GENOTIP/PADRE	HIJO	GENOTIP/PADRE	HIJO	GENOTIP/PADRE
6	6.1		6.2		6.4		6.7		6.16	
A1A2	A1A1	A1A0 A1A1 A1A2 A1A4 A1A5							A1A2	A1A0 A1A1 A1A2 A1A4 A1A5 A2A3
B1B1	B1B1	B1B1 B1B2 23	B2B2	B1B2 B2B2 11	B1B2	B1B2 B2B2 11	B1B2	B1B2 B2B2 11	B1B1	B1B1 B1B2 37
PADRES		5, 31, 361 6, 7 8, 22 4 3, 21, 26, 28 17		8, 22 17 24 43 39 2, 38		8, 22 17 24 43 39 2, 38		8, 22 17 24 43 39 2, 38		5, 361 6, 7 8, 22 4 3, 21, 23, 26, 28, 31 17, 43

MADRES	HIJO	GENOTIP/PADRE
6	6.17	
A1A2		
B1B1	B1B2	B1B2 B2B2 11
PADRES		8, 22 17 24 43 39 2, 38

CONTINUACIÓN DE LOS GENOTIPOS DE CLON 23

MADRE	HIJO	PADRES	HIJO	PADRES	HIJO	PADRES	HIJO	PADRES	HIJO	PADRES
23	23.3		23.5		23.6		23.7		23.14	
A1A5	A5A5	A1A5 A4A5 A5A5	A1A5	A1A1 A1A2 A1A4 A1A5 A4A5 A5A5	A1A1	A1A0 A1A1 A1A2 A1A4 A1A5	A5A5	A1A5 A4A5 A5A5	A5A5	A1A5 A4A5 A5A5
B1B1	B1B1	B1B1 B1B2	B1B1	B1B1 B1B2	B1B1	B1B1 B1B2	B1B1	B1B1 B1B2	B1B1	B1B1 B1B2
PADRES		3, 21, 23, 26, 28 17 31, 33 2, 38 30, 32, 34, 36		5, 31, 361 6, 7, 8, 22 8, 22 3, 21, 23, 26, 28 4, 17, 33 2, 38 30, 32, 34, 36		5, 31, 361 6, 7 8, 22 4, 3 21, 23, 26, 28 17		3, 21, 23, 26, 28 17, 31 33 2, 38 30, 32, 34, 36		3, 21, 23, 26, 28 17, 31 33 2, 38 30, 32, 34, 36

MADRE	HIJO	PADRES	HIJO	PADRES	HIJO	PADRES	HIJO	PADRES	HIJO	PADRES
23	23.15		23.17		23.23		23.21		23.22	
A1A5					A5A5	A1A5 A4A5 A5A5				
B1B1	B1B2	B1B2 B2B2	B1B2	B1B2 B2B2	B1B1	B1B1 B1B2	B1B1	B1B1 B1B2	B1B1	B1B1 B1B2
PADRES		11 8, 22 17 24 43 39 2, 38		11 8, 22 17 24 43 39 2, 38		3, 21, 23, 26, 28 17, 31 33 2, 38 30, 32, 34, 36		TODOS- 24		TODOS- 24

MADRE	HIJO	PADRES
23	23.25	
A1A5		
B1B1	B1B1	B1B1 B1B2
PADRES		TODOS- 24

GENOTIPOS DE LOS HIJOS DEL CLON 28 CON PRIMER 4

MADRES	HIJO	PADRES	HIJO	PADRES	HIJO	PADRES	HIJO	PADRES	HIJO	PADRES
28	28.1		28.2		28.3		28.4		28.8	
A1A5	A1A1	A1A0 A1A1 A1A2 A1A4 A1A5					A1A1	A1A0 A1A1 A1A2 A1A4 A1A5	A5A5	A1A5 A4A5 A5A5
B1B1	B1B1	B1B1 B1B2	B1B1	B1B1 B1B2	B1B1	B1B1 B1B2	B1B1	B1B1 B1B2	B1B1	B1B1 B1B2
PADRES		5, 31, 361 6, 7 8, 22 4, 3 21, 23, 26, 28 17		37, 11		37, 11		5, 31, 361 6, 7 8, 22 4, 3 21, 23, 26, 28 17		3, 21, 23, 26, 28 31, 17 33 2, 38 30, 32, 34, 36

MADRE	HIJO	PADRES
28	28.7	A1A5
A1A5	A5A5	A4A5 A5A5
B1B1	B1B1	B1B1 B1B2
PADRES		3, 21, 23, 26, 28 31, 17 33 2, 38 30, 32, 34, 36

GENOTIPOS DE LOS HIJOS DEL CLON 30 CON PRIMER 4

MADRE	HIJO	PADRE	HIJO	PADRE
30	30.1		30.12	
A5A5	A5A5	A5A5	A5A5	A5A5
B1B1	B1B1	B1B2 B2B2	B1B2	B1B2 B2B2
PADRES		2, 38		2, 38

Madre	Hijo	Genot/Padre	Hijo	Genot/Padre								
31	31.1		31.4		31.6		31.7		31.8			
A1A5							A2A5	A1A2 A2A3				
B1B1	B1B2	B1B2 B2B2 11 8, 22 17 24 43 39 2, 38										

Madre	Hijo	Genot/Padre	Hijo	Genot/Padre	Hijo	Genot/Padre	Hijo	Genot/Padre	Hijo	Genot/Padre	Hijo	Genot/Padre
31	31.9		3a		5a		4b		31.21		31.23	
A1A5			A5A5	A1A5 A4A5 A5A5			A5A5	A1A5 A4A5 A5A5				
B1B1	B1B2	B1B2 B2B2 11 8, 22 17 24 43 39 2, 38	B1B1	B1B1 B1B2 3, 21, 23, 17 33 2, 38 30, 32, 34, 36 26, 28, 31	B1B1	B1B1 B1B2 TODOS- 24	B1B1	B1B1 B1B2 3, 21, 23, 17 33 2, 38 30, 32, 34, 36 26, 28, 31	B1B2	B1B2 B2B2 11 8, 22 17 24 43 39 2, 38	B1B2	B1B2 B2B2 11 8, 22 17 24 43 39 2, 38

ANEXO 10

FLORACION TEMPORADA OCT-99 A DIC-99 POR BLOQUE Y POR CLON

Bloques	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Clones	17	6	36-	30	2	6	31	19	8	31	36	36-	4	23	6	37	23	36-1	30	4	26
	19	7	36	8	31	26	8	37	6		30	31	31	36-	37	28	30	30	36	26	37
	26	23	6	6	3	19	3	36	19		34	23	38	4	36	36	19		19	19	31
	31	26	4	23	19	30	7	2	4		39	32	8		4	38	26		11	38	
	33	30	38	36-	23	28	36	6	7		24	2	28		30	31	28		4	24	
	30	31		38	36-1		39	4	24		4	26			38				26	6	
	34	36-1		26	37		32	26	34		6	4			36-1				32		
		39		11	22		17	31	2		31	28			34				2		
		36		31	6		4	23			7	33			33				38		
		34		36	36		23												37		
		37		24	28		36-1														
				19	30		30														
				4			34														

Bloques	23	24	25	26	27	28	29	30	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Clones	4	34	28	26	33	33	11	23	36	6	38	31	21	4	26	2	21	7	31	32	22
	36	26	17	23	4	19	19	4	33	33	19	28	6	30	6	30	30	19	26	21	7
	6	32	36		3	7	23	28			7	5	5	24	4	5	36-	30	7	30	24
	11	7			19	36-	36				31	36	2		37	6	32	4	36		26
	28	36			32	28	36-1				36	30	3		30		6	32	32		31
	7	3			36	2	28				24	6	24		36			31	36-1		2
		31			31	17	37					2	33		7						6
		6			30							36-	8		17						3
		37			36-1							24	30		36-1						30
		30			37							26	4								
		28										23									
												34									
												7									
												17									

Bloques	45	46	47	48	49	50	52	53	54	55	56
Clones	31	36-1	21	4	7	7	4	21	31	4	7
	30	3	6	24	31	11	36	43		31	
	7	36	23	36	36	36-	8			24	
	28	21	11	32	21						
	26			7	11						
	36-1			38							
	32										
	33										
	36										
	11										

ANEXO 11

**ANÁLISIS DE CHI-CUADRADO PARA EVALUAR LA HETEROGENEIDAD DE LA NUBE DE
POLEN**

Observed vs. Expected Frequencies (florac.sta)

Chi-Square = 105.5000 df = 26 p < .000000

NOTE: Unequal sums of obs. & exp. frequencies

Clon	observed VAR2	expected VAR3	O - E	(O-E)**2/E
2	10	12	-2	0,333333343
3	7	12	-5	2,083333254
4	22	12	10	8,333333015
5	3	12	-9	6,75
6	20	12	8	5,333333492
7	18	12	6	3
8	6	12	-6	3
11	8	12	-4	1,333333373
17	6	12	-6	3
19	14	12	2	0,333333343
21	7	12	-5	2,083333254
22	2	12	-10	8,333333015
23	13	12	1	0,083333336
24	11	12	-1	0,083333336
26	16	12	4	1,333333373
28	14	12	2	0,333333343
30	23	12	11	10,08333302
31	23	12	11	10,08333302
32	11	12	-1	0,083333336
33	9	12	-3	0,75
34	9	12	-3	0,75
36	26	12	14	16,33333397
37	12	12	0	0
361	19	12	7	4,083333492
38	9	12	-3	0,75
39	3	12	-9	6,75
40	0			
41	0			
43	1	12	-11	10,08333302
46	0			
53	0			
54	0			
58	0			
Total	322	324	-2	105,5