

T 8 110

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ESTUDIO DE MARCADORES GENÉTICOS EN
CHIRIMOYO Y SU APLICACIÓN A LA
IDENTIFICACIÓN VARIETAL.
EVALUACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS

TESIS DOCTORAL

FRANCISCO PERFECTI ÁLVAREZ

PROV T-15/51

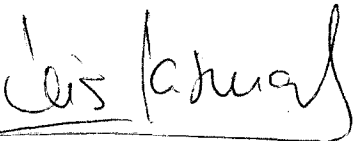
UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 3-2-95
ENTRADA NUM. ... 468

**ESTUDIO DE MARCADORES GENÉTICOS EN
CHIRIMOYO Y SU APLICACIÓN A LA
IDENTIFICACIÓN VARIETAL.
EVALUACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS**

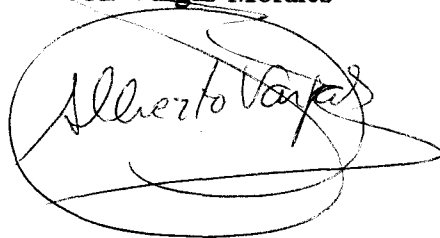
Memoria que presenta el licenciado Francisco Perfectti Álvarez
para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de:

Dr. L. Pascual Reguera



Dr. A. Vargas Morales



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
61993720
1/1/1995

Ldo. Francisco Perfectti Álvarez
aspirante al grado de Doctor



Granada Enero 1995



ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción	1
1.1 El chirimoyo	3
Breve descripción botánica	4
Origen y expansión del cultivo	7
Principales cultivares	8
Identificación de cultivares de chirimoyo	8
1.2 Electroforesis de isoenzimas	10
Principios generales y definiciones	10
Interpretación de los patrones isoenzimáticos	11
Principales ventajas e inconvenientes	12
Utilización de las isoenzimas en horticultura	13
1.3 Banco de germoplasma	15
1.4 Objetivos	17
Capítulo 2. Material y métodos	19
2.1 Material	21
2.2 Métodos	31
Recogida de material y almacenaje	31
Hojas	31
Flores	31
Semillas	31
Extracción y homogeneización	32
Electroforesis	33
Electroforesis en geles de almidón	33
Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	36
Tinción	37
ACPH	37
ADH	37

DIA	37
GDH	38
GOT	38
IDH	38
MDH	39
ME	39
6-PGDH	39
PGI	40
PGM	40
SKDH	40
SOD	41
TPI	41
Nomenclatura	42
Análisis de progenies	42
<i>Segregación mendeliana</i>	42
<i>Ligamiento</i>	43
<i>Cálculo de los parámetros de diversidad</i>	44
<i>Cálculo de las distancias genéticas entre cultivares</i>	46
<i>Visualización de la matriz de distancias</i>	47
<i>Concordancia entre matrices</i>	48
<i>Construcción del dendrograma</i>	48
<i>Análisis factorial</i>	48
<i>Análisis factorial de correspondencias</i>	48
<i>Análisis discriminante</i>	49
<i>Análisis de las relaciones entre los datos agronómicos y</i> <i>los isoenzimáticos</i>	49
<i>Análisis de matrices de distancias</i>	51
<i>Análisis de regresión</i>	51

<i>Estadísticos simples</i>	52
<i>Capítulo 3. Resultados</i>	53
3.1 <i>Interpretación de los zimogramas</i>	56
ACPH. <i>Fosfatasas ácidas</i>	56
ADH. <i>Alcohol deshidrogenasa</i>	57
DIA. <i>Diaforasa</i>	60
GDH. <i>Glutamato deshidrogenasa</i>	61
GOT. <i>Glutamato oxalacetato transaminasa</i>	63
IDH. <i>Isocitrato deshidrogenasa</i>	67
MDH. <i>Malato deshidrogenasa</i>	70
ME. <i>Enzima málico</i>	73
6-PGDH. <i>6-Fosfogluconato deshidrogenasa</i>	75
PGI. <i>Fosfoglucosa isomerasa</i>	76
PGM. <i>Fosfoglucomutasa</i>	79
SKDH. <i>Siquimato deshidrogenasa</i>	83
SOD. <i>Soperóxido dismutasa</i>	85
TPI. <i>Triosas fosfato isomerasa</i>	88
<i>Expresión tisular de las isoenzimas</i>	93
3.2 <i>Ligamiento</i>	95
<i>Adh-1/Idh-2</i>	100
<i>Adh-1/Mdh-1</i>	100
<i>Adh-1/Skd-1</i>	101
<i>Adh-1/Tpi-1</i>	101
<i>Adh-1/Tpi-2</i>	101
<i>Got-1/Pgi-1</i>	102
<i>Got-1/Pgm-2</i>	102
<i>Got-1/Tpi-2</i>	103
<i>Got-2/Mdh-1</i>	103

<i>Idh-2/Me-1</i>	103
<i>Idh-2/Tpi-2</i>	103
<i>Pgi-1/Pgm-2</i>	104
<i>Pgm-1/Pgm-2</i>	104
3.3 <i>Tablas de genotipos e identificación de cultivares</i>	106
3.4 <i>Frecuencias alélicas</i>	118
3.5 <i>Diversidad</i>	124
<i>Nº alelos/locus</i>	124
<i>Pollimorfismo</i>	126
<i>Diversidad genética</i>	127
<i>Heterocigosidad observada</i>	128
<i>Distribución de la diversidad</i>	135
3.6 <i>Distancias genéticas y dendrograma</i>	137
<i>Distancias χ^2</i>	137
<i>Relaciones entre procedencias</i>	140
<i>Dendrograma</i>	147
3.7 <i>Análisis factorial</i>	149
<i>Análisis factorial de correspondencias</i>	140
<i>Análisis discriminante</i>	154
3.8 <i>Relaciones entre isoenzimas y datos agronómicos</i>	158
<i>Relaciones globales. Estadístico de Mantel</i>	158
<i>Análisis de regresión</i>	160
<i>Peso del fruto</i>	161
<i>Porcentaje de piel en el fruto</i>	163
<i>Porcentaje de corazón en el fruto</i>	165
<i>Porcentaje de pulpa en el fruto</i>	166
<i>Porcentaje de semillas en el fruto</i>	168
<i>Índice de semilla</i>	169

<i>Peso de una semilla</i>	170
<i>Carácter de la semilla</i>	171
<i>Resistencia al penetrómetro</i>	172
<i>Porcentaje de frutos atacados por Ceratitis</i>	174
<i>Grados Brix de la pulpa</i>	175
<i>Sabor</i>	176
<i>Epidermis</i>	178
<i>HAL</i>	180
<i>HES</i>	181
<i>GES</i>	182
<i>Heterocigosidad</i>	183
3.9 <i>Los cultivares de Ecuador y Perú</i>	184
Capítulo 4. <i>Discusión</i>	193
4.1 <i>Sistemas isoenzimáticos e identificación varietal</i>	196
4.2 <i>Análisis de progenies</i>	199
<i>Segregaciones no mendelianas</i>	199
<i>Ligamiento</i>	201
4.3 <i>Relaciones entre cultivares</i>	204
4.4 <i>Diversidad</i>	207
<i>Polimorfismo</i>	207
<i>Riqueza alélica</i>	208
<i>Diversidad genética</i>	211
<i>Distribución de la diversidad</i>	213
<i>Heterocigosidad observada</i>	216
4.5 <i>Relaciones entre datos isoenzimáticos y agronómicos</i>	217
Capítulo 5. <i>Conclusiones</i>	221
Capítulo 6. <i>Referencias bibliográficas</i>	225
Anexos	249

ABREVIATURAS

6PGDH. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa
 ACPH. Fosfatasa ácida
 ADH. Alcohol deshidrogenasa
 AFC. Análisis factorial de correspondencias
 B1. Bolivia seedling # 1
 B2. Bolivia seedling # 2
 B3. Bolivia seedling # 3
 BA. Bays
 BH. Booth
 CA. Campas
 CL. Chilena
 CM. Campas mejorada
 CR. Corazón
 CU. Cumbe
 cv. Cultivar
 DCPIP. Dicloro fenol indofenol
 DHAP. Dihidroxiacetona fosfato
 DIA. Diaforasa
 EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético
 EM. Espinosa M
 FI. Pino de Jete
 G3PDH. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
 G6PDH. Glucosa 6-fosfato isomerasa
 GDE. Glutamato deshidrogenasa
 GOT. Glutamato oxalacetato transaminasa
 IDE. Isocitrato deshidrogenasa
 LAP. Leucil amino peptidasa
 MA. Manteca
 MDH. Malato deshidrogenasa
 ME. Enzima málico
 MTF. Bromuro de dimetiltiazoldifenil tetrazolium
 NAD. Dinucleótido de adenina y nicotinamida
 NADH. Dinucleótido de adenina y nicotinamida, forma reducida
 NADP. Fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida
 NADPH. Fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida, forma reducida
 NBT. Azul de nitro tetrazolium
 NE. Negrito
 P410-16. Perú 410-16
 P78. Selección Perú 78
 PAGE. Electroforesis en geles de poliacrilamida
 PC. Pinchudo
 PGI. Fosfoglucona isomerasa
 PGM. Fosfoglucona mutasa
 PMS. Metasulfato de fenazina
 PÑ. Piña
 PVP-40. Polivinil pirrolidona
 S-ME. S-Mercaptoetanol
 SA. Salmón
 SKDH. Siquimato deshidrogenasa
 SOD. Superóxido dismutasa
 TEMED. N N N'N'- Tetrametiletildiamina
 TO. Tetrazolium oxidasa
 TPI. Triosas fosfato isomerasa
 WH. White

Capítulo 1
Introducción



□ CAPÍTULO PRIMERO □

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CHIRIMOYO.

El chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) es un árbol que produce una fruta muy apreciada: la chirimoya ("la obra maestra de la naturaleza", Popenoe, 1921). Esta especie pertenece al orden Ranales, suborden Magnolíneas y a la familia de las Anonáceas. Esta familia, la mayor de las primitivas familias de plantas con flores, está compuesta por aproximadamente 130 géneros y 2000 especies (Norman, et al. 1992). La mayoría de estas especies son tropicales, aunque algunas como el chirimoyo se consideran más bien como subtropicales. Todas se caracterizan por el arreglo espiral de los estambres y carpelos y por tener semilla con endospermo ruminado. El género *Annona* (latín: "la cosecha es anual") comprende unas 110 especies (Kessler, 1987), la mayoría nativas de América Central y del Sur (Schroeder, 1945), algunas de las cuales producen frutos comestibles. En general las especies del género *Annona* son árboles de tamaño mediano a grande, de entre 2 y 5 m. de altura (Thakur & Singh, 1967).

Otras especies relacionadas son:

- la chirimoya de los pantanos (*Annona glabra*) nativa del sur de Florida, la región caribeña y Brasil (Fouqué, 1972). Árbol siempre verde de tamaño medio (Thakur & Singh, 1967). Aunque el fruto es aromático no tiene buen sabor (Sanewski, 1988).

- el anón o anona blanca (*Annona squamosa* L.). Procede de las tierras bajas de la América tropical y las Antillas (Fouqué, 1972) y se cultiva comercialmente en Centro América, Florida, Egipto, India y en el Sudeste asiático (Sanewski, 1988). El árbol es de pequeño tamaño

4 *Capítulo primero. Introducción*

(aproximadamente 3 m.) y produce un fruto de menor tamaño que la chirimoya, de aspecto parecido y calidad inferior (Sanewski, 1988). Con dos variedades, verde y roja, según el color del fruto.

- Ylama o ilama (*A. diversifolia*) originaria de los montes de la costa Oeste de Méjico y Salvador (Fouqué, 1972). El árbol es muy similar al de la chirimoya.

y otras como la guanábana (*Annona muricata*), anona colorada (*Annona reticulata*), , guanábana tosete (*Annona purpurea*), la pawpaw (*Asimina triloba*) que crece en los valles del río Misisipí y en Florida, etc. Algunas de estas especies, al igual que el chirimoyo, tienen interés comercial y son cultivadas en diferentes países (González, 1991; Ibar, 1979). Se han conseguido híbridos de interés comercial entre algunas especies de este género (*A. cherimola*, *A. squamosa* y *A. reticulata*) (Fairchild, 1990), entre los que destaca la atemoya (*A. squamosa* x *A. cherimola*) que se ha obtenido en cruces controlados desde 1908 (Wester, 1915).

Breve descripción botánica.

El árbol de la chirimoya rara vez sobrepasa los 10 metros de altura (Sanewski, 1988) mostrando una copa redondeada sustentada por un tronco cilíndrico de corteza gruesa y verdosa. Las hojas son simples, enteras y lisas, de entre 10 a 25 cm. de tamaño, que se sitúan en forma alterna y opuesta en el tallo. Su color abarca del verde brillante al oscuro. Tienen forma oblongo-lanceolada y el envés pubescente. El peciolo oculta a las yemas de la próxima brotación. El árbol se comporta como semidecíduo, perdiendo parcialmente las hojas durante la estación fría (Cervantes, 1968).

La flor, de color amarillo verdoso, no es muy aparente, pero sí aromática. Es hermafrodita, mostrando el tálamo numerosos carpelos (70 - 300) dispuestos helicoidalmente y de 150 a 200 estambres en igual disposición (Ibar, 1979). Muestra tres diminutos sépalos y seis pétalos, tres de ellos atróficos en forma de escama y los restantes de 1,9 a 5 cm. de longitud y con forma piramidal alargada (González, 1991). El gineceo, sincárpico y unilocular consta de un elevado número de carpelos concrecentes y monoespermos, que presentan la particularidad de fecundarse independientemente.

La flor muestra protoginia (Thompson, 1970), es decir, los carpelos maduran sexualmente antes que los estambres (este es un mecanismo para

prevenir la autopolinización). Con lo que se produce una primera fase hembra y una posterior fase macho en la flor (Kahn et al, 1991), en un proceso que puede dividirse en los siguientes acontecimientos (Guirado Sánchez, 1992):

* Flor cerrada. Puede permanecer así de 10 a 15 días.

* La flor empieza a abrirse separando las puntas de los pétalos, pero no sus bases. Los estigmas son receptivos, pero al estar protegidos, no pueden ser alcanzados por el polen que porta el agente polinizador. A este estado, que puede durar de 5 a 20 horas, se le conoce como *prehembra*.

* Seguidamente la flor alcanza el estado de *hembra*, estando los pétalos más separados y permitiendo el acceso de los polinizadores a los estigmas. La flor permanece en este estado alrededor de 26 horas.

* Posteriormente los pétalos se abren y es entonces cuando se separan los estambres y sueltan el polen. En este momento se dice que la flor está en la fase *macho*.

* Al final, la flor queda con los estambres totalmente sueltos, que irán cayendo, y el polen liberado, apareciendo los pétalos flácidos.

La polinización del chirimoyo en la Costa del Sol parece ser debida a un insecto del género *Orius*, de los denominados "chinchas de las flores" (Hermoso et al., 1990). Este insecto se introduce en la flor para buscar alimento y como refugio a condiciones climáticas adversas (González, 1991).

El fruto es un sincarpio formado por la fusión de los pistilos maduros con el receptáculo carnoso. Cada pistilo, si es fecundado, contendrá una semilla de color oscuro y forma ovalada, que tornará a marrón una vez seca. Si el óvulo no es fecundado no se desarrolla la semilla y el carpelo tiende a contraerse, produciendo frutos malformados (Schroeder, 1951).

Los frutos, de un tamaño habitual entre 150 y 1000 g., tienen forma acorazonada, pero esta forma varía bastante, dándose frutos desde redondos a oblongos (González, 1991; Ibar, 1971). Estos son de color verde claro a verde oscuro, tomando algunos una ligera tonalidad amarilla.

La chirimoya presenta una apariencia exterior típica en placas o aureolas, formadas por los restos de los tejidos que rodean a los pistilos cuando estos se fusionan para dar el sincarpio. La apariencia morfológica del fruto se ha utilizado para establecer una clasificación botánica de las variedades de chirimoyo (Bayley, 1914; Schroeder, 1951), encontrándose hasta cinco tipos

6 Capítulo primero. Introducción

diferentes:

Laevis. Carece de protuberancias o indentaciones, manteniendo una piel lisa.

Impressa. El fruto posee aureolas que delimitan superficies ligeramente cóncavas. Son frutos de forma arriñonada o acorazonada.

Umbonata. Con la piel reticulada y protuberancias pequeñas generalmente situadas en el centro de la aureola.

Mamillata. Con la piel muy reticulada y con acusadas protuberancias que casi desaparecen en la madurez, quedando la piel lisa en la parte media y distal del fruto, mientras que en la parte basal, la cercana al pedúnculo, presenta la piel marcada y con "tetillas". El fruto recuerda la forma de una piña.

Tuberculata. Piel fuertemente reticulada y con marcadas protuberancias.

Sin embargo, la morfología del fruto no parece constituir un sistema de clasificación apropiado, ya que es un carácter que no permanece constante en un mismo cultivar, e incluso ni siquiera dentro de un mismo árbol (Kahn et al., 1991).

La pulpa de la chirimoya es carnosa, de color blanco a crema, azucarada, sabor subácido, aromática y de alto valor nutritivo, siendo por todo ello muy apreciada (Schroeder, 1945).

El número cromosómico de *Annona cherimola* ha sido objeto de controversia. Diversos estudios cariológicos indican un número básico $n = 8$ han aparecido diversos estudios cariológicos (Bowden, 1948; George & Nissen, 1985), al mismo tiempo que otros autores determinaban $n = 7$ (Kumar & Ranadine, 1941; Thakur & Singh, 1969; Tanaka & Okada, 1972; Walker, 1972). Como comentan Sauer & Ehrendorfer (1984) la interpretación $2n = 16$ ha estado basada en la confusión de satélites por cromosomas separados y por tanto se puede aceptar que esta especie posee 7 parejas de cromosomas.

Origen y expansión del cultivo.

El chirimoyo parece ser originario de los valles interandinos de la región de Loja en Ecuador (Popenoe, 1921) y de la cuenca alta del río Marañón a unas alturas entre los 2200 y 1500 m.s.n.m. en Perú (Guzmán, 1951), parajes donde se encuentran formaciones boscosas de esta especie. Las plantas aparecen en estos parajes muchas veces con porte arbustivo y produciendo frutos de pequeño tamaño (Guzmán, 1951). En otras zonas de Perú aparece en estado de semi-domesticación al borde de los caminos, llegando a producir frutos de mejor calidad que los puramente silvestres (Guzmán, 1951). Desde esta zona se extendió, posiblemente por acción animal o humana (Schroeder, 1945), a otros países de Centro y Sudamérica. En estos países las plantas a menudo escapan desde los cultivos y aparecen naturalizadas (Popenoe, 1921).

La chirimoya ha sido la principal fruta cultivada por los indígenas de América del Suroeste (Fairchild, 1990). Era conocida y apreciada desde tiempos precolombinos, tal y como atestiguan las evidencias antropológicas (esculturas que representan frutos de chirimoyo (Schroeder, 1945) o vasos de terracota con imágenes de frutos de anonas (Noonan, 1953)), y posiblemente cultivada desde bastante tiempo antes, ya que la agricultura precedió, con toda probabilidad, a la alfarería en todo el territorio andino. Se podría remontar el cultivo del chirimoyo al 5500 - 5000 A.C., período de aparición de la agricultura en Mesoamérica y la región andina (Pickersgill, 1977).

A partir de su zona de origen, el chirimoyo, principalmente por semillas (Fairchild, 1990) o mediante propagación vegetativa por esquejes, se extendió por toda mesoamérica, siendo traído a Europa por los primeros exploradores españoles. La primera referencia de su cultivo en España se da en 1757, en Italia en 1797 y a partir de estos países se difundió por toda el área mediterránea. A California llegó en 1871 procedente de Méjico, aunque Wester (1913) comenta que las primeras anonas fueron introducidas en Estados Unidos en 1833. Posteriormente se ha extendido a todos los países de clima templado-subtropical (Schroeder, 1945).

España es, actualmente, el primer productor mundial con, aproximadamente, 3353 Ha. (Guirado Sánchez, 1992) dedicadas a su cultivo, que se da en una franja de hasta 10 km. de anchura en las zonas costeras de las provincias de Málaga y Granada (Motril, Almuñecar y Vélez-Málaga) y, en menor medida, en Almería y Cádiz.

Otros países con una extensión de cultivo importante son Perú (1800 Ha.),

8 *Capítulo primero. Introducción*

Bolivia (1000 Ha.), Chile (1100 Ha.), Ecuador (700 Ha.), EE.UU (California con 150 Ha.), Colombia, Israel, África del Sur, Argentina, Australia, etc. (Martín Morales, 1993).

Principales cultivares.

Dentro de los cultivares españoles sobresale Fino de Jete tanto por ser el más cultivado como por una alta calidad del fruto. Otros cultivares españoles son Campas, Campas Mejorada, Negrito, etc.

En California el cv. Bays es el más cultivado, siendo White el segundo en importancia. Además están Ott, Pierce, Spain, Booth, etc.

En Chile los más importantes son Concha Lisa y Bronceada. En Australia Andrews, Mossman y Kempsey.

Dentro de las atemoyas (*A. squamosa* x *A. cherimola*) cabe destacar los siguientes cultivares (Sanewski, 1988): Pink's Mammoth, conocido desde 1870 produce un fruto de gran tamaño y calidad. African Pride parece que es originario de Sudáfrica, pero bien puede proceder de Israel (Thomson, 1970). La epidermis puede variar incluso entre frutos de un mismo árbol. Gefner es un cultivar Israelí que produce frutos de tamaño intermedio (300-400g).

Identificación de cultivares de chirimoyo.

Con el auge del cultivo del chirimoyo en diversos países de diferentes regiones del mundo se han ido desarrollando numerosos cultivares. Para caracterizar los diferentes cultivares se han usado tradicionalmente diferencias en caracteres morfológicos y fisiológicos, cuyo limitado poder de resolución dificulta la identificación de muchos cultivares, haciendo que la identidad de algunos de estos sea cuestionable (Ellstrand & Clegg, 1991). La variabilidad en la morfología de la piel del fruto ha dado lugar a determinaciones incorrectas de los cultivares (cv.), a confusiones en el nombre y a "desaparición" de algunos cv. (Ellstrand & Clegg, 1990a; Ellstrand & Clegg, 1990b).

Se ha observado que diversos cultivares de chirimoyo son polimórficos para caracteres de gran importancia en horticultura, como la tolerancia al frío, el tiempo de floración y cosecha, la proporción peso del fruto / número de semillas, etc. (Lee & Ellstrand, 1987). El estudio de estos caracteres está

claramente entorpecido por la incorrecta identificación de los cultivares.

Las isoenzimas, empleadas como marcadores genéticos, se han utilizado extensamente en la identificación varietal y construcción de mapas de ligamiento de diferentes cultivos herbáceos (Weeden, 1989) y arbóreos (Torres, 1990), como el aguacate (Torres et al, 1978a; Torres & Bergh, 1980; Degani et al., 1986; Torres et al., 1986), cítricos (Torres et al., 1978b; Moore & Castle, 1988), olivo (Pointikis et al, 1980), almendro (Hauagge et al. 1987; Cerezo et al., 1989), nogal (Arulsekar & Parfitt, 1986), manzano (Weeden & Lamb, 1985; 1987), avellano (Rovira et al., 1993), castaño (Huang et al., 1994), etc.

En chirimoyo, Ellstrand & Lee (1987) han estudiado la variación isoenzimática de ocho sistemas enzimáticos, describiendo el genotipo para 17 loci en 15 cultivares de chirimoyo (la mayoría de origen californiano) y una atemoya (*A. cherimola* x *A. squamosa*), habiendo también estudiado el ligamiento entre algunos de estos loci (Lee & Ellstrand, 1987). En España, más recientemente, se han estudiado 20 cv. de diferentes procedencias para 26 loci isoenzimáticos, caracterizado los cultivares de procedencia española y estudiado la diversidad que presenta la colección de cultivares (Perfectti (1992); Pascual et al. (1993); Perfectti et al. (1993); Perfectti & Pascual (1994)).

Otros estudios basados en las isoenzimas se han centrado en la polinización y biología floral del chirimoyo (Ellstrand, 1991; Kahn et al., 1991) o en el cálculo de la alogamia (Manzano, 1994; Manzano et al., 1994).

El grado de conocimiento genético de esta especie, de su origen y evolución, identificación de sus variedades, de sus recursos genéticos, etc., de gran interés para una futura mejora del chirimoyo, se encuentra poco desarrollado si se compara con otras especies frutales.

La utilización de las isoenzimas como marcadores genéticos ha demostrado ser de gran utilidad en el estudio de plantas cultivadas, incluyendo la identificación y certificación varietal, el conocimiento del sistema de cruzamiento, conocimiento del polen "efectivo" en la fertilización natural, determinación de los parentales de cultivares mejorados, grado de heterocigosidad, así como el conocimiento de las posibles relaciones entre las isoenzimas y caracteres de interés pomológico y comercial (Lee & Ellstrand, 1987; Peirce & Brewbaker, 1973; Weeden, 1989; Torres, 1990).

Esta familia ha sido objeto de un gran número de estudios para elucidar la sistemática y la filogenia de estas especies. Así Bakker & Gerritsen (1992)

analizan la variación en aceites y mucílagos, Dass et al. (1974) centran sus estudios en los flavonoides, Venkataratnam & Satyanarayanawamy (1958) estudian la variabilidad de diversas características morfológicas, Rogstad et al. (1991) realizan ADN *fingerprinting* en el género *Asimina* y Samuel et al. (1991) inician un estudio taxonómico mediante análisis isoenzimático.

1.2. ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS.

La electroforesis de proteínas, esto es la migración de proteínas mediada por un campo eléctrico, es el método de investigación genética a nivel molecular de mejor relación coste : beneficio (Murphy et al., 1990). Desde la aparición de la técnica de electroforesis en geles de almidón (Smithies, 1955) o en geles de poliacrilamida (Raymond & Weinstraub, 1959) y el desarrollo de la visualización de las enzimas en estos geles (Hunter & Markert, 1957) ha resultado evidente que el estudio del polimorfismo isoenzimático puede ser tremendamente útil en diversos campos, desde la genética de poblaciones hasta la horticultura y mejora vegetal (Weeden, 1989). La utilidad de la electroforesis y tinción específica de isoenzimas dentro de la genética vegetal ha sido revisada en diversas ocasiones, como por ejemplo en los dos volúmenes de Tanksley & Orton (1983) o más recientemente en el libro de Soltis & Soltis (1990).

Principios generales y definiciones.

Cuando sometemos a una serie de proteínas a un campo eléctrico, estas pueden moverse dependiendo de su carga eléctrica neta, que depende del pH del medio. Esto mismo es lo que sucede en la electroforesis en gel, pero al estar las proteínas dentro de una matriz porosa (el gel) que ofrece cierta resistencia al paso de las moléculas, la movilidad de estas proteínas va a depender de más factores, como el tamaño de poro del gel, el tamaño y forma de la molécula, pH y fuerza iónica del medio, campo eléctrico, naturaleza del gel, etc. (Andrews, 1989).

Si tras la separación electroforética (bajo condiciones no desnaturizantes) utilizamos un proceso de coloración específico para una enzima, encontraremos en el gel una o una serie de *bandas* que nos delatan la presencia de la enzima

en cuestión. Esta serie de bandas con igual actividad enzimática se denominan *isoenzimas* (Markert & Moller, 1959).

Como comentamos anteriormente la movilidad electroforética depende en última instancia de la carga neta de la proteína, que está en función principalmente de su composición en aminoácidos. Es por ello que los cambios en la composición en aminoácidos de la proteína (tal como los producidos por diferencias alélicas) que cambien la carga neta de la molécula podrán ser detectados mediante la separación electroforética y posterior tinción específica. Así mediante estas técnicas podrán detectarse enzimas producidas por genes diferentes, que mostrarán diferencias más o menos notables en movilidad, y los productos enzimáticos de alelos de un mismo gen, que reciben el nombre de *aloenzimas* (Prakash et al., 1969) y que, habitualmente, deben mostrar menores diferencias de movilidad entre ellos.

Es habitual emplear el término *zona* para designar a un conjunto de bandas isoenzimáticas que aparecen relativamente juntas en un gel. Aunque no siempre, las zonas indican la localización en los geles de genes concretos. Además se utiliza el término *electromorfo* como sinónimo de banda, aunque originalmente designaba las aloenzimas de similar movilidad pero codificadas por diferentes alelos (King & Ohta, 1975).

Los aspectos técnicos de la electroforesis en gel han sido revisados en multitud de ocasiones, sirvan como ejemplo O'Malley et al. (1980), Cardy et al. (1980), Conckle et al. (1982), Vallejos (1983), Morden et al (1987), Wendel & Weeden (1990), Murphy et al. (1990).

Interpretación de los patrones isoenzimáticos.

La variabilidad existente y el análisis de la herencia en una determinada zona nos permite averiguar el control genético de las bandas de esa zona. Además, el conocimiento de la naturaleza de la enzima (su estructura cuaternaria) y su localización subcelular posibilitan una mejor interpretación de los patrones de bandas que observamos en los geles. La comparación con los resultados obtenidos en diferentes plantas es otra herramienta útil para la interpretación genética de los geles.

El patrón de bandas más simple corresponde al de una enzima monomérica codificado por un solo gen. Si el individuo es homocigoto aparecerá una única banda en los geles. Si es heterocigoto aparecerán dos, cada

una correspondiente a uno de los dos alelos. Habitualmente se denomina alelo "rápido" o "lento" según la movilidad electroforética de los electromorfos que codifiquen.

Cuando se trata de una enzima dimérica (formada por dos subunidades) un individuo homocigoto tan solo presentará una banda, pero un heterocigoto mostrará tres (la correspondiente al alelo rápido (dos subunidades rápidas), la correspondiente al alelo lento (dos subunidades lentas) y una intermedia formada por la unión de las subunidades codificadas por ambos alelos (una subunidad rápida y una subunidad lenta). Cuando se trate de una enzima tetramérica, los individuos heterocigotos presentaran un patrón de cinco bandas formadas por la asociación al azar de los dos tipos de subunidades de este tipo de enzimas (4a, 3a1b, 2a2b, 1a3b y 4b).

Los patrones de bandas pueden complicarse considerablemente debido a diferentes motivos: más de un gen por sistema isoenzimático, bandas adicionales producidas por modificaciones postraduccionales, poliploidía, alelos nulos (aquellos con la actividad enzimática reducida o ausente por completo), etc.

Las hipótesis en relación al número de genes y alelos que intervienen en el control de las bandas o zonas pueden verificarse realizando estudios de segregación en cruzamientos dirigidos. Las isoenzimas, que pueden analizarse en la mayoría de los tejidos, presentan habitualmente codominancia y herencia mendeliana. Revisiones sobre interpretación de los patrones electroforéticos pueden encontrarse en Murphy et al. (1990) y Weeden & Wendel (1990).

Principales ventajas e inconvenientes.

Las principales ventajas de las isoenzimas frente a otros marcadores genéticos como los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (sequence characterized amplified region)... son menores requerimientos técnicos (un laboratorio con menor aparataje) y un coste sensiblemente inferior, así como la menor toxicidad de los productos para electroforesis en geles de almidón y la posibilidad de que a partir de un solo gel se puedan obtener resultados para varias enzimas (Wendel & Weeden, 1990).

En contrapartida, las isoenzimas detectan menos variabilidad que los marcadores de DNA (en torno a un 25 % de las sustituciones de aminoácidos

(Gottlieb, 1981)), aunque mediante el uso de varios sistemas de tampones en la electroforesis se puede aumentar la capacidad de detección de alelos (Weeden & Wendel, 1990). Las isoenzimas además, presentan menor número de formas alélicas que otros marcadores moleculares y pueden mostrar posibles diferencias de expresión en diferentes tejidos y necesitar cantidades mayores de muestra. Además, algunos sistemas isoenzimáticos se ven afectados por cambios epigenéticos (Weeden, 1989). Otro inconveniente es el menor número de genes que se pueden estudiar y que estos únicamente son de una determinada categoría (enzimas).

Utilización de las isoenzimas en horticultura.

Las isoenzimas se han aplicado con éxito a diversos problemas tanto de genética básica como de poblaciones. Entre estos cabe citar los estudios para conocer la estructura genética, función y control de ciertos genes, determinación del sistema de cruzamiento, estudios de paternidad, genética ecológica, duplicación génica y poliploidía, estudios filogenéticos y evolutivos, etc.

Como los genes isoenzimáticos habitualmente están ampliamente distribuidos por todo el genoma (Weeden & Wendel, 1990) pueden servir como puntos de referencia para construir mapas de ligamiento y situar en estos otros marcadores de interés.

También se han utilizado las isoenzimas para estudiar el proceso de domesticación a que han sido sometidas las especies cultivadas (Doebley, 1990). Las isoenzimas no han estado sometidas a presiones selectivas directas por parte de los mejoradores y por tanto pueden proporcionar un índice del grado de cambio genético producido por la domesticación al comparar plantas cultivadas y sus progenitores silvestres. También pueden ser de utilidad para determinar cuales son esos progenitores, los centros de origen y de diversidad, la existencia de introgresión, la pérdida de diversidad, el posible origen poliploide de algunos cultivos, etc. (Doebley, 1990).

Además de las aplicaciones generales de las isoenzimas en genética básica y de poblaciones, estos marcadores tienen un interesante papel en la mejora genética y en horticultura.

Weeden (1989) describe tres tipos generales de aplicaciones del análisis isoenzimático en mejora vegetal:

i) Estudio de la variación genética a nivel general (Estima de la diversidad genética en colecciones de germoplasma. Identificación de cultivares).

ii) Estudio de la variación genética a un nivel más específico (Análisis genético de la herencia de ciertos caracteres. Confirmación de la naturaleza híbrida de la progenie de un cruzamiento. Como marcadores de caracteres monogénicos, tal como ciertos tipos de resistencias. Análisis de triploides y aneuploides. Estudio de la variación somatoclonal).

iii) Análisis multilocus (Confirmación de pedigris. Estudio de la heterocigosidad y la heterosis. Nivel ploídico de los cultivares. Estudio de caracteres cuantitativos. Construcción de mapas de ligamiento. Identificación de material genético "exótico" en la descendencia de cruces entre variedades silvestres y variedades cultivadas).

Como se ve el estudio isoenzimático puede ser muy útil en programas de mejora. Para ello hay que disponer de una colección amplia de cultivares que manifiesten diferentes características susceptibles de mejora. La identificación y caracterización isoenzimática de los cultivares es necesaria para tener un conocimiento exacto del tipo de material vegetal que se desea someter a mejora y para llevar un mejor control sobre la colección de cultivares.

La mayoría de las plantas de interés económico han sido objeto de estudios isoenzimáticos, habiéndose establecido mapas de ligamiento de las principales plantas cultivadas, como el maíz (Goodman & Stuber, 1983), arroz (Pham et al., 1990; Alonso-Blanco, etc., 1994), trigo (Hart, 1984), tomate (Tanksley & Rick, 1980), soja (Yu & Kiang, 1993), cítricos (Kennord et a., 1994), etc.

Una de las posibilidades que ofrece un mapa genético basado en marcadores moleculares (isoenzimas, RFLP, etc.) es la ser una herramienta para aumentar considerablemente la eficacia del proceso de mejora genética (Stuber, 1990a). Los caracteres agronómicos suelen mostrar una variación continua, lo que implica que la herencia de estos caracteres es cuantitativa y muy posiblemente involucre los efectos colectivos de numerosos factores genéticos situados en diversos segmentos cromosómicos, los cuales podrían "marcarse" con un determinado marcador molecular (Stuber, 1990b).

Tanskley (1983) (citado por Stuber, 1990a) comenta cinco razones por las que los marcadores moleculares son superiores a los morfológicos:

1. Los marcadores moleculares son, usualmente, codominantes y es posible

determinar los genotipos en las progenies de los cruzamientos, lo que no sucede siempre con los marcadores morfológicos.

2. Los genotipos de los loci de los marcadores moleculares pueden determinarse a partir de prácticamente cualquier tejido y estado de desarrollo.
3. Los marcadores moleculares son de forma natural más polimórficos.
4. Es habitual encontrar efectos deletéreos asociados a ciertos caracteres morfológicos.
5. Se pueden estudiar un gran número de marcadores moleculares al mismo tiempo, sin que interactuen entre si dificultando el análisis.

Las características que deben tener los marcadores moleculares para ser útiles en la manipulación de caracteres cuantitativos son, en principio: un alto número de marcadores, una distribución uniforme en los cromosomas manteniendo un espaciamiento constante y un alto grado de desequilibrio de ligamiento con los loci para los caracteres cuantitativos (Stuber, 1990a).

Los RFLP son quizás los marcadores más empleados en estos estudios, pero otros tipos de marcadores, como las isoenzimas, pueden ser empleados en la mejora genética de los cultivos.

1.3. BANCO DE GERMOPLASMA.

La colección de cultivares de chirimoyo de la Estación Experimental "La Mayora" (Algarrobo-Costa, Málaga) representa el mayor banco de germoplasma de este cultivo. Actualmente mantiene cerca de 250 cultivares de chirimoyo, con procedencias muy diversas, pero predominando las entradas de Perú y Ecuador, que son los centros primarios de diversificación de la especie.

Esta colección representa un instrumento básico para programas de mejora y para la futura comercialización de nuevas variedades con caracteres pomológicos favorables, como resistencia de los frutos a bajas temperaturas, menor susceptibilidad a la infección por Ceratitis, mayor contenido en azúcares en la pulpa, etc.

Actualmente se están llevando a cabo diversos estudios sobre polinización (Farré et al, 1976; Hermoso, 1990; Soria et al., 1990; 1993), de caracterización

16 Capítulo primero. Introducción

morfológica y fisiológica de los cultivares (Ramos Díaz, 1987; González Yuste, 1991; Bueno Sánchez, 1992; Martín Morales, 1993), etc. La identificación genética de los mismos, a través del análisis de isoenzimas, posibilitaría un mayor conocimiento de la colección, y por tanto, una mejor utilización de sus recursos.

Yndgaard & Hoskuldsson (1985) determinan seis diferentes usos de los marcadores isoenzimáticos en la gestión y uso de las colecciones de germoplasma:

1. Descripción de las poblaciones o cultivares.
2. Detección de las diferencias genéticas entre individuos o cultivares.
3. Determinación de las relaciones filogenéticas entre especies.
4. Análisis de los patrones de migración de las especies a partir de sus centros de origen.
5. Identificación de entradas repetidas.
6. Planificación de nuevas expediciones de recolección de material.

Como se deduce de lo anterior, un estudio isoenzimático de los cultivares de chirimoyo es fundamental para un mejor aprovechamiento del banco de germoplasma de la E. E. "La Mayora".

1.4. OBJETIVOS.

Nuestro estudio se enmarca dentro de la gestión de esta colección, y esta memoria pretende ser una contribución a un mayor conocimiento de la misma. Es por ello que en este trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Caracterización a nivel isoenzimático de los cultivares del banco de germoplasma de chirimoyo existente en la E. E. "La Mayora", incluyendo a los cultivares de atemoya.
- Establecer el grado de variabilidad genética que presenta la colección.
- Establecer relaciones de ligamiento entre los loci isoenzimáticos.
- Estudiar las relaciones entre cultivares basándose en los genotipos para los marcadores isoenzimáticos.
- Mostrar las relaciones, si las hubiera, entre diversos caracteres agronómicos y los datos isoenzimáticos.



Capítulo 2
Material y Métodos



□ CAPÍTULO SEGUNDO □

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL.

Se han analizado 210 cultivares: 206 de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill) y 4 atemoyos (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*). Estos cultivares proceden de los países de origen del cultivo (Perú y Ecuador) y de otras diferentes procedencias (Australia, Bolivia, España, EE.UU., Chile, Israel, y Portugal (Madeira)). Estos países representan los principales productores de chirimoya a nivel mundial.

Todos los cultivares proceden de la colección de árboles subtropicales de la Estación Experimental "La Mayora" (CSIC) (Algarrobo-Costa, Málaga) situada a 1.5 Km. del mar, en el margen izquierdo del río Algarrobo. Los cultivares estudiados se localizan en tres parcelas:

Parcela *Llano*. Esta parcela se sitúa junto al río, a unos 10 m. sobre el nivel del mar. La zona sur se encuentra abierta al mar, con lo que los efectos del viento se hacen apreciables. Posee 205 árboles en un marco de plantación de 8 x 4 m. ocupando en total una superficie de 1 Ha. Los cultivares fueron injertados entre 1985 y 1987 (Martín Morales, 1993)

Parcela 29. Se sitúa a 35 m.s.n.m. y ocupa 3.500 m². Está protegida del viento por varias laderas y caballones. Posee 125 árboles plantados en un marco de 7 x 4 m.. Se plantó en el año 1979.

Parcela 14. Se sitúa a 28 m.s.n.m. Al estar abierta al mar y débilmente protegida, los efectos del viento son notables. Los chirimoyos se trasplantaron en 1991, en un marco de 7 x 4 m.

22 Capítulo segundo. Material y Métodos

En la tabla 1 se muestra la denominación de cada cultivar, las abreviaturas empleadas, la parcela y el número de árbol dentro de esa parcela de la E.E. "La Mayora" y el país de procedencia, aunque algunos han sido introducidos en la colección desde otros países (los representantes bolivianos y otros cultivares han sido importados desde California).

En total se han analizado 210 cultivares (figura 2.1), que por procedencias se distribuyen de la siguiente forma:

- 122 cv. de Perú (PER)
- 39 cv. de Ecuador (ECU)
- 10 de Estados Unidos (USA)
- 10 de Chile (CHI)
- 10 cv. de Madeira (MAD)
- 8 cv. de España (ESP)
- 3 cv. de Bolivia (BOL)
- 4 cv. de otras procedencias (OTR)
- y 4 cv. de Atemoya (ATE)

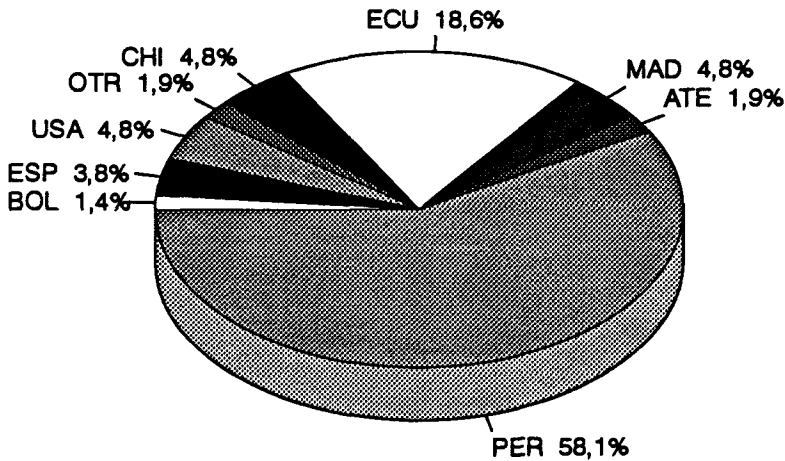


FIGURA 2.1

Distribución por procedencias de los cultivares analizados

TABLA II.1

Cultivares estudiados. Denominación, localización y procedencia.

Denominación	Cultivar		Localización		Procedencia	
	Abrev.	Parcela	Árbol	País	Provincia	
<i>Atemoyos</i>						
ATEMOYA AFRICAN	AA	P29	16	AUS		
ATEMOYA GEFNER	AG	P29	108	ISR	vía EE.UU.	
ATEMOYA PINK MAMOUT	AP	P29	72	AUS		
JOY	JOY	P14	19	AUS		
<i>Chirimoyos</i>						
AZAPA-II	AZ	LLANO	79	C		
BAYS	BA	P29	109	EE.UU.	California	
BOLIVIA SEEDLING 1	B1	P29	123	B	vía EE.UU. (California)	
BOLIVIA SEEDLING 2	B2	P29	118	B	vía EE.UU. (California)	
BOLIVIA SEEDLING 3	B3	P29	116	B	vía EE.UU. (California)	
BONITA	BO	P29	117	EE.UU.	California	
BOOTH	BH	P29	121	EE.UU.	California	
BRONCE SUAVE	BS	P29	49	C		
BRONCEADA	BRON	LLANO	81	NZE		
BURTONS	BURT	LLANO	215	AUS		
C. OTT	CT	P29	57	EE.UU.	California	
CAMPAS	CA	P29	85	ESP		
CAMPAS MEJORADA	CM	P29	97	ESP		
CONCHA	CO	P29	92	C		
CONCHA LISA	CN	P29	113	C	vía EE.UU. (California)	
CORAZON	CR	P29	103	C		
CUMBE	CU	P29	86	P	Lima	
CHAFFEY	CH	P29	104	EE.UU.	California	
CHILENA	CL	P29	119	C	vía EE.UU. (California)	
CHIUNA-1	C1	P14	87	P	UNA La Molina	
CHIUNA-2	C2	LLANO	90	P	UNA La Molina	
CHIUNA-3 TARDIA	C3Td	P29	74	P	Lima	
CHIUNA-3 TEMPRANA	C3Te	P29	107	P	UNA La Molina	
CHIUNA-4	C4	P29	112	P	UNA La Molina	
ESPINOSA M	EM	P29	20	C		
ESPINOSA N	EN	P29	8	C		

24 Capítulo segundo. Material y Métodos

TABLA II.1 (CONTINUACIÓN)

Cultivares estudiados. Denominación, localización y procedencia.

Denominación	Cultivar		Localización		Procedencia	
	Abrev.	Parcela	Árbol	País	Provincia o Región	
FINO DE JETE	FI	P29	120	ESP		
HILL	HI	P29	89	C		
LISA PUELLARO LISO	LPL	LLANO	175	E	Pichincha	
LISA PUELLARO PINCHUDO	LPP	LLANO	170	E	Pichincha	
LOMA	LO	P29	53	EE.UU.	California	
MANTECA	MA	P29	84	ESP		
MOSSMAN	MOS	LLANO	212	AUS		
NEGRITO	NE	P29	33	ESP		
PAZICAS	PAZ	P14	13	ESP		
PERÚ SEED 24	PE	P29	41	P	vía USA (Hawaii)	
PIERCE	PI	P29	114	EE.UU.		
PINCHUDO	PC	P29	66	ESP		
PIÑA	PÑ	P29	18	ESP		
SALMON	SA	P29	124	EE.UU.	California	
SELECCIÓN ECUADOR 1	E1	P14	9	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 2	E2	P14	10	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 3	E3	P14	90	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 4	E4	P14	28	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 5	E5	P14	81	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 6	E6	P14	70	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 8	E8	P14	36	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 9	E9	P14	53	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 10	E10	P14	41	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 11	E11	LLANO	226	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 12	E12	P14	43	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 13	E13	P14	18	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 14	E14	P14	11	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 15	E15	P14	8	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 16	E16	P14	84	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 17	E17	P14	2	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 18	E18	P14	68	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 20	E20	P14	88	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 21	E21	P14	61	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 22	E22	P14	66	E	Pichincha	

TABLA II.1 (CONTINUACIÓN)

Cultivares estudiados. Denominación, localización y procedencia.

Denominación	Cultivar		Localización		Procedencia	
	Abrev.	Parcela	Árbol	País	Provincia o Región	
SELECCIÓN ECUADOR 23	E23	P14	65	E	Loja	
SELECCIÓN ECUADOR 24	E24	P14	28	E	Loja	
SELECCIÓN ECUADOR 25	E25	P14	27	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 26	E26	P14	17	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 27	E27	P14	30	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 28	E28	P14	47	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 29	E29	LLANO	233	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 30	E30	LLANO	219	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 31	E31	P14	15	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 32	E32	P14	23	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 33	E33	P14	92	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 34	E34	P14	34	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 35	E35	P14	80	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 36	E36	P14	57	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 37	E37	P14	50	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 38	E38	P14	7	E	Pichincha	
SELECCIÓN ECUADOR 39	E39	P14	82	E	Pichincha	
SELECCIÓN MADEIRA 4	M4	P14	99	MAD		
SELECCIÓN MADEIRA 5	M5	P14	103	MAD		
SELECCIÓN MADEIRA 7	M7	P14	98	MAD		
SELECCIÓN MADEIRA 10	M10	P14	100	MAD		
SELECCIÓN MADEIRA 14	M14	P14	73	MAD		
SELECCIÓN MADEIRA 16	M16	P14	97	MAD		
SELECCIÓN MADEIRA 17	M17	P14	105	MAD		
SELECCIÓN MADEIRA 19	M19	P14	106	MAD		
SELECCIÓN MADEIRA 23	M23	P14	107	MAD		
SELECCIÓN MADEIRA 25	M25	P14	104	MAD		
SELECCIÓN PERÚ 1	P1	LLANO	136	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 2	P2	LLANO	55	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 3	P3	LLANO	78	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 4	P4	LLANO	127	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 5	P5	LLANO	111	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 6	P6	LLANO	137	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 7	P7	LLANO	109	P	Lima	

26 Capítulo segundo. Material y Métodos

TABLA II.1 (CONTINUACIÓN)

Cultivares estudiados. Denominación, localización y procedencia.

Denominación	Cultivar		Localización		Procedencia	
	Abrev.	Parcela	Árbol	País	Provincia o Región	
SELECCIÓN PERÚ 7	P7	LLANO	108	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 10	P10	LLANO	46	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 11	P11	LLANO	172	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 12	P12	LLANO	73	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 13	P13	LLANO	48	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 15	P15	LLANO	57	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 17	P17	LLANO	49	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 18	P18	LLANO	124	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 19	P19	LLANO	51	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 20	P20	LLANO	132	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 22	P22	LLANO	47	P	Ancash	
SELECCIÓN PERÚ 23	P23	LLANO	86	P	Ancash	
SELECCIÓN PERÚ 25	P25	LLANO	120	P	Ancash	
SELECCIÓN PERÚ 26	P26	LLANO	50	P	Ancash	
SELECCIÓN PERÚ 27	P27	LLANO	58	P	Ancash	
SELECCIÓN PERÚ 29	P29	LLANO	176	P	Ancash	
SELECCIÓN PERÚ 33	P33	LLANO	177	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 34	P34	LLANO	75	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 35	P35	LLANO	167	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 38	P38	LLANO	18	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 39	P39	LLANO	8	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 40	P40	LLANO	15	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 41	P41	LLANO	21	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 42	P42	LLANO	106	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 43	P43	LLANO	69	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 44	P44	LLANO	10	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 45	P45	LLANO	33	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 46	P46	LLANO	19	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 47	P47	LLANO	29	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 48	P48	LLANO	107	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 49	P49	LLANO	16	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 50	P50	LLANO	5	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 51	P51	LLANO	173	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 52	P52	LLANO	104	P	Cajamarca	

TABLA II.1 (CONTINUACIÓN)

Cultivares estudiados. Denominación, localización y procedencia.

Denominación	Cultivares		Localización		Procedencia	
	Abrev.	Parcela	Árbol	País	Provincia o Región	
SELECCIÓN PERÚ 53	P53	LLANO	45	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 54	P54	LLANO	180	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 55	P55	LLANO	98	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 56	P56	LLANO	17	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 57	P57	LLANO	12	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 58	P58	LLANO	22	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 59	P59	LLANO	9	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 60	P60	LLANO	174	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 61	P61	LLANO	7	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 62	P62	LLANO	24	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 64	P64	LLANO	14	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 66	P66	LLANO	23	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 67	P67	LLANO	95	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 68	P68	LLANO	93	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 69	P69	LLANO	103	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 71	P71	LLANO	102	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 72	P72	LLANO	180	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 73	P73	LLANO	1	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 74	P74	LLANO	32	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 75	P75	LLANO	65	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 76	P76	LLANO	53	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 77	P77	LLANO	67	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 78	P78	LLANO	62	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 78 (P29)	SP78	P29	101	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 79	P79	LLANO	26	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 80	P80	LLANO	99	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 81	P81	LLANO	2	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 83	P83	LLANO	38	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 84	P84	LLANO	11	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 85	P85	LLANO	36	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 86	P86	LLANO	101	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 87	P87	LLANO	85	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 88	P88	LLANO	39	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 89	P89	LLANO	100	P	Cajamarca	

28 Capítulo segundo. Material y Métodos

TABLA II.1 (CONTINUACIÓN)

Cultivares estudiados. Denominación, localización y procedencia.

Denominación	Cultivar		Localización		Procedencia	
	Abrev.	Parcela	Árbol	País	Provincia o Región	
SELECCIÓN PERÚ 90	P90	LLANO	6	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 91	P91	LLANO	94	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 92	P92	LLANO	13	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 93	P93	LLANO	3	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 94	P94	LLANO	4	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 95	P95	LLANO	105	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 96	P96	LLANO	97	P	Cajamarca	
SELECCIÓN PERÚ 102	P102	P14	5	P	Piura	
SELECCIÓN PERÚ 104	P104	P14	29	P	Piura	
SELECCIÓN PERÚ 105	P105	LLANO	37	P	Piura	
SELECCIÓN PERÚ 106	P106	P14	58	P	Piura	
SELECCIÓN PERÚ 107	P107	P14	31	P	Piura	
SELECCIÓN PERÚ 108	P108	LLANO	194	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 114	P114	P14	71	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 115	P115	P14	72	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 116	P116	LLANO	179	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 117	P117	P14	39	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 118	P118	P14	6	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 119	P119	LLANO	178	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 120	P120	P14	143	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 121	P121	P14	49	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 122	P122	P14	64	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 123	P123	LLANO	211	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 125	P125	P14	32	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 126	P126	P14	63	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 127	P127	P14	60	P	Huánuco	
SELECCIÓN PERÚ 128	P128	LLANO	204	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 129	P129	P14	4	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 130	P130	P14	20	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 131	P131	P14	54	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 132	P132	P14	16	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 133	P133	LLANO	239	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 135	P135	P14	1	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 136	P136	P14	22	P	Lima	

TABLA II.1 (CONTINUACIÓN)

Cultivares estudiados. Denominación, localización y procedencia.

Denominación	Cultivar		Localización		Procedencia	
	Abrev.	Parcela	Árbol	País	Provincia o Región	
SELECCIÓN PERÚ 137	P137	LLANO	220	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 138	P138	P14	33	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 410-16	P410	P29	78	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 604	P604	P29	24	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 606	P606	P29	83	P	Lima	
SELECCIÓN PERÚ 7752	SP77	P29	93	P	vía USA (Hawaii)	
SERENA	SE	P29	105	C	vía España	
SPAIN	SP	P29	67	EE.UU.	California	
WHITE	WH	P29	100	EE.UU.	California	
ZARCERO	ZA	P29	82	Costa Rica	?	

Abrev. = abreviatura	P29 = Parcela 29	P14 = Parcela 14	LLANO = Parcela Llano
AUS = Australia	ISR = Israel	C = Chile	B = Bolivia
NZE = Nueva Zelanda	ESP = España	P = Perú	E = Ecuador
MAD = Madeira (Portugal)	UNA = Universidad Nacional Agraria		

La mayoría de los cultivares de Ecuador y Perú se recolectaron en las dos expediciones realizadas a estos países por Farré & Hermoso (1985; 1987).

En Ecuador se recolectaron en dos provincias: Pichincha y Loja (figura 2.2). De la primera se han estudiado en este trabajo 35 cv. que proceden de 4 localidades diferentes; de la segunda únicamente dos cultivares.

De los 122 cultivares de Perú 112 fueron incorporados a la colección gracias a estas dos expediciones. Estos cultivares peruanos proceden de 5 provincias diferentes (figura 2.2):

- Piura. 5 cultivares de una única localidad.
- Cajamarca. 59 cv. de dos localidades (con múltiples sublocalidades de recolección).
- Ancash. 6 cv. de 4 localidades.
- Huánuco. 14 cv. de 3 localidades.

- Lima con 28 cv. de 5 localidades.

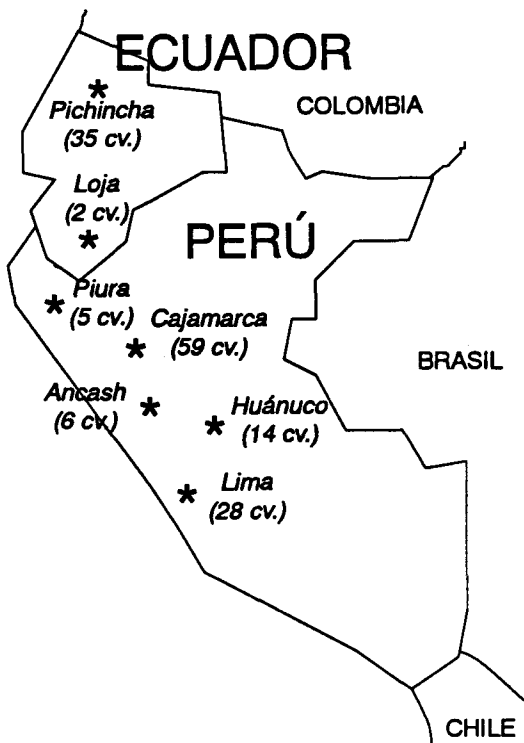


FIGURA 2.2

Mapa de Perú y Ecuador mostrando los departamentos de procedencia de los cultivares.

De estos 210 cultivares se ha estudiado fundamentalmente extractos foliares y homogeneizados de estambres, aunque para ciertos sistemas isoenzimáticos que no se expresan en hojas, así como para determinar el control genético de las diferentes isoenzimas se han analizado semillas procedentes de autofecundaciones.

2.2. MÉTODOS.

Recogida de material y almacenaje.

Hojas. Durante las primaveras de 1991, 1992 y 1993 se recogieron muestras foliares, hojas jóvenes que medían entre 2 y 3 cm. de longitud. La elección de hojas de pequeño tamaño, aún no completamente desarrolladas, viene justificada por el hecho de que presentan menores concentraciones de pigmentos y de otras sustancias fenólicas que se liberan durante la homogeneización del tejido, afectando negativamente la función enzimática (Loomis, 1967).

Las hojas fueron introducidas en bolsas de plástico, etiquetadas y sumergidas en nitrógeno líquido (-192°C) para su traslado al laboratorio. Una vez en este, fueron homogeneizadas o conservadas a -80°C. El mantenimiento de muy bajas temperaturas durante todo el proceso se ha revelado esencial para conservar la actividad y resolución isoenzimáticas. Temperaturas superiores a 0°C producen un rápido pardeamiento de este material, con la consiguiente degradación de la actividad enzimática.

Flores. Durante la floración (principalmente en Junio y Julio) se recogieron flores en estado pre-hembra. Los pétalos eran extirpados y los receptáculos florales de un mismo cultivar eran situadas en placas de petri que se etiquetaban. El traslado al laboratorio se realizó en neveras portátiles con placas refrigeradoras. En el laboratorio las flores eran conservadas en el refrigerador (4°C) hasta su utilización (siempre antes de una semana).

Semillas. Se han utilizado semillas procedentes de autofecundaciones (realizadas por el personal de la E.E. *La Mayora*) para determinar el control genético de los sistemas isoenzimáticos analizados y para estudiar algunas enzimas que no muestran suficiente actividad en los extractos foliares.

Las semillas fueron extraídas de los frutos, dejadas varios días al aire y conservadas posteriormente en sobres de papel hasta su estudio.

Únicamente se ha utilizado el endospermo secundario, que aún siendo un material triploide no presenta problemas de interpretación de sus patrones isoenzimáticos (Lee & Ellstrand, 1987).

Extracción y Homogeneización.

Se ha empleado el mismo tampón de extracción (Soltis et al., 1983) con los diferentes tipos de material vegetal:

Tris	0.1 M.
EDTA sal tetrasódica	0.001 M.
KCl	0.01 M.
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.01 M.
PVP-40	12 %
β-ME	0.1 %
Metabisulfito sódico	0.5 %
HCl	hasta ajustar a pH = 7.5

Si los extractos eran sometidos a electroforesis en geles verticales de poliacrilamida, el tampón de extracción era modificado ligeramente, eliminando de su composición el cloruro magnésico y el cloruro potásico y añadiendo sacarosa (0.2 M.) para aumentar la densidad de los extractos y facilitar la carga de los pocillos en los geles.

Con este tampón de extracción se consigue una excelente conservación de la actividad enzimática en los extractos crudos. La adición de PVP-40 como acomplejador de compuestos fenólicos, β-ME como antioxidante y metabisulfito como inhibidor de las fenol-oxidasas (Loomis, 1974), además del EDTA como quelante de cationes divalentes (el cobre es esencial para la acción de las fenol-oxidasas) hacen a este tampón muy recomendable como solución de extracción en un material tan propenso al pardeamiento mediado por fenoles como las hojas de chirimoyo.

Condiciones de extracción.

Hojas.- Aproximadamente 500 mg. de hoja eran cortados en pequeños trozos con la ayuda de un bisturí. Tras la adición de 1 ml. de tampón de extracción eran homogeneizadas con un politrón al 75 % de la potencia máxima durante un minuto. El homogeneizado era introducido en tubos eppendorf de 1.5 ml. que se centrifugaban durante 15 minutos, a la máxima velocidad, en una centrifuga Beckman microfuge mantenida en una cámara fría. Durante todo el proceso los tubos con el homogeneizado se colocaban en bandejas con hielo picado, con el fin de mantener siempre bajas temperaturas.

Una vez concluida la centrifugación el sobrenadante era recogido por decantación en otro tubo y se utilizaba para electroforesis en geles de almidón, o bien se almacenaba a -80°C . Un paso adicional era requerido si los extractos eran empleados en geles de poliacrilamida: los sobrenadantes eran vueltos a centrifugar durante veinte minutos a 35.000 rpm en una centrífuga Beckmann TL-100 mantenida a 2°C . con un rotor TLA-100.3 (43.000 g).

Flores.- Los estambres eran desprendidos de la cabezuela floral y situados en pocillos de metacrilato donde se le añadía una pequeña cantidad ($125\ \mu\text{l}$.) de tampón de extracción y se homogeneizaba con un embolo de metacrilato o teflón. Todo el proceso se realizaba sobre una placa refrigeradora a una temperatura aproximada de 2°C .

Semillas.- El endospermo secundario era separado de la cutícula de la semilla con la ayuda de unos alicates. Posteriormente era cortado, mediante un escalpelo, en pequeños trozos que se situaban (unos 50 mg.) en pocillos de metacrilato. A continuación se adicionaban $150\ \mu\text{l}$. de tampón de extracción y se procedía a homogeneizar con un émbolo de metacrilato o teflón en las mismas condiciones que los estambres. Si los extractos iban destinados a geles de poliacrilamida se centrifugaban de modo similar a los extractos de hojas.

Electroforesis.

Se han realizado separaciones electroforéticas en geles de almidón y poliacrilamida.

Electroforesis en geles de almidón.

Se han empleado las técnicas electroforéticas habituales para geles horizontales de almidón (Smithies, 1955; Hunter & Markert, 1957). El almidón empleado en la preparación del gel estaba constituido por almidón hidrolizado para electroforesis (Sigma Chemical Co.) y almidón de patata para alimentación (Santiveri) hidrolizado en nuestro laboratorio siguiendo la técnica descrita por Moretti et al. (1957), mezclados en proporción 60:40.

En la electroforesis se han utilizado cuatro sistemas de tampones:

i) Sistema LiOH (Shields et al., 1983)

□ Tampón gel:

Ácido cítrico 0.005 M

Tris 0.030 M

Tampón electrodos 1 %

pH aproximado 8.5

□ Tampón electrodos:

Ácido Bórico 0.03 M

Hidróxido de litio 0.06 M

pH aproximado 8.1

ii) Sistema Chippindale. Modificado a partir de Chippindale (1989)

□ Tampón gel:

Tris 0.173 M

Ácido cítrico 0.004 M

pH = 9.5 ajustado con NaOH 4 N

□ Tampón electrodos:

Ácido Bórico 0.12 M

Hidróxido de litio 0.24 M

pH aproximado 8.1

iii) Sistema Morfolina (Lee & Ellstrand, 1987)

□ Tampón gel:

1:24 dilución del tampón electrodos

□ Tampón electrodos:

Ácido cítrico 0.04 M

pH = 8.0 ajustado con N-amino-propilmorfolina

iv) Sistema Tris-Histidina (Pitel & Cheliak, 1984)

□ Tampón gel:

Histidina-HCl 0.01 M

EDTA 0.28 mM

pH = 7.0 ajustado con tris 1 M

□ Tampón electrodos:

Tris 0.125 M

pH = 7 ajustado con ácido cítrico 1 M

Preparación del gel.- Todos los geles fueron preparados a una concentración del 10% de almidón. Para preparar los geles se utilizaban 350 ml. de tampón gel y 35 g. de almidón hidrolizado. Ambos componentes se calentaban en un matraz, agitando continuamente, hasta que se producía la ebullición. Llegado este punto se seguía calentando 90 segundos y se pasaba a degasear (60 segundos) mediante una trompa de vacío conectada a un grifo de agua

corriente. Inmediatamente se vertía el gel en un molde adecuado, previamente desengrasado con alcohol.

Se han empleado como moldes de gelificación marcos de metacrilato (230 x 230 mm dimensiones exteriores; 190 x 120 mm de dimensiones interiores) sobre laminas de vidrio (230 x 230 x 1,5 mm).

Pasada al menos una hora el gel se cubría con una película de plexiglas, para evitar la deshidratación, y se conservaba en el refrigerador hasta su utilización (siempre antes de 24 horas).

Carga de las muestras.- Los extractos eran absorbidos en papeles Whatman nº 3 previamente cortados en rectángulos de 11 x 5 mm. (también se han utilizado formatos de 11 x 4 mm. y 11 x 6 mm.) que se depositaban sobre papel de filtro para eliminar el exceso de muestra. Los papeles eran finalmente insertados en un corte longitudinal que se realizaba en el gel, a 2 cm. de su extremo catodal. Una vez insertadas las muestras se situaban a su altura, en los extremos del gel, papeles Whatman del nº 3 (6 x 11 mm.) con azul de bromofenol (diluido en agua al 1%) como indicador del desarrollo electroforético.

Desarrollo de la electroforesis.- Se han empleado cubetas de electroforesis con una capacidad de 500 y 750 cc. y electrodos de cable de acero inoxidable o platino. Mediante esponjas se cerraba el circuito eléctrico entre las cubetas y el gel. Como fuentes de alimentación se han utilizado diversos modelos, pero fundamentalmente se ha trabajado con Sigma P500B y LKB 2197 Power Supply. Los geles se situaban sobre placas refrigeradoras de aluminio conectadas a un

TABLA II.2

Condiciones de desarrollo de la electroforesis en geles de almidón

sistema de tampones	Inicio	pasados 20 '
LiOH	150 V ctes	200 V ctes
Chippindale	125 V ctes	150 V ctes
Morfolina	25 mA ctes	35 mA ctes
Tris-histidina	25 mA ctes	50 mA ctes

circuito refrigerante que las mantenía a una temperatura aproximada de 2-3 °C.

La tabla II.2 muestra las condiciones de desarrollo, que dependían del tipo de sistema de tampones.

A los 20' se retiraban los papeles utilizados para la aplicación de las muestras y se establecían las condiciones eléctricas definitivas.

Detención de la electroforesis.- Pasadas de 6 a 9 horas dependiendo del sistema de tampones, el frente de azul de bromofenol se encontraba a 1 ó 2 cm del extremo anodal, deteniéndose entonces la electroforesis. El gel era inmediatamente cortado en láminas de aproximadamente 2-3 mm, utilizándose para la tinción únicamente las cuatro inferiores.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

Se han empleado minigeles cuya concentración era del 10% de poliacrilamida (acrilamida / bisacrilamida en proporción 19:1) siguiendo en todo momento las instrucciones del manual de uso del mini-protean II dual slab cell (Biorad), que ha sido el aparato utilizado.

Como tampones se ha usado el sistema discontinuo de Laemmli (1970), pero sin la adición de SDS.

La tabla II.3 muestra, para cada sistema de tampones, las enzimas estudiadas (que aparecen especificadas de forma abreviada con sus siglas).

TABLA II.3

Sistemas de tampones empleados y enzimas que resuelven.

Sistema de tampones	Enzimas
Sistema LiOH	ADH, DIA, GOT, PGI, PGM, SKDH, TPI
Sistema Chippindale	GOT, ADH, ME, SKDH
Sistema Morfolina	IDH, GDH, MDH, ME, 6PGDH
Sistema Tris-Histidina	ACPH, IDH, ME
Sistema PAGE	SOD, DIA, GDH

Tinción.

A continuación se describen los protocolos de tinción empleados.

En los siguientes protocolos todas las disoluciones se han realizado con agua desionizada previamente destilada.

Las denominaciones completas de diversos productos químicos se recogen en el apartado *abreviaturas* que aparece en las primeras páginas de este trabajo.

ACPH. Fosfatasas Ácidas (EC 3.1.3.2) (= ortofosforil-monoester fosfohidrolasa)

Modificado a partir de Wang & Szmidt (1989) y Soltis et al. (1983).

Incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos:

Tampón Acetato 0.1M. pH 5

Coloración:

T. Acetato 1M pH 5	5 ml.
Agua	44.5 ml.
MgCl ₂ 1M	0.5 ml.
Fosfato ácido de α -Naftil	50 mg.
Fast Garnet GBC sal	50 mg.

Incubación en la oscuridad a 37°C.

ADH. Alcohol Deshidrogenasa. (EC 1.1.1.1) (=Alcohol:NAD⁺ oxidoreductasa)

Modificado a partir de Wang & Szmidt (1989)

Tampón Glicina 1M pH 8.7	5 ml.
Agua	39 ml.
Etanol absoluto	4 ml.
NAD 1%	1 ml.
NBT 0.8%	1 ml.
PMS 1%	100 μ l.

Incubación en la oscuridad a 37°C.

DIA. Diaforasa (EC 1.6.4.3) (= NADH:lipoamida oxidoreductasa)

Modificado a partir de Wang & Szmidt (1989)

Tris-HCl 1M pH 8.0	5 ml.
Agua	44 ml.
DCPIP	3 mg.

38 *Capítulo segundo. Material y Métodos*

β -NADPH 25 mg.
MTT 1 ml.
Incubación en la oscuridad a 37°C.

GDH. Glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2) (= l-glutamato: NAD⁺ oxidoreductasa)

Modificado a partir de Soltis et al. (1983) y Vallejos (1983)

Tris-HCl 1M pH 8.0 5 ml.
Agua 33 ml.
Ácido l-glutámico 1M pH 8.0* 10 ml.
CaCl₂ 10 mM 100 μ l.
NAD 1% 1 ml.
NBT 0.8% 1 ml.
PMS 1% 100 μ l.

* ajustado previamente con NaOH

Incubación en la oscuridad a 37°C.

GOT. Glutamato Oxalacetato Transaminasa (EC 2.6.1.1) (=AAT Aspartato Amino transferasa) (= l-aspartato: 2-oxoglutarato aminotransferasa)

Modificado a partir de Wang & Szmidt (1989)

Tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 35 ml.
Ácido l-aspartico 0.2 M pH 7.5* 8 ml.
 α -ceto-glutarato 1.4% 3 ml.
Albúmina bovina 3% 2 ml.
Piridoxal 5P 0.5% 1 ml.
Fast Blue BB Sal 100 mg.
disuelto en agua 10 ml.

* ajustado previamente con NaOH

Incubación en la oscuridad a 37°C.

IDH. Isocitrato deshidrogenasa (EC 1.1.1.42) (=Threo-D₂-isocitrato:NADP⁺ oxidoreductasa)

Modificado a partir de Soltis et al. (1983)

Tris-HCl 1M pH 8.0 5 ml.
Agua 40.5 ml.
Isocitrato trisódico 150 mg.
MgCl₂ 1M 2.5 ml.
NADP 1% 1 ml.

MTT 0.8%	1 ml.
PMS 1%	100 μ l.

Incubación en la oscuridad a 37°C.

MDH. Malato Deshidrogenasa. (EC 1.1.1.37) (= L-malato:NAD⁺ oxidorreductasa).

Modificado a partir de Soltis et al. (1983)

Tris-HCl 1M pH 8.0	5 ml.
Agua	38 ml.
Ácido dl-málico 2M pH 8.0*	5 ml.
NAD 1%	1 ml.
MTT 0.8%	1 ml.
PMS 1%	100 μ l.

* ajustado previamente con NaOH

Incubación en la oscuridad a 37°C.

ME. Enzima Málico (EC 1.1.1.40) (=L-Malato:NADP⁺ oxidorreductasa)

Modificada a partir de Soltis et al. (1983)

Tris-HCl 1M pH 8.0	5 ml.
Agua	38 ml.
Ácido dl-málico 2M pH 8.0*	5 ml.
MgCl ₂ 1M	1 ml.
NADP 10%	1 ml.
MTT 0.8%	1 ml.
PMS 1%	100 μ l.

* previamente ajustado con NaOH

Incubación en la oscuridad a 37°C.

6PGDH. 6-Fosfo-gluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44) (= 6-fosfo-D-gluconato:NADP⁺ 2-oxidorreductasa)

Modificada a partir de Soltis et al. (1983)

Tris-HCl 0.1M pH 8.0	6 ml.
MgCl ₂ 1M	0.5 ml.
Ácido 6-fosfogluconico Sal trisódica	10 mg.
MTT 0.8%	1 ml.
NADP 10%	1 ml.
PMS 1%	100 μ l.
Agarosa 1%	6 ml.

Incubación en la oscuridad a 37°C.

PGI. Fosfoglucosa Isomerasa. (EC 5.3.1.9) (= GPI Glucosa fosfato isomerasa) (= D-glucosa-6-fosfato cetol isomerasa)

Modificada a partir de Soltis et al. (1983)

Tris-HCl 1M pH 8.0	0.2 ml.
agua	3.8 ml.
MgCl ₂ 1M	1 ml.
Fructosa 6P	5.4 mg.
G6PDH	10 u.
MTT 0.8%	0.5 ml.
NADP 1%	0.5 ml.
PMS 1%	100 µl.
Agarosa 1%	6 ml.

Incubación en la oscuridad a 37°C.

PGM. Fosfoglucomutasa (EC 2.7.5.1) (= α-D-glucosa-1,6-bifosfato:Ó-D-1-fosfato fosfotransferasa)

Modificada a partir de Soltis et al. (1983)

Tris-HCl 1M pH 8.0	5 ml.
Agua	41 ml.
MgCl ₂ 1M	2 ml.
Glucosa 1P	150 mg.
Glucosa 1,6 dP 0.01%	100 µl.
G6PDH	15 u.
NADP 1%	1 ml.
MTT 0.8%	1 ml.
PMS 1%	100 µl.

Incubación en la oscuridad a 37°C.

SKDH. Sikimato deshidrogenasa (EC 1.1.1.25) (sikimato: NADP⁺ 3-oxidorreductasa)

Modificada a partir de Soltis et al. (1983)

Tris-HCl 1M pH 8.0	5 ml.
Ácido sikímico	25 mg.
MTT 0.8%	1 ml.
NADP 10%	1 ml.
PMS 1%	100 µl.

Incubación en la oscuridad a 37°C.

SOD. Superóxido Dismutasa (EC 1.15.1.1.) (= superóxido: superóxido reductasa)

Modificado a partir de Beauchamp & Fridovich (1971).

En oscuridad durante 20 minutos:

T. fosfato 50 mM pH 7.8 15 ml.

NBT 30 mg.

En oscuridad durante 15 minutos:

T. fosfato 50 mM. pH 7.8 15 ml.

TEMED 63 μ l.

Riboflavina 0.5 mg.

A continuación se lavaba con tampón fosfato tres veces y se incubaba en tampón fosfato bajo luz fluorescente hasta que aparecían las bandas de color claro en un fondo oscuro.

TPI. Triosa Fosfato Isomerasa (EC 5.3.1.1) (= D-Gliceraldehido-3-fosfato cetol isomerasa)

Modificada a partir de Soltis et al. (1983)

Tris-HCl 0.1M pH 8.0 6 ml.

EDTA 10 mg.

Arseniato sódico 150 mg.

DHAP 1.5 mg.

G3PDH 75 u.

NAD 10% 1 ml.

MTT 0.8% 0.5 ml.

PMS 1% 100 μ l.

Agarosa 1% 6 ml.

Incubación en oscuridad a 37°C.

Todas las tinciones se llevaban a cabo en bandejas de vidrio. En las coloraciones en las que se empleaba agarosa, esta se añadía en último lugar tras calentarla y esperar que su temperatura bajase a menos de 40°C. El tiempo de incubación dependía de la actividad de los extractos y del tipo de enzima, durando aproximadamente dos horas. Los geles eran entonces inmediatamente fotografiados o esquematizados en una cuadrícula a tal fin, o bien se anotaban los genotipos si habían sido descritos y establecidos anteriormente.

Posteriormente se sumergían en fijador (acético:metanol:agua (1:5:5)) durante al menos dos horas, se eliminaba el acético incubando en una solución de glicerina al 15% donde se mantenían un mínimo de 5 horas y se secaban entre dos láminas de papel de celofán.

Nomenclatura.

Se ha utilizado la nomenclatura empleada por Ellstrand & Lee (1987). Las diferentes zonas de actividad se designan con la abreviatura de la enzima, en letras mayúsculas, seguidas por un número, de tal forma que las zonas más catodales (más lentas) tienen números menores. Así TPI-1 designa la zona más lenta de la Triosa fosfato isomerasa.

Cuando se han identificado ya los genes implicados, estos se nombran de forma similar, pero utilizando minúsculas excepto para la primera letra. Por ejemplo Tpi-1 se correspondería con el gen que expresa la isoenzima más lenta de esta enzima.

Para los alelos se ha seguido el mismo método. Así el tercer alelo más rápido de la Mdh-2 se designa como Mdh-2: 3.

Los genotipos para un gen se designan con las iniciales de este seguidas por dos números que representan los dos alelos presentes. Así Tpi-1: 12 indica un genotipo heterocigoto (con los alelos Tpi-1: 1 y Tpi-1: 2) para el gen Tpi-1.

Análisis de progenies.

Segregación mendeliana.

Se ha comprobado la segregación mendeliana de los diversos loci isoenzimáticos verificando la segregación 1:2:1 en las progenies de individuos heterocigotos. Se ha comprobado esta hipótesis en los siguientes cultivares: B2, B3, BO, C3Td, C3Te, CU, CH, MA, PE, PC, SA, SE, SP78, WH.

Se han utilizado dos tipos de test:

- Ajuste mediante una χ^2 , utilizando el programa Linkage-1, v. 3.50, de Suiter et al. (1983; 1990).
- Mediante métodos basados en estadísticos G, utilizando el programa G-Mendel, v. 1.0, de Liu & Knapp (1990; 1991).

Ligamiento.

Se han estudiado las relaciones de ligamiento existentes entre los siguientes loci: Adh-1, Got-1, Got-2, Idh-2, Mdh-1, Me-1, Pgi-1, Pgm-1, Pgm-2, Skd-1, Tpi-1, Tpi-2 y Tpi-3. De las 78 parejas de genes que se pueden establecer se ha estudiado la segregación conjunta de 64 de estas combinaciones (Tabla III.25).

Las progenies de las autofecundaciones realizadas para comprobar el control genético de los genes isoenzimáticos han sido también el material de base para estudiar las posibles relaciones de ligamiento entre los genes. Estas progenies equivalen a efectos prácticos a la F_2 obtenida del cruzamiento de un individuo heterocigoto para dos loci (gen-1: 12 y gen-2: AB) con otro individuo de idéntico genotipo. En caso de independencia se espera que las semillas producidas por este cruzamiento se ajusten a las siguientes proporciones mendelianas 1:2:1:2:4:2:1:2:1, o lo que es lo mismo:

		Gen-2		
		AA	AB	BB
Gen-1	11	1	2	1
	12	2	4	2
	22	1	2	1

Para comprobar si la segregación conjunta de cada pareja de genes estudiada se ajusta a las proporciones mendelianas esperadas (genes independientes) o se aparta significativamente de ellas (genes ligados) se ha empleado el habitual análisis de χ^2 de contingencia. Para ello se ha utilizado el programa Linkage-1, v. 3.50, de Suiter et al. (1983; 1990) que calcula la fracción de recombinación (r), su error estándar y la probabilidad (p) mediante las técnicas de máxima verosimilitud (Mather, 1951; Bailey, 1961).

Cuando para un determinado par de genes existían datos de varias autofecundaciones se han calculado los parámetros de ligamiento independientemente para cada autofecundación y posteriormente se han

calculado los mismos parámetros agrupando las progenies¹ y siempre que estas fuesen homogéneas. Además no han sido consideradas las progenies que han mostrado, en algún gen, desviaciones altamente significativas con respecto a las proporciones esperadas en la segregación individual de cada locus.

El test de homogeneidad (o heterogeneidad) se ha realizado con el programa RXC proporcionado por el Dr. G. Carmody (Carleton University, Canada). Este software calcula la χ^2 y G de la tabla de datos y proporciona la probabilidad de obtener una tabla de datos con iguales o mayores χ^2 y G. Si la probabilidad es mayor que 0.05 los datos pueden ser agrupados al considerarse homogéneos (G. Carmody, comunicación personal).

Se ha seguido un criterio restrictivo a la hora de considerar ligados dos genes (Szmidt & Muona, 1989; Yu & Kiang, 1993): se utiliza el nivel de significación del 0.01, esto es los loci se consideran ligados cuando la probabilidad asociada a la tabla de contingencia sea menor que 0.01.

Cálculo de los parámetros de diversidad.

Se han calculado varios parámetros que, desde diferentes ángulos, reflejan la diversidad genética que reúne la colección de cultivares:

- Número de loci polimórficos por cultivar
- Polimorfismo o porcentaje de loci polimórficos con respecto al total.
- Número de alelos por cultivar
- Número medio de alelos por gen. Se calculó con todos los loci, independientemente de si son o no polimórficos.
- Diversidad genética (Nei, 1987) o Heterocigosidad media esperada, calculada para cada gen como

$$H = 1 - \sum_{i=1} x_i^2$$

¹ Se han agrupado los resultados de diferentes autofecundaciones siempre que los genotipos fuesen idénticos (o únicamente se diferencien en un alelo) (Torres et al, 1986) y siempre que implicaran igual fase génica (acoplamiento o repulsión). Si estaban en diferente fase se llevaba a cabo un cambio de fase (Krueger & Knapp, 1990) (véase el anexo I).

y ponderando para todos los loci.

- Heterocigosidad observada, calculada como el número de genes heterocigotos dividido por el número total de loci.

Estos parámetros se han calculado para el total de la colección, para los chirimoyos, atemoyos y países de procedencia, así como para cada cultivar. Todos estos índices han sido calculados mediante el programa BIOSIS-1 v. 1.7 (Swofford & Selander, 1989)

También se ha realizado un análisis de la distribución de la diversidad entre los países de procedencia de los cultivares. La diferenciación genética entre los países de procedencia se ha estimado mediante el método de la varianza de Wright (1978), pero puede expresarse en términos de diversidad total (Nei, 1973; 1977). En este caso se puede expresar la diversidad total en los loci polimórficos (H_T) como:

$$H_T = H_s + D_{ST}$$

donde H_s es la diversidad presente en los países de procedencia (diversidad intra-países) y D_{ST} la diversidad entre países de procedencia (diversidad inter-países).

La proporción de la diversidad total que se distribuye entre poblaciones (las diferentes procedencias en este trabajo) es equivalente a G_{ST} (Nei, 1973; 1977; Swofford & Selander, 1989)

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T}$$

BIOSYS-1 calcula varios de estos parámetros, como H_T , expresado como *varianza límite*, D_{ST} como *varianza actual* y F_{DT} . Este último parámetro calculado por biosys-1 es una media ponderada para todos los alelos de un locus y es equivalente a G_{ST} (Ranker, 1992).

La hipótesis nula $G_{ST} = 0$ se comprueba mediante el test de χ^2 de Workman & Niswander (1970) citado por Sherman-Broyles et al. (1992):

$$\chi^2 = 2N_i G_{ST} (k-1)$$

con grados de libertad $(K-1)(s-1)$, donde N_i es el tamaño de la muestra, K el número de alelos y s el número de poblaciones.

Cálculo de las distancias genéticas entre cultivares.

Las distancias genéticas han sido diseñadas para expresar las diferencias genéticas entre dos poblaciones como un valor numérico (Smith, 1977). Se han desarrollado numerosos índices para medir estas diferencias en forma de distancia (Wright, 1978; de Vienne & Damerval, 1985).

Algunas de estas distancias están basadas en principios puramente geométricos (o estadísticos), aunque se han aplicado o desarrollado para el estudio de las diferencias genéticas; es el caso de las distancias euclídeas, de χ^2 (Balakrishnan & Sanghvi, 1969; Benzecri, 1970), de arco y de cuerda (Cavalli-Sforza & Edward, 1967) y otras distancias basadas en la D^2 de Mahalanobis (Sanghvi, 1953; Kurczynski, 1970).

Otras distancias, sin embargo, se basan en modelos genéticos. Dentro de esta categoría podemos incluir las distancias de Nei (1972, 1973, 1978), Rogers (1972), Latter (1972), Reynolds et al. (1983), etc. Hay que hacer mención de que este tipo de distancias no son meramente un instrumento de comparación entre poblaciones, sino que, además, el mismo valor de distancia tiene cierto significado biológico (divergencia evolutiva, tasa de sustitución de aminoácidos, heterocigosidad, etc).

Así, Latter (1973) distingue, desde el punto de vista de su utilidad, tres tipos de distancias:

- medidas descriptivas diseñadas para medir el grado de semejanza genética entre individuos y/o poblaciones. Sería el caso de la mayoría de las distancias "geométricas".

- medidas del coeficiente de parentesco, que miden la probabilidad de que dos alelos, elegidos al azar, del mismo gen sean iguales por descendencia.

- medidas de la divergencia mutacional entre poblaciones que han permanecido aisladas completamente desde su separación.

Ya que en este trabajo se utilizan cultivares propagados vegetativamente y que, al fin de cuentas, son individuos concretos, es más interesante calcular distancias del primer grupo señalado por Latter.

A partir de los genotipos de los cultivares se ha confeccionado una tabla de frecuencias alélicas, con la que se han calculado diversas medidas de distancia.

Se ha calculado una distancia "geométrica", la de χ^2 , que ha sido computada mediante el programa BMDP 2M según la siguiente expresión:

$$D_{\chi^2} = \sqrt{\sum_k \left[\frac{(x_{1k} - e_{1k})^2}{e_{1k}} + \frac{(x_{2k} - e_{2k})^2}{e_{2k}} \right]}$$

donde :

$$e_x = \frac{\sum_l x_l (x_{1l} + x_{2l})}{\sum_l (x_{1l} + x_{2l})}$$

representando x_{1k} la frecuencia del alelo k en el individuo 1, x_{2k} la frecuencia del alelo k en el individuo 2 y l el número de individuos.

También se ha obtenido la distancia de Nei (1978). Este valor carece aquí de su significado evolutivo, pues estamos comparando frecuencias alélicas de individuos, no de poblaciones. Su cálculo se ha realizado con el único propósito de comparar con otros trabajos, pues el índice D es con mucho el más utilizado en la literatura, y no siempre asumiendo su significado genético (Loukas & Krimbas, 1983). Para su cálculo se ha utilizado el programa BIOSYS-1 v. 1.7 (Swofford & Selander, 1989).

Visualización de la matriz de distancias.

La matriz de distancias de χ^2 se ha visualizado gráficamente mediante un programa *ad hoc* desarrollado en C por F. Abarca (Universidad de Granada). Este programa asigna a determinados rangos de distancias una tonalidad de gris, de tal forma que las diferencias entre cultivares pueden reflejarse gráficamente.

Concordancia entre matrices.

A partir de las matrices de distancias no se puede realizar un análisis convencional de correlación, puesto que se requieren datos independientes (Kambhampati & Rai, 1991). Por ello hemos sometido a nuestras matrices de distancias a un test de concordancia. Hemos obtenido el coeficiente de concordancia de Kendall (τ) mediante el programa BMDP. Este parámetro, ya empleado en otras ocasiones para comparar distancias genéticas (Kambhampati & Rai, 1991; Price et al., 1984), puede variar entre 0 y 1, tomando este último valor cuando las distribuciones son totalmente concordantes y 0 cuando no lo son.

Construcción del dendrograma.

Se ha realizado un análisis "cluster" de las matrices de distancia siguiendo el método UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages) (Sneath & Sokal, 1973), que se enmarca dentro de los llamados métodos jerárquicos o secuenciales (Weir, 1990).

Este análisis reúne a los cultivares en base a su mayor similitud (menor distancia), formando agrupamientos denominados clusters. Para realizarlo hemos utilizado los programas NEIGHBOR y DRAWGRAM del paquete PHYLIP 3.4 (Felsenstein, 1991) usando la matriz de distancias de χ^2 .

Análisis factorial (A.F.).

Se han realizado dos tipos de análisis factoriales, el A.F. de correspondencias y el análisis discriminante.

Análisis factorial de correspondencias (AFC).

El análisis factorial de correspondencias es una técnica exploratoria para múltiples variables que transforma tablas de frecuencias en gráficos donde los datos (columnas y filas de la tabla) son representados como puntos. El AFC descompone la χ^2 de asociación de la tabla en sus componentes, de una forma similar a como hace el análisis de componentes principales para datos continuos (Moran et al., 1990).

Siguiendo a Bennaceur et al. (1991) cada alelo se ha considerado un carácter (variable) con tres estados: 0 si ausente, 1 si presente en forma de heterocigoto y 2 si presente como homocigoto. Así se ha construido una tabla con las variables ("estados" alélicos = frecuencias alélicas) como columnas y los cultivares como filas. Para realizar el AFC hemos utilizado el programa BMDP CA.

Análisis discriminante.

El análisis discriminante encuentra la combinación de variables (frecuencias alélicas en nuestro caso) que mejor predice agrupamientos de casos (cultivares) dados a priori. Esta combinación de variables predictivas se denomina función de clasificación (Jennrich & Sampson, 1990).

Se ha realizado este tipo de análisis estadístico para las categorías formadas por los países de procedencia mediante el software BMDP 7M. Este programa va eligiendo variables (alelos) que maximizan el éxito de la función discriminante de forma iterativa. En cada paso la variable que maximiza la separación entre grupos es añadida (o retirada) a la función de clasificación. El programa también evalúa el número de casos correctamente clasificados y presenta una tabla resumen de la clasificación.

Análisis de las relaciones entre los datos agronómicos y los isoenzimáticos

Se ha realizado un estudio de las relaciones existentes entre los datos isoenzimáticos y diversas características de carácter agronómico (pomológicas y foliares principalmente) recogidos por Ramos Díaz (1987), González Yuste (1991), Bueno Sánchez (1992) y Martín Morales (1993) bajo la dirección del Dr. J.M. Farré. De las variables estudiadas por estos autores en el presente trabajo se han contemplado las siguientes:

características pomológicas

- peso del fruto (PESF)
- porcentaje de piel en el fruto (PPIEL)
- porcentaje de corazón (PCOR)
- porcentaje de pulpa (PPUL)

- porcentaje de semillas (PSEM)
- índice de semillas (IS) o número de semillas en 100 g de fruto
- peso de una semilla (PESOSEM)
- carácter de la semilla (CS). Mide si una semilla es encamisada o no. La escala parte de 0 (encamisada) y llega a 2 (semilla suelta).
- resistencia al penetrómetro (RESISP)
- porcentaje de frutos atacados por la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata*) (PCER)
- grados brix de la pulpa (BRIX)
- sabor (SAB). Se mide en una escala que va desde 0 (mal sabor) a 9 (excelente)
- tipo de epidermis (EPID).

características foliares

- longitud de la lámina de la hoja dividida por su anchura a $\frac{1}{2}$ de su longitud (HLA)
- anchura de la lámina de la hoja a $\frac{3}{4}$ de su longitud dividido por la anchura a $\frac{1}{4}$ de su longitud (HAL)
- espesor de la hoja en orientación Sur (HES)
- grosor de la capa de pelos de las hojas orientadas al Sur (HGS)

A partir de estos datos pomológicos (la media por cultivar) recogidos a lo largo de varios años, se han realizado medias ponderadas (con respecto al número de frutos) para la parcela 29 y el Llano. Cuando no se dispone de datos de un cultivar en un determinado año, la media se ha realizado sin considerar ese año. No se han contemplado los cultivares con número de frutos menor a diez. Para el tipo de epidermis se ha asignado un valor numérico a las diferentes morfologías, de tal manera que la epidermis lisa sería representada por 0, impressa por 1, umbonata por 3, mamillata por 4 y tuberculata por 5, en un intento de representar el gradiente de textura de la piel del fruto.

El estudio de las relaciones entre datos agronómicos e isoenzimáticos se ha centrado únicamente en los cultivares de la parcela 29. Se han realizado

varios tipos de análisis: test de concordancia entre matrices de distancias y análisis de regresión.

Análisis de matrices de distancias.

Se ha comparado las matrices de distancias de χ^2 de datos agronómicos y la de frecuencias alélicas obtenidas de los cultivares de la parcela 29. Para obtener la matriz de los datos agronómicos se ha realizado una estandarización de las variables mediante la división por el rango y la resta del valor mínimo. Tanto la estandarización como la obtención de las matrices de distancias de χ^2 se ha realizado con el programa NTSYS-PC v. 1.70 (Rohlf, 1992).

Las matrices se han comparado mediante el test de Kendall (comentado anteriormente) y el test de Mantel (1967). El estadístico Z de Mantel se calcula como:

$$Z = \sum_j \sum_k x_{jk} y_{jk}$$

donde x_{jk} e y_{jk} son los elementos de la j-esima fila y K-esima columna de las matrices X e Y respectivamente. El estadístico de Mantel no proporciona un test paramétrico para comprobar la hipótesis nula (H_0 = el valor de un elemento de X no está relacionado con el correspondiente elemento de Y) (Beer et al., 1993). Sin embargo la distribución de Z para unas particulares X e Y puede estimarse mediante un procedimiento de permutación de las matrices. La significación (p) del test se obtiene por la proporción de permutaciones que arrojan valores mayores que Z, $p > 0.05$ indican que las dos matrices no están relacionadas. Para este análisis se ha establecido 2000 permutaciones. El estadístico normalizado de Mantel es equivalente al coeficiente de correlación de Pearson. Para el cálculo de estos parámetros se ha empleado el programa NTSYS-PC v. 1.70 (Rolf, 1992). Una discusión más detallada de las características de esta prueba estadística puede encontrarse en Hubert (1987), Smouse et al., (1986) y en el manual del NTSYS-PC (Rohlf, 1992).

Análisis de regresión.

Se han realizado varios análisis de regresión (múltiple por pasos y en componentes principales) para encontrar las variables (alelos de los genes

isoenzimáticos) que *explican* mayor cantidad de varianza de las diferentes características agronómicas y para establecer su importancia relativa en la determinación de estos caracteres.

Para realizar el análisis de regresión es necesario que la variable dependiente (en este caso las variables agronómicas) sean *normales*, esto es, su distribución se ajuste a la curva normal. Las variables que no presentaban esta característica se han normalizado mediante la función logaritmo neperiano o elevando al cuadrado.

Como variables independientes se han considerado las frecuencias alélicas, pero de cada gen se eliminó el alelo con menor frecuencia, para así disminuir la cantidad de dependencia estadística en los datos (Xie & Knowles, 1992).

El análisis de regresión múltiple por pasos se ha realizado con el programa Statistica for Windows v. 4.0, fijando como tolerancia 0.01 y como valor de entrada $F = 1.0$. Este tipo de análisis obtiene una recta de regresión del tipo:

$$Y = \text{Interc.} + b_1 \text{ var}_1 + b_2 \text{ var}_2 + b_3 \text{ var}_3 + \dots$$

donde Y representa el valor de una característica agronómica, *Interc.* el valor de intercepción de la recta con el eje y , b_i los coeficientes de regresión parciales y var_i la frecuencia de alelo i en los cultivares.

La regresión sobre componentes principales se ha realizado con el programa BMDP 4R.

Estadísticos simples.

Los test de normalidad, de Student, U de Mann-Whitney, así como los estadísticos descriptivos se han obtenido mediante los programas BMDP y Statistica for Windows v. 4.0.

Capítulo 3
Resultados



□ CAPÍTULO TERCERO □

3. RESULTADOS

Este capítulo comienza con la descripción e interpretación de los zimogramas producidos por los diferentes sistemas isoenzimáticos ensayados. Así mismo se analizarán las relaciones de ligamiento y el control genético de estos loci. A continuación se detallan los resultados obtenidos a partir de los genotipos: diversidad genética, matrices de distancia, análisis de cluster y análisis factoriales. Posteriormente se realiza un estudio de las relaciones entre diversas características pomológicas y los genotipos de los cultivares.

Por último se analizan las relaciones entre los cultivares recolectados en Perú y Ecuador, países de origen de la especie.

3.1 INTERPRETACIÓN DE LOS ZIMOGRAMAS

En este apartado se comentan los resultados obtenidos tras las tinciones específicas para los diversos sistemas enzimáticos analizados. Estos se exponen en orden alfabético. Así mismo se comenta el control génico de las diferentes zonas de tinción y la segregación de los diferentes loci.

ACPH. Fosfatasas ácidas (EC 3.1.3.2)

Las fosfatasas ácidas de plantas son enzimas que típicamente varían en el número de isoenzimas expresadas, el número de compartimentos celulares donde se localizan y el número de subunidades por enzima (Weeden & Wendel, 1990).

En los geles sometidos a tinción para esta enzima hemos encontrado cuatro zonas diferentes de actividad AcpH. Tres de estas, ACPH-1, ACPH-3 y ACPH-4 no muestran zimogramas con la suficiente actividad y constancia para ser interpretados. Estas zonas son representadas como bandas con trama en la fig. 3.1.

En general, la poca reproducibilidad de los patrones AcpH puede ser debida a modificaciones postranscripcionales o postraduccionales, como han sugerido Tyson et al. (1985) en el caso del lino (donde la movilidad de las fosfatasas ácidas y las peroxidases depende de la posición de la hoja), o más específicamente a genes modificadores que actuarían cambiando el peso molecular mediante glicosilación (Fieldes, 1988; Weeden & Wendel, 1990), puesto que las fosfatasas ácidas son usualmente glicoproteínas (Paul & Williamson, 1987).

La única zona de este sistema isoenzimático que ha sido interpretada es la zona ACPH-2, que aparece con una única banda, de idéntica movilidad en todos los cultivares estudiados, incluyendo todas las atemoyas (figura 3.1). Los zimogramas obtenidos a partir de semillas procedentes de autofecundaciones no muestran diferencias en el patrón anteriormente descrito. A la vista de estos resultados podemos considerar a esta zona ACPH-2 como el producto de un gen monomórfico (Acp-2). La falta de variación para este gen impide la determinación de su estructura.

Este enzima se ha descrito en forma de monómero o dímero en diferentes plantas (Gottlieb, 1981; de Cherisey, 1985; Furuya & Ikehashi, 1991).

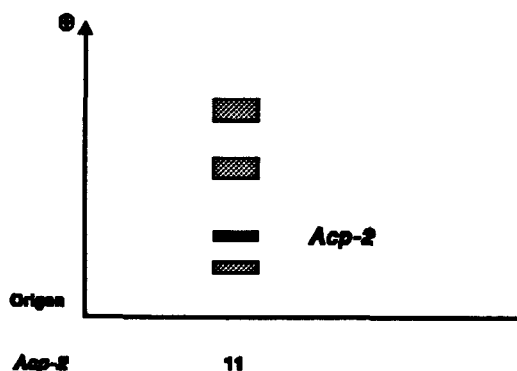


FIGURA 3.1

Zimograma obtenido para el sistema Isoenzimático Fosfatasa Ácida (ACPH)

ADH. Alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1)

La ADH de chirimoyos muestra actividad únicamente en semillas. La ausencia de actividad en hojas es normal en este enzima del metabolismo anaeróbico (Diedenhofen, 1973). Sin embargo, Harry & Kimmerer (1991) han encontrado actividad ADH en hojas de diversos árboles y proponen que esta actividad alcohol deshidrogenasa está presente en los tejidos foliares de todos los árboles, al contrario de lo que sucede en las especies herbáceas, donde habitualmente sólo aparece en semillas y en raíces sometidas a hipoxia.

El aumento de actividad ADH durante la germinación y su posterior descenso es habitual en la mayoría de las plantas (Harry & Kimmerer, 1991) y es justamente lo que sucede en semillas de chirimoyo. Este aumento de la actividad parece deberse a la inducción de ADH ante las grandes demandas de energía durante la germinación y a las condiciones de hipoxia que muestra la semilla debido a su baja relación superficie:volumen y a su alta demanda de oxígeno (Harry & Kimmerer, 1991).

Como no hemos detectado actividad ADH en hojas, para determinar los genotipos de los cultivares se han estudiado un mínimo de ocho semillas procedentes de autofecundaciones de cada cultivar de la parcela 29 (para los cultivares de las otras parcelas no se realizaron autofecundaciones y por tanto no se dispone de datos sobre esta enzima).

Hemos encontrado tres tipos diferentes de segregaciones. En el primer caso observamos fenotipos de una y dos bandas (en la fig. 3.2 se corresponden

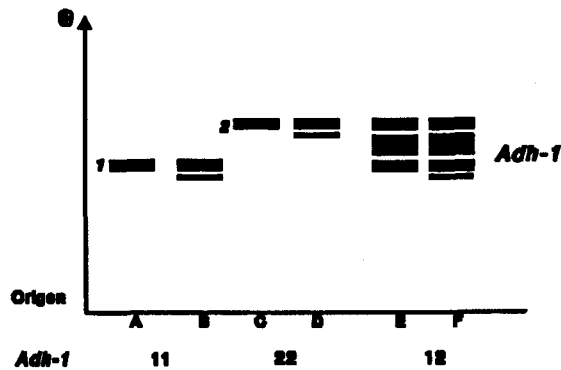


FIGURA 3.2

Zimogramas obtenidos para la Alcohol Deshidrogenasa (ADH)

con el zimograma A y B), siendo en este último caso la más anodal de más intensa coloración. Otro tipo de segregación produce los patrones de bandas C y D de la fig. 3.2, también en este caso la banda más anodal muestra más actividad. Además existen cultivares cuya progenie manifiesta un tercer tipo de segregación, pues encontramos semillas con alguno de los dos fenotipos anteriores (A y B o C y D) y otras con un fenotipo de 3 o 4 bandas (en la fig. 3.2 representados por E y F respectivamente).

Estas segregaciones se han interpretado como producidas por un gen con dos alelos, teniendo en cuenta la naturaleza dimérica de la alcohol deshidrogenasa (recordemos que este enzima ha sido descrito como un dímero en varias especies (Weeden & Wendel, 1990), como el maíz (Freeling & Schwartz, 1973), arroz (Hart, 1970), girasol (Torres, 1974), aguacate (Torres et al, 1978), etc.). De forma que los cultivares homocigotos para el alelo lento producirán los patrones A y B, los homocigotos para el alelo rápido únicamente segregan de una forma (patrones C y D) y los heterocigotos muestran, en su progenie tras autofecundación, los dos tipos anteriores y semillas heterocigotas (patrones E y F) (véase la tabla III.1). Esta interpretación concuerda con las propuestas por Ellstrand & Lee (1987), tras analizar cultivares californianos de chirimoyo, y Perfectti (1992).

Cuando se analizan las progenies obtenidas por autofecundación para diversos cultivares heterocigotos (tabla III.1) se observa que hay segregación mendeliana (1:2:1) salvo en el caso del cultivar Selección Perú 78 (SP78), donde encontramos un exceso de homocigotos Adh-1: 22, y del cv. White, donde el

TABLA III.1

Segregación del locus *Adh-1*

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	p
BO	12	15:21:14	1.320	0.517	1.32	0.517
CH	12	16:23:18	2.226	0.323	2.25	0.324
MA	12	18:26:19	1.952	0.377	1.96	0.376
SP78	12	17:39:52	31.019	0.000	27.05	0.000
PC	12	6:15:12	2.455	0.293	1.73	0.420
PE	12	35:59:27	1.132	0.568	1.11	0.574
SE	12	20:31:19	0.943	0.624	0.71	0.701
WH	12	35:46:22	4.4456	0.108	7.72	0.021

La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad.

El nombre del cultivar aparece abreviado. En la columna denominada 'segregación' aparecen el número de semillas obtenidas para los genotipos 11, 12 y 22 respectivamente. Se considera que la segregación se aparta de lo esperado cuando $p < 0.05$

exceso es para los homocigotos *Adh-1*: 11.

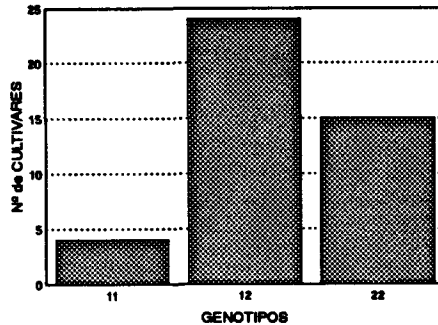
La presencia de homocigotos con una o dos bandas en individuos homocigotos (fig. 3.2) puede explicarse como debida a modificaciones postraduccionales que se produzcan durante diferentes estadios del desarrollo fisiológico de las semillas. La aparición de homocigotos con dos bandas es habitual en otros sistemas isoenzimáticos, sobre todo en coníferas (Ernst et al, 1987; Newton, 1979).

Otra posibilidad es la existencia de otro gen ADH que aunque sus productos no sean activos *per se* si produzcan heterodímeros intergénicos activos, que serían los que explicarían la segunda banda que se observa en los individuos homocigotos. Un caso similar ocurre en maíz (Gottlieb, 1981). Sin embargo, el hecho de que ambas bandas se muevan conjuntamente no apoya esta hipótesis.

Los genotipos de los cultivares de la parcela 29, los únicos estudiados para este gen, se presentan en la tabla III.18

FIGURA 3.3

Distribución de los cultivares atendiendo a su genotipo para el gen *Adh-1*. Como se puede observar, el genotipo *Adh-1: 12* es el más común.



En la muestra estudiada, compuesta por 43 cultivares, se encuentran todos los genotipos posibles (11, 12, 22) de un gen con únicamente 2 alelos. En la figura 3.3 aparece reflejada la distribución de los cv. en cada uno de estos tres genotipos. Se puede observar que la mayoría, aproximadamente un 56%, son heterocigotos.

Así, por ejemplo, todos los cultivares españoles son heterocigotos, excepto Piña que aparece como homocigoto (*Adh-1: 22*). Sin embargo, los cv. de atemoya se muestran como homocigotos (*Adh-1: 22*) para este gen.

DIA. Diaforasa (EC 1.6.4.3)

La tinción para este enzima produce únicamente una zona de actividad con la suficiente resolución como para poder ser interpretada. Esta zona, DIA-1, muestra una única banda de igual movilidad en todos los cultivares (figura 3.4)

Las semillas procedentes de autofecundaciones muestran el mismo comportamiento, así, por ejemplo, las 26 semillas del cruce Fino de Jete x Fino de Jete, aparecen con la misma banda. Estos resultados pueden interpretarse suponiendo un gen monomórfico, Dia-1, que controla esta zona de actividad.

Este enzima ha sido descrito como monómero, dímero y tetrámero en diversas plantas (Weeden & Wendel, 1990), pero en nuestro caso, la falta de variación nos impide determinar su estructura a partir de sus patrones electroforéticos.

En diversas plantas de interés económico se ha analizado este enzima, así

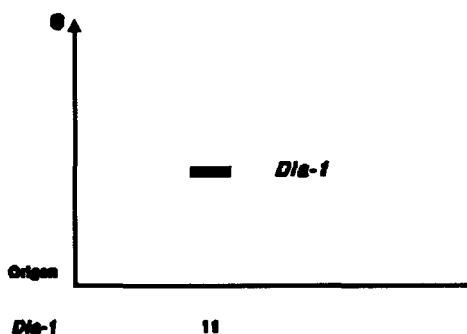


FIGURA 3.4

Zimograma obtenido para la Dlaforasa (DIA).

en manzano aparecen diversas zonas de actividad, pero todas, excepto una, se muestran invariables (Weeden & Lamb, 1985); en *Beta vulgaris* aparece un patrón de bandas complejo y muy influenciado tanto por el ambiente como por la etapa de desarrollo, encontrándose una única zona de actividad codificada por un gen con dos alelos (Van Geyt et al., 1990) y en *Cicer* aparecen hasta cuatro zonas de actividad en hoja y cotiledones, pero se muestran inconsistentes debido a que se ven afectadas por la cantidad de 2,6DCPIP (Gaur & Slinkard, 1990).

GDH. Glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2)

La GDH de chirimoyo manifiesta un patrón de bandas relativamente complejo (figura 3.5). La actividad de este enzima es muy débil y solamente tras largos períodos de tinción suelen aparecer, aunque no siempre, bandas de tenue coloración.

Se han observado dos series de bandas, que podrían englobarse en dos zonas de actividad: GDH-1 y GDH-2. La zona más lenta (GDH-1) presenta hasta un total de siete bandas y la zona GDH-2, la más anodal, únicamente una banda. En algunas especies vegetales se ha observado un patrón de bandas GDH similar al encontrado en chirimoyo.

En la vid, Loukakis & Roubelakis-Angelakis (1991) encuentran en raíz, tallo y hojas un patrón isoenzimático formado por siete bandas equidistantes unas de otras y originado por la unión al azar de 2 diferentes polipéptidos denominados α y β respectivamente, correlacionando la actividad NADH-GDH

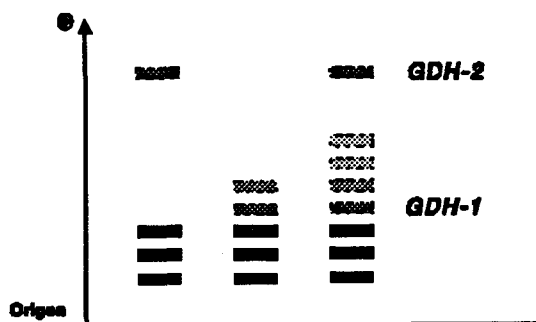


FIGURA 3.5

Algunos de los zimogramas obtenidos para la Glutamato Deshidrogenasa (GDH).

(aminante) con la forma α y la NAD-GDH (desaminante) con la β . Estos dos polipéptidos forman hexámeros, produciendo hasta siete diferentes tipos de isoenzimas: 6α , $5\alpha:1\beta$, $4\alpha:2\beta$, $3\alpha:3\beta$, $2\alpha:4\beta$, $1\alpha:5\beta$, 6β . Sin embargo, estos investigadores no realizan un estudio genético para comprobar el origen de estas dos subunidades.

En *Arabidopsis* se obtiene un patrón de bandas similar y Cammaerts & Jacobs (1983) sugieren que la GDH de esta planta está codificada por dos genes, de tal forma que los polipéptidos α y β no serían productos alélicos de un mismo gen, sino de dos genes diferentes.

A similares conclusiones llegan Ratajczak et al. (1988; 1989) estudiando la GDH en nódulos de *Lupinus*. Estos investigadores obtienen un zimograma similar al obtenido en chirimoyos: una banda de movilidad rápida y una serie de hasta siete bandas con movilidades inferiores. La banda más rápida, a la que denominan Gdh-1, se muestra totalmente diferente de las 7 inferiores, mostrando más actividad con NADP y pareciendo estar codificada por otro gen. En esta planta la serie de hasta siete bandas parece también estar formado por la asociación, al azar y en una estructura hexamérica, de dos diferentes polipéptidos. Al igual que sucede en chirimoyo no siempre aparecen las siete bandas, sino que estas se presentan de forma secuencial, empezando por las de movilidad inferior, dependiendo del estado de desarrollo de la planta.

Patrones similares se han encontrado también en *Medicago sativa* (Hartmann et al, 1973; de Vienne, 1980) y en *Capsella* (Hurka & Düring, 1994).

Así pues, al comparar nuestros resultados con los obtenidos en otras plantas, podría explicarse el zimograma de la GDH de chirimoyo recurriendo a la existencia de tres genes: uno que codifique para la banda rápida (GDH-2) y dos genes que codifiquen para la zona GDH-1. Sin embargo, debido a la poca actividad de este enzima en chirimoyos no ha sido posible comprobar esta hipótesis en las semillas, por ello no hemos utilizado este enzima en la identificación varietal ni en los demás cálculos.

GOT. *Glutamato oxalacetato transaminasa = Aspartato amino transferasa* (EC 2.6.1.1)

La GOT es la enzima que más variabilidad muestra en los cultivares estudiados, llegando a aparecer 34 fenotipos diferentes (fig. 3.6). Por ello su utilidad como marcador en identificación varietal es incuestionable. Estos 34 patrones electroforéticos pueden interpretarse genéticamente como producto de tres zonas de actividad, siendo la superior (GOT-3) monomórfica y las dos inferiores (GOT-1 y GOT-2) variables.

En la zona más cercana al origen, GOT-1, encontramos 9 diferentes genotipos en chirimoyos, que manifiestan fenotipos de una o tres bandas, resultados que están de acuerdo con la naturaleza dimérica de esta enzima, tal y como se ha demostrado en otras especies vegetales (Weeden & Wendel, 1990) (aguacate (Torres & Bergh, 1980), Citrus (Torres et al, 1978), Yamamomo (Handa & Kajiura, 1991) o manzano (Weeden & Lamb, 1985)). Podemos, pues, considerar que esta zona está codificada por un gen, Got-1, que presenta 4 alelos, como demuestra el análisis genético (tabla III.2). En esta tabla se presentan los resultados obtenidos en la segregación de este loci en las progenies producidas por autofecundación en diversos cultivares. En todos los cultivares, salvo en uno, la progenie muestra la segregación 1:2:1 propia de los genotipos heterocigotos. Únicamente en el cultivar Perú Seed 24, hay una distorsión de las proporciones mendelianas esperadas, observándose un déficit de homocigotos para el alelo Got-1: 2.

En atemoyas encontramos para este gen dos genotipos diferentes: Got-1: 33 y Got-1: 34. El primero de ellos muestra un patrón de bandas para esta zona similar al de chirimoyos (figura 3.6, fenotipos AE y AF). Sin embargo Atemoya Gefner, de genotipo Got-1: 34, aparece con únicamente dos bandas de actividad en esta zona GOT-1, como se puede observar en la figura 3.6 (fenotipo AG). La banda que "desaparece" es la heterodimérica, posiblemente debido a que está

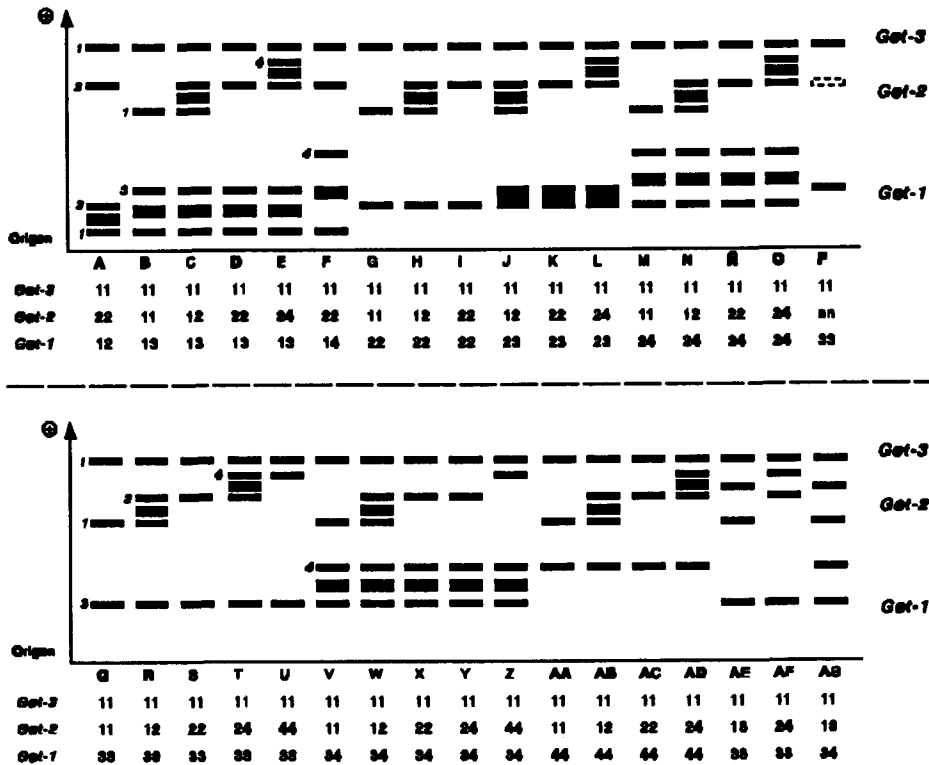


FIGURA 3.6
Zimogramas obtenidos para la Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT).

imposibilitada la formación del heterodímero entre las subunidades codificadas por genes que pueden divergir bastante (recordemos que vienen de especies distintas).

La zona de movilidad intermedia, GOT-2, también presenta variación, apareciendo ocho fenotipos diferentes. Al igual que con GOT-1, también se asume que está codificada por un único gen, Got-2, que posee, en este caso, cinco alelos en los cultivares analizados.

En chirimoyos encontramos fenotipos de una, tres y ninguna banda. Este último fenotipo hemos considerado que se debe al genotipo Got-2: nn, donde la proteína codificada por el alelo que hemos llamado "n" prácticamente carece de actividad, y por ello se puede pensar en un alelo nulo.

En atemoyas, al igual que en el caso de GOT-1, encontramos fenotipos de

TABLA III.2

Segregación del locus Got-1

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	p
B3	13	4:9:7	1.100	0.577	1.03	0.598
MA	24	22:37:10	4.536	0.104	4.97	0.083
PC	24	9:12:5	1.385	0.500	1.31	0.519
PE	23	7:42:25	10.108	0.006	4.08	0.130
SA	34	8:8:3	3.105	0.212	2.83	0.242
SE	34	14:37:18	0.826	0.662	0.86	0.649
WH	23	22:48:34	3.385	0.184	3.21	0.201

La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad

únicamente dos bandas (véase la figura 3.6, fenotipos AE, AF y AG), no apareciendo la banda heterodimérica. Además sólo en estos híbridos aparece el alelo Got-2: 3, el cual probablemente sea un marcador de *A. squamosa*.

La segregación en este locus (Got-2) se ajusta a las proporciones mendelianas esperadas, como se observa en la tabla III.3, donde todas las segregaciones presentan probabilidades mayores de 0.05.

La zona más anodal, GOT-3, descrita anteriormente por Perfectti (1992) y Pascual et al. (1993), no es considerada en estudios previos (Ellstrand & Lee, 1987; Lee & Ellstrand, 1987). En nuestros geles aparece como una única banda de igual movilidad en todos los cultivares estudiados. Esta ausencia de variabilidad no nos permite conocer la naturaleza monomérica o dimérica de la proteína. En todo caso la hemos considerado codificada por un gen monomórfico, Got-3. Los estudios en semillas procedentes de autocruzamientos siguen manteniendo el mismo patrón isoenzimático, apoyando esta hipótesis.

En análisis previos (Ellstrand & Lee, 1987; Lee & Ellstrand, 1987) únicamente se habían puesto de manifiesto dos genes: Got-1 y Got-2, no haciéndose referencia al gen Got-3, quizás debido al uso de diferentes sistemas de tinción y/o extracción lo que puede condicionar la actividad de esta enzima, ya que es muy sensible al pH del tampón de extracción y coloración (Soltis et al., 1983).

TABLA III.3

Segregación del locus *Got-2*

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	p
MA	12	16:36:15	0.403	0.818	0.41	0.816
PE	12	23:55:27	0.543	0.762	0.53	0.767
SA	12	3:3:4	1.800	0.407	1.79	0.409

La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad

En plantas es posible encontrar hasta cuatro tipos de genes GOT en los extractos obtenidos a partir de hojas (Newton, 1983; Weeden 1983; Weeden, 1989). Estos isoenzimas están distribuidos en diferentes compartimientos celulares (citoplasma, cloroplastos, mitocondria y peroxisomas), por lo que no aparecen heterodímeros intergénicos entre ellos. En chirimoyo, al igual que en otras muchas especies vegetales (como en manzano (Weeden & Lamb, 1985), yamamomo (Handa & Kajiura, 1991), la haba, la lenteja, el guisante y la soja (Mancini et al., 1989)) únicamente encontramos tres genes, pues, posiblemente, el isoenzima peroxisomal no se pone de manifiesto debido a su menor actividad en plantas (Huang et al. 1976). Son necesarios estudios más detallados para conocer la localización intracelular de los isoenzimas de la GOT en chirimoyo.

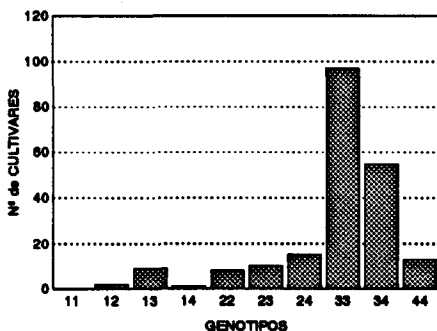


FIGURA 3.7

Distribución en las diferentes clases genotípicas de los cultivares analizados. No se han encontrado cultivares que presenten algunos genotipos (*Got-1*: 11) y casi la mitad de los cv. son *Got-1*: 33

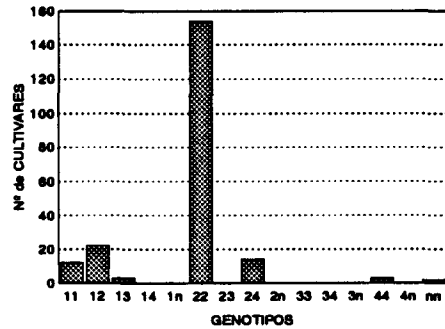
Cuando se considera la distribución de los cultivares para los diferentes genotipos del gen *Got-1* (figura 3.7) se observa el predominio de únicamente

dos genotipos: Got-1: 33, que contabiliza el 46.2% de todos los cv. y Got-1: 34 que representa el 26.2%. Los demas genotipos aparecen en menos de 20 cultivares, lo que supone valores de menos del 10%.

Si analizamos la misma distribución pero para el gen Got-2, se observa que sucede algo parecido, pero en este caso más acentuado (figura 3.8). A pesar de contar con cinco alelos, lo que supone 15 posibles genotipos, los cultivares muestran mayoritariamente (aproximadamente el 73.3%) el genotipo Got-2: 22. El siguiente genotipo con más representación dentro de la colección es el Got-2: 12, que llega a agrupar al 10.5% de los cultivares estudiados.

FIGURA 3.8

Distribución de los cultivares según su genotipo. Más de la tercera parte de los cv. son Got-2: 22



IDH. Isocitrato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49)

Para esta enzima encontramos dos zonas de actividad (figura 3.9). La de movilidad más lenta, IDH-1, se muestra variable, presentando tres fenotipos. La zona IDH-2, más anodal, también es variable, exhibiendo seis fenotipos diferentes.

La zona más catodal (IDH-1) presenta menor actividad que la zona superior, llegando incluso a no detectarse. Encontramos que todos los chirimoyos presentan el mismo patrón: una única banda de igual movilidad. Sin embargo en atemoyas (el híbrido *Annona cherimola* x *A. squamosa*) encontramos dos diferentes patrones electroforéticos (figura 3.9, fenotipos F y G), que junto con el de chirimoyos inducen a pensar que esta zona está codificada por un gen (Idh-1) que presenta dos alelos, uno de ellos, Idh-1: 1,

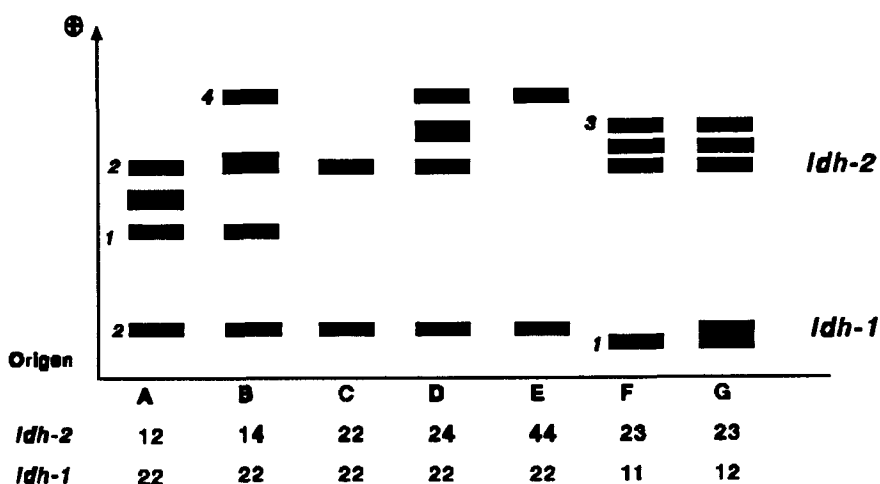


FIGURA 3.9

Zimogramas obtenidos para la Isocitrato Deshidrogenasa (IDH).

exclusivo de las atemoyas. A similares resultados llegan Ellstrand & Lee (1987).

Los cultivares analizados presentan, en la zona superior (IDH-2), seis patrones de bandas. Estos están compuestos de una o tres bandas (figura 3.9). Estos zimogramas pueden ser explicados como productos de un gen (*Idh-2*), con cuatro alelos, que produce una enzima dimérica (igual que en *Prunus* (Mowrey & Werner, 1990), manzano (Weeden & Lamb, 1985) o melocotón (Mowrey et al. 1990)). Así, el fenotipo C de la figura 3.9, (el más común en los cultivares españoles) sería el resultado del alelo *Idh-2*: 2, siendo estos

TABLA III.4

Segregación del locus *Idh-2*

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	p
C3te	24	7:12:10	1.483	0.476	1.83	0.401
CU	24	27:45:33	2.829	0.243	2.75	0.253
SP78	24	28:52:27	0.103	0.950	0.06	0.973
PC	24	9:15:10	0.529	0.767	0.52	0.769
PE	24	29:64:38	1.305	0.521	0.28	0.527
WH	12	13:39:18	1.629	0.443	1.73	0.422

La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad

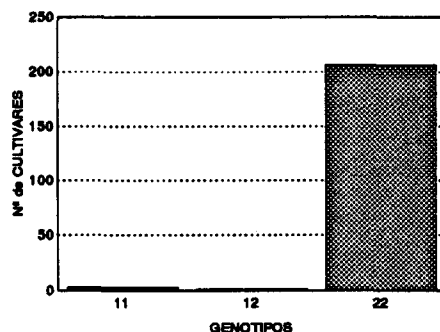
cultivares, por tanto, homocigotos Idh-2: 22.

Los fenotipos que muestran tres bandas se corresponden con genotipos heterocigotos (Idh-2: 12 el patrón A, Idh-2: 14 el zimograma B, etc.). El alelo Idh-2:3, al igual que pasa con el Idh-1:1 no aparece en los cultivares de chirimoyo, pues únicamente se encuentra en atemoyas, y posiblemente se traten de alelos que proceden de *A. squamosa*.

Esta interpretación esta de acuerdo con anteriores resultados (Ellstrand & Lee, 1988) y concuerda con el análisis de las progenies obtenidas por autofecundación (Tabla III.4). En dicha tabla se observa que todas las descendencias se ajustan ($p > 0.05$) a las proporciones esperadas (1:2:1) para la segregación de un cruce entre heterocigotos.

FIGURA 3.10

Distribución de los cultivares de la colección para los diferentes genotipos del locus Idh-1



La figura 3.10 muestra graficamente como está distribuida la variabilidad para Idh-1 en la colección de cultivares. Como se aprecia claramente, prácticamente todos los cultivares (el 98.1%) son de genotipo Idh-1: 22. únicamente las atemoyas presentan otros genotipos.

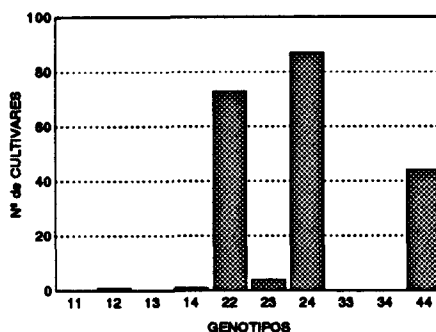
De igual forma, la figura 3.11 presenta la distribución para el locus Idh-2. Se puede observar que aproximadamente el 98% de los cultivares presenta alguno de estos tres genotipos: Idh-2: 24 (41.4%), Idh-2: 22 (34.8%) y Idh-2: 44 (21.0%). Además se observa la baja frecuencia de los genotipos para el alelo Idh-2: 1, no apareciendo homocigotos Idh-2: 11.

Es habitual encontrar en plantas un único locus para la isocitrato deshidrogenasa, que manifiesta la naturaleza dimérica de esta enzima y que se encuentra en el citosol (Weeden & Wendel, 1990). Sin embargo, no es raro,

encontrar un segundo gen Idh, tal y como sucede en manzano (Weeden & Lamb, 1985). Esta segunda isoenzima IDH suele mostrar poca actividad, encontrándose en los límites de detección con las técnicas de electroforesis en geles de almidón, y se piensa que está ligada a los plastos (Weeden & Wendel, 1990).

FIGURA 3.11

Nº de cultivares para cada genotipo del locus *Idh-2*. Diversas clases genotípicas están vacías, al no aparecer cv. que las presenten.



MDH. Malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37)

Dos zonas con actividad MDH se observan en los geles teñidos para esta enzima. La zona de movilidad inferior (MDH-1) es variable, mostrando seis fenotipos diferentes. La zona superior, al contrario, no presenta variación.

La zona MDH-1 presenta seis patrones de bandas diferentes (figura 3.12). Hemos interpretado estos zimogramas como producto del gen *Mdh-1*, que muestra variabilidad, encontrándose tres alelos, interpretación que concuerda con la de Lee & Ellstrand (1987). El patrón más común en esta zona para el total de los cultivares analizados (el A de la figura 3.12) presenta una única banda, correspondiente al electromorfo de menor movilidad. Este fenotipo se interpreta como el genotipo homocigoto *Mdh-1*: 11. Otros patrones unibandeados, para esta zona, son el D y F, que pueden interpretarse como resultado del genotipo *Mdh-1*: 22 y *Mdh-1*: 33 respectivamente. En otros cultivares aparecen patrones de tres bandas (fenotipos B, C y E). Es el típico esquema que muestran los heterocigotos en los enzimas diméricos. Estos

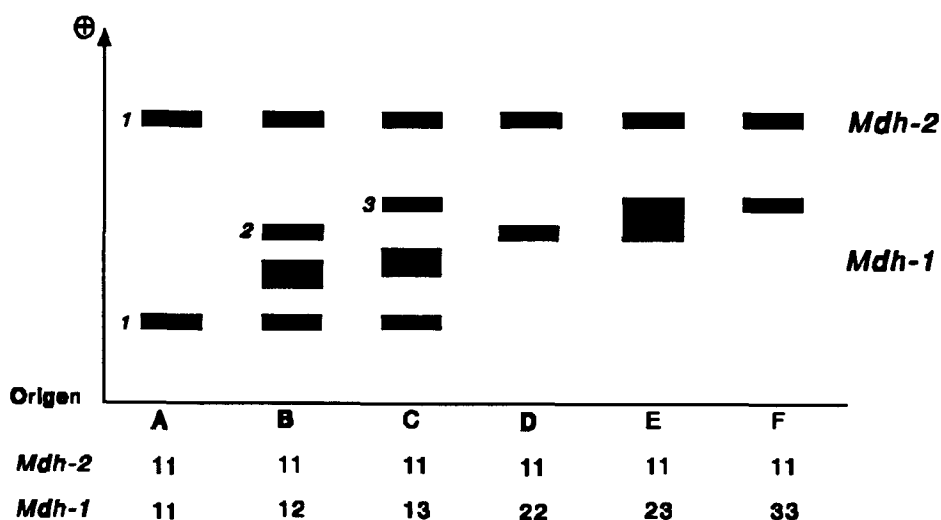


FIGURA 3.12

Zimogramas obtenidos para la Malato deshidrogenasa (MDH).

fenotipos presentan tres bandas correspondientes a los electromorfos lento, más rápido y al heterodímero entre ambos.

Los cultivares de atemoya no presentan, en este caso, ni genotipos ni fenotipos característicos y propios.

Cuando se considera la segregación de este locus (*Mdh-1*) se observa que se ajusta a la segregación mendeliana esperada (tabla III.5), salvo en el caso del cultivar californiano Chaffey Riverside, con $p < 0.01$, donde aparece un exceso de homocigotos 11 y un déficit de los homocigotos *Mdh-1*: 22 con respecto a las proporciones esperadas (1:2:1).

La zona más anodal MDH-2 se muestra como monomórfica, tanto en los cultivares aquí estudiados como en los cv. californianos analizados por Ellstrand & Lee (1987), presentando una única banda en todos los cultivares.

La figura 3.13 presenta la distribución de los cv. entre los genotipos para el gen *Mdh-1*. Se advierte la presencia mayoritaria del genotipo *Mdh-1*: 11, que con 142 cv. representa el 67.6% de toda la colección. De igual forma cabe destacar la poca presencia del genotipo *Mdh-1*: 22, tan solo encontrado en cuatro cultivares.

Durante el proceso de germinación el patrón de bandas se complica con

TABLA III.5

Segregación del locus *Mdh-1*

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	p
BO	12	10:30:10	2.000	0.368	2.01	0.365
C3te	12	9:13:7	0.586	0.746	0.56	0.755
CU	12	26:60:19	3.076	0.215	3.24	0.198
CH	12	25:28:7	11.067	0.004	11.60	0.003
PC	12	11:23:15	0.837	0.658	2.17	0.338
PE	12	35:74:25	2.955	0.228	5.00	0.082
SA	13	5:16:7	0.857	0.651	1.21	0.547

La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad

la aparición de nuevos electromorfos. Estas nuevas bandas pueden deberse a la acción de genes modificadores que producirían cambios en las proteínas con actividad MDH que serían detectados como nuevas bandas. Para la MDH se han descrito en varios vegetales (Maíz, lino, etc) la acción de genes de este tipo (Weeden, 1989; Harry, 1983; Miller, 1985; Doebley et al., 1986, Goodman et al., 1980, Fieldes & Dixon, 1988). Otra posibilidad a considerar es la detección de nuevos genes MDH que únicamente se expresen en esa etapa del desarrollo de la planta. La comprobación de alguna de estas hipótesis requiere otro tipo de estudios.

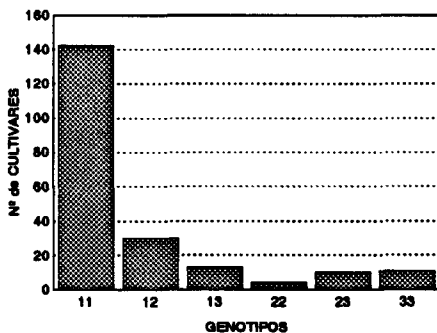


FIGURA 3.13

Distribución de los cultivares en las diferentes clases genotípicas del gen *Mdh-1*. Más de dos tercios de los cv. son *Mdh-1*: 11.

El zimograma básico de la MDH es similar al de algunos otros árboles frutales (caso del melocotonero (Monrey et al., 1990), aguacate (Torres & Bergh, 1980), Prunus (almendro, ciruelo, etc.) (Mowrey & Werner, 1990).

En vegetales se han encontrado hasta 3 Mdh's: en el citoplasma, en la mitocondria y, en algunos casos, en los microcuerpos -aún poco estudiada- (Torres & Bergh, 1980; Hancock & Jezzoni, 1988; Weeden & Wendel, 1990). Sería interesante realizar estudios acerca de la localización intracelular de estos isoenzimas, sin embargo, ya que en general los genes nucleares que codifican enzimas de los orgánulos suelen mostrar menor variabilidad (Gottlieb, 1981), una primera hipótesis sería suponer que la MDH-2 fuese la mitocondrial.

ME. Enzima málico. (EC 1.1.1.40)

Una única zona de actividad (ME-1) aparece en chirimoyo para este enzima, presentando hasta tres fenotipos diferentes, de una o de dos bandas (Fig. 3.14). Este enzima ha sido descrito para chirimoyo anteriormente por Perfectti (1992) y Pascual et al. (1993).

La mayoría de los cultivares, incluyendo a los ocho españoles, muestran una única banda de movilidad lenta (patrón C). Algunos cultivares, incluyendo a todas las atemoyas, presentan el patrón A, con una banda un poco más rápida. Por último, el tercer patrón, es el formado por dos bandas, coincidentes

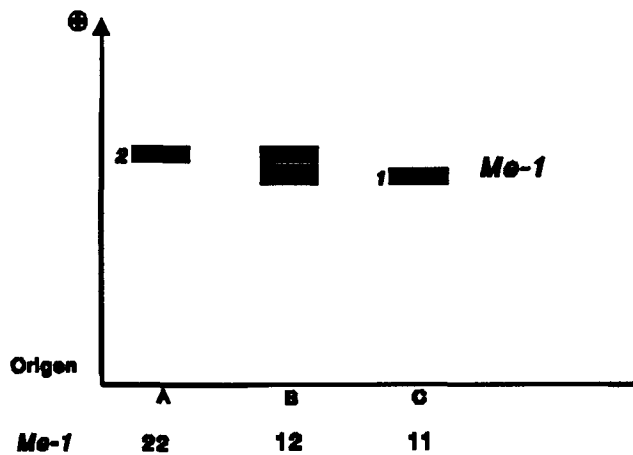


FIGURA 3.14
Zimogramas para la enzima málico (ME)

en movilidad con los electromorfos de los patrones A y C.

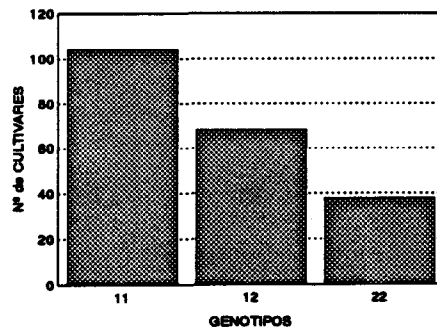
Estos patrones se pueden interpretar como producidos por un locus (Me-1) con dos alelos (Me-1: 1 y Me-1: 2) que muestran una ligera diferencia de movilidad. Así el patrón A correspondería al genotipo Me-1: 22, el B al Me-1: 12 y el C al Me-1: 11. (Figura 3.14).

Al analizar los autocruzamientos (tabla III.6) de algunos individuos dibandeados (patrón B) se observa que su segregación se ajusta a la esperada 1:2:1 (homocigotos lentos : heterocigotos : homocigotos rápidos), lo que demuestra que son individuos heterocigotos (Me-1: 12). Así, por ejemplo, SP78 x SP78 con una progenie estudiada de 108 semillas muestra una relación 26:50:32, que se ajusta a lo esperado, o en CU x CU con 105 semillas, que presenta los siguientes datos: 35:51:20. Observamos que en el cruce CU x CU se produce un ligero exceso de homocigotos Me-1: 11, pero sin llegar a tener significación estadística. Sin embargo en la progenie obtenida por autofecundación de Peru Seed 24 si encontramos una desviación estadísticamente significativa de la proporción mendeliana esperada.

El hecho de que los heterocigotos manifiesten un zimograma dibandeado nos induce a pensar que este enzima tiene una estructura monomérica. A similares conclusiones se ha llegado en Cicer (Gaur & Slinkard, 1990).

FIGURA 3.15

Abundancia de los diversos genotipos para Me-1 en la colección de cultivares.



En cuanto a la abundancia de los genotipos para este gen (Me-1) en la colección, se puede decir, tal y como se observa en la figura 3.15, que los tres genotipos están bien representados, pero predomina el Me-1: 11, que llega a acumular prácticamente a la mitad de los cultivares estudiados (un 49.5%, esto

TABLA III.6

Segregación del locus Me-1

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	p
CH	12	20:24:15	2.898	0.235	3.20	0.202
C3te	12	7:12:10	1.483	0.476	1.40	0.497
CU	12	34:51:20	3.819	0.148	3.76	0.153
SP78	12	26:50:32	1.259	0.533	1.21	0.545
PE	12	45:49:36	9.123	0.010	8.32	0.016
SA	12	7:10:6	0.478	0.787	0.47	0.791

La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad

es 104 cv.).

6-PGDH. 6 Fosfogluconato deshidrogenasa. (EC 1.1.1.44)

Una única banda, de igual movilidad, aparece en todos los cultivares estudiados en la presente memoria. La 6PGDH es, por tanto, monomórfica.

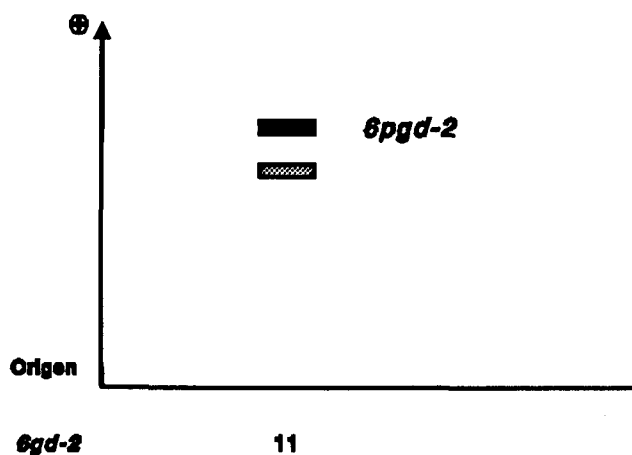


FIGURA 3.16

Zimogramas obtenidos para la 6- Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH).

Esta banda se corresponde, tanto en comportamiento como en movilidad, con la 6Pgd-2 descrita por Ellstrand & Lee (1987). Estos autores describen, además, un segundo gen (6Pgd-1) variable.

En la mayoría de las plantas es habitual encontrar dos zonas de actividad 6PGDH (es el caso del almendro y melocotonero (Mowrey et al. 1990), del manzano (Weeden & Lamb, 1985), *Chamaecyparis obtusa*, *Picea glauca* y *Criptomeria japonica* (Uchida et al, 1991), etc.), por lo que resulta extraño no encontrar en nuestros geles este segundo gen 6Pgdh. Una posible explicación de la pérdida de actividad pudiera encontrarse en el efecto del sistema de extracción o al tiempo de almacenaje de las muestras. Staub et al. (1986) trabajando con pepino, han demostrado que la desaparición de ciertas bandas de este enzima era debida al efecto de ciertos sistemas de extracción.

En ocasiones hemos observado que en algunos geles aparecen bandas que podrían corresponderse con la 6-PGD-1 (representadas en la figura 3.16 como una banda con trama). Sin embargo estos electromorfos no siempre se presentan, y si lo hacen es de forma débil. Por ello no han sido considerados en el presente estudio.

PGI. Fosfoglucosa isomerasa. (EC 5.3.1.9)

Los geles sometidos a tinción para la glucosa 6-P isomerasa muestran dos zonas de actividad, mostrando variabilidad una de ellas (figura 3.17).

La zona menos anodal, denominada PGI-1, muestra el característico patrón

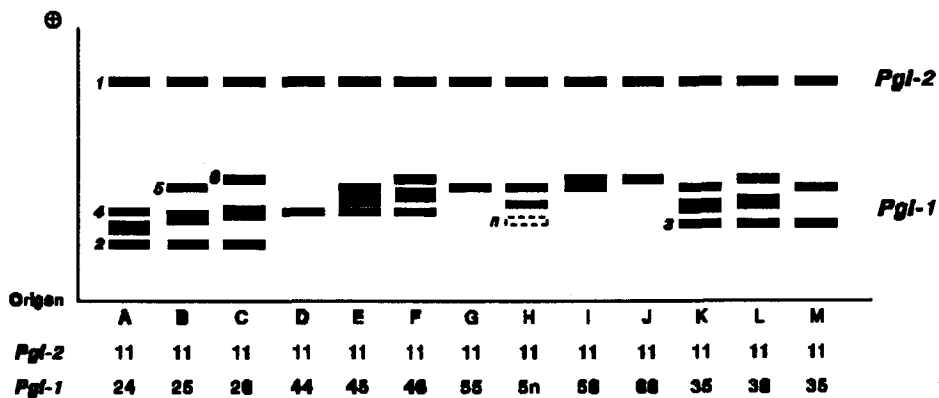


FIGURA 3.17

Zimogramas obtenidos de geles teñidos para la Fosfoglucosa isomerasa (PGI).

de una o tres bandas típico de los enzimas diméricos (Higgins & Gottlieb, 1984; Staub et al, 1985). Como queda reflejado al analizar las progenies de diversas autofecundaciones (tabla III.7), donde todas se ajustan a las proporciones esperadas en la autofecundación de un heterocigoto, se asume que esta zona está codificada por un único gen denominado Pgi-1, tal y como propusieron Ellstrand & Lee (1987). El gen Pgi-1 muestra 5 alelos con actividad y uno nulo en los cultivares objeto de estudio. Los más frecuentes son los alelos Pgi-1: 4 y Pgi-1: 6, puesto que la mayoría de los cv estudiados aparecen como homocigotos (fenotipos D y J) de la figura 3.17) para estos alelos, llegando a representar el 36.2 y el 17.1% respectivamente (véase la figura 3.18).

Los restantes alelos aparecen en, relativamente, pocos cultivares. El alelo Pgi-1: 2 muestra una movilidad bastante menor en comparación con los otros alelos. Aunque no encontramos homocigotos para este alelo (figura 3.17) si aparece en combinación con los demás, formando genotipos heterocigotos. La proteína codificada por Pgi-1: 5 muestra una movilidad ligeramente menor que la de Pgi-1: 6, por lo que es difícil diferenciarlos si los electromorfos no se han desplazado lo suficiente durante la electroforesis (para ello es necesario aumentar el tiempo de electroforesis).

En el cultivar americano Bays encontramos un alelo nulo. Bays muestra un genotipo Pgi-1: 5n, que se manifiesta en un fenotipo dibandeado. Estas dos bandas son la manifestación del alelo Pgi-1: 5 y del heterodímero formado entre este alelo y el nulo (Ellstrand & Lee, 1987), la banda correspondiente al homodímero no aparece, puesto que carece de actividad.

En atemoya encontramos un alelo exclusivo de estos cultivares, el Pgi-1: 3. Este alelo codifica para una proteína de movilidad electroforética media. En el caso del cultivar Joy encontramos un patrón de dos bandas y pensamos que se debe al comportamiento, que ya hemos comentado anteriormente, de las atemoyas, que al ser híbridos, no siempre forman el heterodímero entre los polipéptidos codificados por alelos que, al menos teóricamente, provienen de especies diferentes. El alelo Pgi-1: 1 descrito por Ellstrand & Lee (1987) no aparece en estas selecciones.

La zona PGI-2 aparece como monomórfica (figura 3.17), estando codificada por el gen Pgi-2. Si la electroforesis se deja continuar durante 12 horas o más, pueden aparecer diferencias de movilidad en esta zona. Así Corazón y Bays han mostrado, en geles con una gran separación entre bandas, un patrón tribandeado. Este esquema de 3 bandas podría corresponderse con un genotipo

TABLA III.7

Segregación del locus Pgi-1

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	p
BO	46	11:23:16	1.320	0.517	1.25	0.535
C3td	25	4:12:8	1.333	0.513	1.36	0.507
MA	25	21:34:15	1.086	0.581	1.14	0.567
WH	46	29:50:26	0.410	0.815	0.26	0.879

La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad

heterocigoto. Sin embargo al analizar la segregación no hemos encontrado estas diferencias, es por ello que, a falta de otras evidencias, seguimos considerando la Pgi-2 como monomórfica. Un fenómeno similar es comentado por Knerr & Staub (1992) estudiando PGI en *Cucumis sativus*, sugiriendo que los fenotipos tribandeados se deben a cambios ontogénicos; estos fenotipos aparecen en tejidos procedentes de los cotiledones aún no expandidos plenamente, mientras que patrones de una única banda se manifiestan en los cotiledones totalmente expandidos de los *seedling* (Knerr et al., 1989).

Al igual que en la mayoría de las plantas (Gottlieb, 1981; Parfitt & Arulsekar, 1989) uno de los dos genes Pgi suele ser invariable (Gottlieb, 1981) y migrar más rápidamente que la fracción citosólica (Weeden & Wendel, 1990). Esta zona invariable (en chirimoyos PGI-2) se asocia con el cloroplasto, aunque el gen que la codifica sea nuclear. Gottlieb (1981) explica la falta de variabilidad del enzima cloroplastidial basándose en los requerimientos conformacionales del enzima que debe realizar su función en el particular ambiente del cloroplasto y que debe migrar desde el citoplasma al orgánulo.

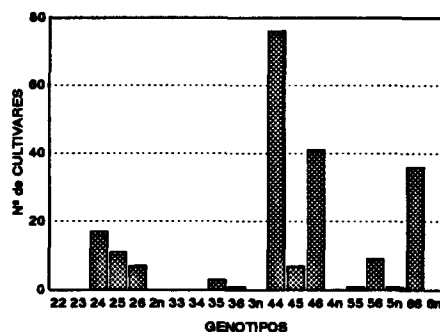
Por último cabe mencionar un posible tercer gen Pgi. En extractos de semilla suele aparecer una banda, ligeramente más anodal que la PGI-2, que podría corresponderse con un gen que se expresase en alguna etapa del proceso que conduce a la germinación y desarrollo de la plántula, pues no siempre aparece en todas las semillas. En otras plantas como la Pacana aparecen bandas adicionales en el cotiledón (Staub et al., 1985; Marquard & Skopenske, 1989). En nuestro caso estas bandas podrían deberse a modificaciones de los electromorfos o bien tratarse de un nuevo gen. Pero el problema de que se exprese exclusivamente en momentos concretos del

desarrollo ha impedido su estudio, con lo que se ha optado por no considerarlo en los cálculos posteriores.

El gen Pgi-1 es el que más alelos presenta en chirimoyo, habiéndose encontrado hasta siete variantes alélicas. En los cultivares aquí estudiados aparecen 6 de estos alelos, Pgi-1: 2, 3, 4, 5, 6 y un nulo (n), no encontrándose el alelo 1. A pesar de contar con seis alelos, el sistema isoenzimático PGI únicamente identifica al cultivar Bays (patrón H), que presenta el genotipo Pgi-1:5n, y al cultivar Joy, una atemoya. Y esto es así debido a que dos alelos (Pgi-1: 4 y Pgi-1: 6) aparecen en casi todas las selecciones. No es de extrañar, por tanto, que los homocigotos Pgi-1: 44 y Pgi-1: 66 representen el 53.3 % de los cultivares (figura 3.18)

FIGURA 3.18

Clases genotípicas para el gen Pgi-1 y nº de cultivares que las presentan. No se ha representado las clases correspondientes del alelo Pgi-1: 1 al no aparecer en los cv. de esta colección.



PGM. Fosfoglucomutasa (EC 2.7.5.1)

El patrón isoenzimático de la fosfoglucomutasa en chirimoyo es relativamente complejo. Esta complejidad viene determinada por el hecho de que los isoenzimas correspondientes a los diferentes genes tienen movilidades electroforéticas que hacen que los electromorfos no se distribuyan en zonas separadas (figura 3.19).

Ellstrand & Lee (1987) describen dos genes PGM en *A. cherimola*: el menos anodal, Pgm-1, invariable en todos los cultivares analizados por estos investigadores, y Pgm-2, variable y con una mayor movilidad de sus electromorfos.

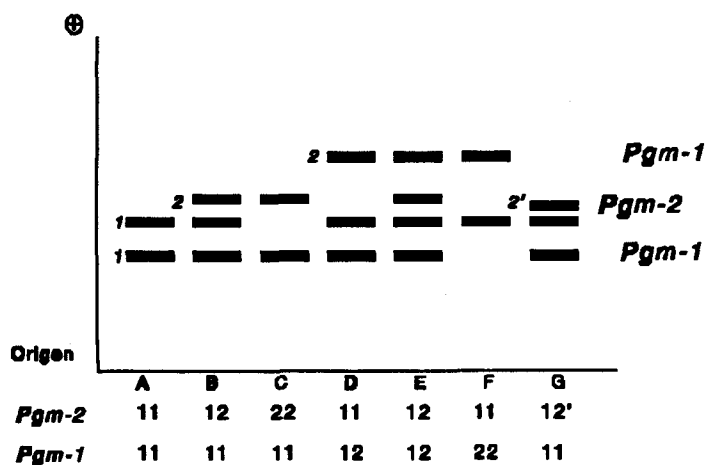


FIGURA 3.19

Esquema de los patrones de bandas obtenidos para el sistema PGM.

Nuestros análisis también revelan la existencia de dos genes, pero ambos con variabilidad. El gen *Pgm-1* muestra dos electromorfos que se corresponden con dos alelos. *Pgm-1: 1* que aparece como la banda más catodal y *Pgm-1: 2* como la más anodal en los gels. Entre estas dos movilidades quedan englobados los electromorfos del otro gen: *Pgm-2*.

El que un gen tenga electromorfos de mayor y menor movilidad electroforética que otro no es tan inhabitual como pudiera parecer (Gillet & Hattermer, 1989), dándose este caso, por ejemplo, en la PGM de la frambuesa (Cousineau et al., 1993), la PGM de maíz (Stuber & Goodman, 1983) y en otros sistemas isoenzimáticos como en la GOT de Cicer (Gaur & Slinkard, 1990), en la de *Vicia faba* (Mancini et al., 1989), o en la MDH de *Beta vulgaris* (Cousineau & Donnelly, 1987; Van Geyt et al., 1990), o en la LAP de maíz (Gottlieb, 1981).

Como ya hemos comentado *Pgm-1* incluye dos alelos en los cultivares aquí estudiados, siendo el alelo *Pgm-1: 1* el más común, encontrándose en prácticamente la totalidad de los cultivares (figura 3.20). Como heterocigotos *Pgm-1: 12* aparecen 17 cultivares. Únicamente hemos encontrado dos homocigotos para el alelo rápido.

La existencia de individuos con cuatro bandas (patrón E), anteriormente no explicados (Ellstrand & Lee, 1987), nos indujo a sospechar la existencia de otro gen o bien que la *Pgm-1* presentaba dos alelos con mayor y menor movilidad que los de *Pgm-2*. Las semillas procedentes de autofecundaciones

TABLA III.8

Segregación del locus Pgm-1

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	p
B2	12	26:51:18	1.863	0.394	1.98	0.372
B3	12	7:8:5	1.200	0.549	1.14	0.565
BO	12	12:21:12	0.200	0.905	0.20	0.905
WH	12	54:47:31	18.955	0.000	14.64	0.001

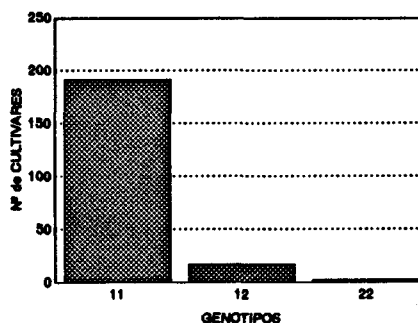
La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad

confirman esta última hipótesis, o sea, que las dos movilidades extremas son productos alélicos de un mismo locus. Así tras analizar 95 semillas procedentes del cruce Bolivia Seedling #2 x Bolivia Seedling #2 obtenemos resultados (vease la tabla III.8) que se ajustan a las proporciones esperadas (1:2:1). Igual sucede para las autofecundaciones de Bolivia Seedling #3 y Bonita. Sin embargo en la descendencia del autocruce del cultivar White (de genotipo Pgm-1: 12 y Pgm-2: 11) obtenemos una distorsión de la segregación esperada (tabla III.8). De todas formas la banda correspondiente al gen Pgm-2 siempre apareció, significando que WH era homocigoto para este gen.

Ellstrand & Lee (1987) y Lee & Ellstrand (1987) interpretaron la movilidad del electromorfo codificado por Pgm-1: 2 como la de un electromorfo codificado por un alelo del gen Pgm-1. Sin embargo aunque habían estudiado el cultivar Bonita (genotipo: Pgm-1: 12, Pgm-2: 12) no llegaron a interpretarlo.

FIGURA 3.20

Nº de cultivares que aparecen en cada clase genotípica del locus Pgm-1.



El segundo gen (Pgm-2) presenta tres alelos que codifican electromorfos de movilidades intermedias (figura 3.19). El más lento (Pgm-2: 1) esta presente en prácticamente la totalidad de los cultivares (figura 3.21), excepto en uno (Booth). Los homocigotos para este alelo son los genotipos más habituales en esta muestra de cultivares. Sin embargo sólo hay un representante de los homocigotos Pgm-2: 22, el cv. Booth. Únicamente este cultivar, con un patrón de bandas C en la figura 3.19, (Pgm-1: 11, Pgm-2: 22) queda totalmente identificado con tan sólo este sistema isoenzimático.

En tres de las atemoyas (AA, AG, JOY) encontramos un alelo exclusivo de estas, el Pgm-2: 2', que confiere una movilidad intermedia a sus electromorfos (figura 3.19). Todas las atemoyas son heterocigotas para este gen.

Cuando se estudian las progenies obtenidas por autofecundación (tabla III.9) de cultivares heterocigotos para este gen (Pgm-2) se observa que hay bastantes cruces donde se han producido desviaciones respecto a las proporciones (1:2:1) esperadas.

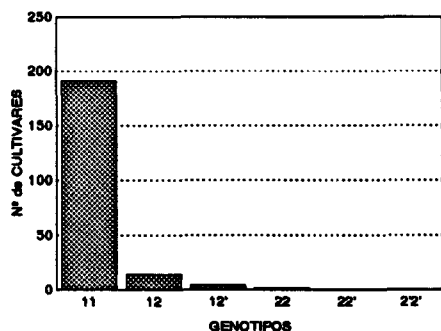


FIGURA 3.21

Nº de cultivares presentes en cada clase genotípica del gen Pgm-2.

La ausencia de bandas heterodiméricas en los heterocigotos nos induce a considerar la PGM de chirimoyo como un enzima funcionalmente monomérico. Similares resultados se han encontrado en multitud de organismos como Pinus, Phlox, Citrus, el aguacate o el maíz (Torres et al., 1978; Torres & Bergh, 1980; Stuber & Goodman, 1983; Nowrey et al, 1990).

TABLA III.9

Segregación del locus *Pgm-2*

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	p
B2	12	30:45:20	2.368	0.306	2.28	0.320
B3	12	6:9:5	0.300	0.861	0.29	0.864
BO	12	15:15:14	5.178	0.075	5.23	0.073
MA	12	20:34:16	0.514	0.773	0.13	0.936
PC	12	23:8:3	33.059	0.000	19.77	0.000
SA	12	10:7:3	6.700	0.035	3.31	0.191
SE	12	30:25:15	12.143	0.002	10.89	0.004

La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad

SKDH. Siquimato deshidrogenasa (EC 1.1.1.25)

Como se observa en la figura 3.22, esta enzima muestra una zona de actividad donde aparecen de dos a tres bandas.

El electromorfo de mayor movilidad aparece siempre en todos los cultivares, y se diferencia de las otras bandas por una actividad más difusa. Este electromorfo, que siempre aparece en las progenies, se puede considerar como codificado por un gen monomórfico, al que hemos designado como Skd-2, debido a la mayor movilidad de sus electromorfos.

Las dos bandas inferiores pueden ser interpretadas como el producto de un solo gen (Skd-1) que mostraría dos fenotipos en estos cultivares:

- el primero con un único electromorfo (patrón B de la fig. 3.22), una banda de movilidad rápida que puede considerarse como el producto del alelo Skd-1: 2

- el segundo, un patrón dibandeado (fenotipo A de la figura 3.22), que puede considerarse producto de un genotipo Skd-1: 12.

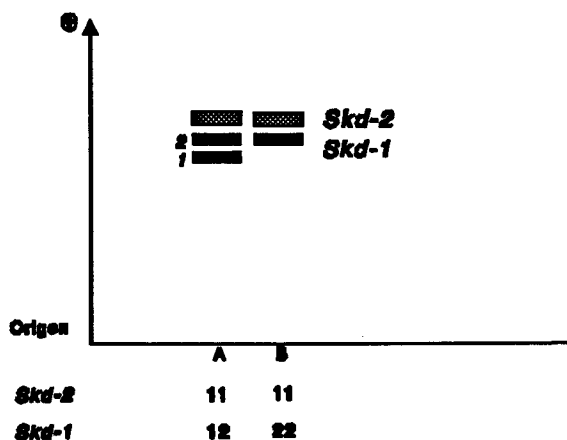


FIGURA 3.22

Patrones de bandas obtenidos para la Shikimato Deshidrogenasa (SKDH).

Las progenies de autofecundaciones de individuos con fenotipo B, no segregan y repiten el patrón parental.

Los individuos con un patrón dibandeado (A) para este gen, producen como resultado de la autofecundación progenies con semillas dibandeadas y semillas con únicamente la banda rápida o lenta (vease la tabla III.10), lo que pensamos confirma la hipótesis de un gen con dos alelos.

En el caso de 26 semillas procedentes de un autocruzamiento de Fino de Jete encontramos 8 como Skd-1: 22 y 18 como Skd-1: 12, no apareciendo ninguna como Skd-1: 11. Esta segregación 1:2 ($\chi^2 = 0.158654$, 1 grado de libertad y $p = 0.539$) podría interpretarse como el resultado de un gen letal ligado a este locus, en acoplamiento con el alelo lento Skd-1: 1.

FIGURA 3.23

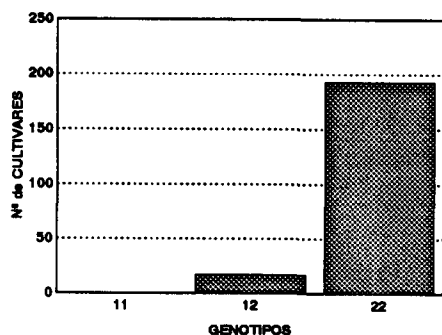
Distribución del nº de cultivares en cada clase genotípica del locus Skd-1. Una gran mayoría de los cv. presentan genotipo Skd-1: 22.

TABLA III.10

Segregación del locus *Skd-1*

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	p
PC	12	6:12:14	6.000	0.050	1.52	0.468
SE	12	18:36:16	0.171	0.918	0.48	0.788

La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad



Cuando se cuantifica la cantidad de individuos que presentan un determinado genotipo para el gen variable *Skd-1* (figura 3.23) se puede apreciar claramente la escasa presencia del alelo *Skd-1: 1*. No aparece ningún cultivar con el genotipo homocigoto *Skd-1: 11*. Los cv. con genotipo *Skd-1: 22* son mayoría, llegando a representar el 91.9%.

La siquimato deshidrogenasa, un enzima únicamente presente en bacterias, hongos y plantas (Linhart et al., 1981), parece presentarse en chirimoyos como monomérica. En otras especies, *Beta vulgaris*, *Prunus sp.*, *Chamaecyparis obtusa*, también muestra estructura monomérica (Mowrey & Werner, 1990; Uchida et al., 1990; VanGeyt et al., 1990).

SOD. Superoxido dismutasa (EC 1.15.1.1)

La SOD de chirimoyo muestra un patrón de bandas complejo. Hasta 5 zonas de actividad pueden encontrarse en los geles tratados para este enzima. Sin embargo, únicamente dos zonas presentan las suficientes características de definición, intensidad de coloración y repetitividad como para ser interpretadas genéticamente y ser útiles en la caracterización varietal. Estas dos zonas son las más anodales (SOD-4 y SOD-5) (véase fig. 3.24).

La zona SOD-4 muestra únicamente una banda en todos los cultivares. Aparece tanto en semilla como en extractos de hoja. La zona más rápida (SOD-5) únicamente aparece en extractos de hoja. Esta zona muestra dos bandas,

encontrando cultivares con la rápida, con las dos y con solo la banda lenta.

Consideramos que dos genes codifican estas zonas. Sod-4 sería monomórfico y codificaría para la zona SOD-4 y Sod-5 mostraría dos alelos y codificaría para SOD-5.

En plantas se encuentran hasta tres tipos diferentes de esta metaloenzima, según sea el grupo prostético metálico ligado al enzima. Así tenemos Manganese-SOD, Ferro-SOD y Cuprocinc-SOD (Fridovich, 1986). Estas tres formas del enzima se pueden diferenciar atendiendo a su sensibilidad al cianuro y al peróxido de hidrógeno. La actividad de la Mn-SOD no se ve afectada por ninguno de estos compuestos. Las Fe-SOD se inactivan con el H_2O_2 y, por último, las CuZn-SOD son inhibidas por CN^- e inactivadas por H_2O_2 (Grace, 1990). Además en plantas superiores estos tipos de SOD presentan pesos moleculares diferentes. Así las Mn-SOD, que se presentan como tetrámeros, tienen un pm de ≈ 94500 , las Fe-SOD como dímeros y con un pm de $\approx 41-47000$ y las CuZn-SOD, también diméricas, un pm de $\approx 30-37000$ (Del Río, 1986).

La SOD de chirimoyos aparece en cinco zonas de actividad (figura 3.24). Cuando se realiza la tinción en presencia de CN^- 2 mM únicamente encontramos las dos zonas de actividad más lentas, la primera con una gran actividad si utilizáramos extractos de semilla, siendo las demás inhibidas. Si se utilizaba H_2O_2 2mM en lugar de cianuro obteníamos idénticos patrones.

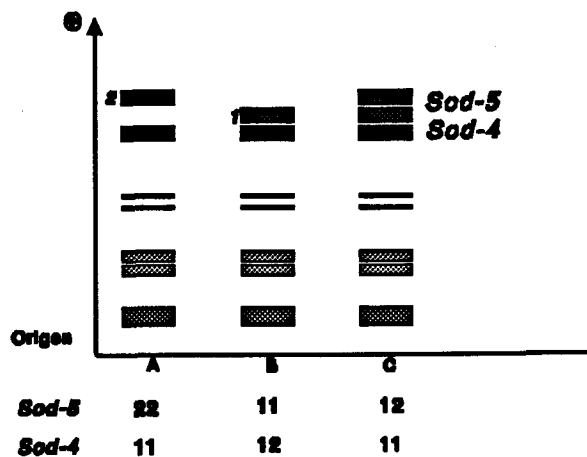


FIGURA 3.24

Patrones de bandas obtenidos para la SuperOxido Dismutasa (SOD).

Estos resultados sugieren que las dos zonas más catodales de SOD serían Mn-SOD y las zonas 4 y 5 corresponderían al enzima CuZn-SOD. La zona 3 es la más débil y no hemos obtenido datos suficientemente claros, pero posiblemente también sea CuZn-SOD.

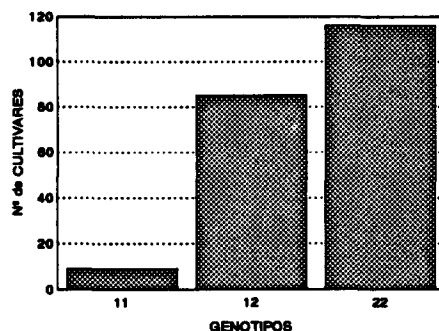
Las Mn-SOD se encuentran principalmente en mitocondrias, aunque también se ha demostrado su existencia en peroxisomas. Las CuZn-SOD están localizadas en cloroplastos, y en pequeñas cantidades, a veces, en el citosol, glioxisomas y mitocondria. (Corpas et al., 1991). En nuestro caso, son necesarios más estudios para confirmar esta localización intracelular.

Como Sod-5 no aparece en semillas no hemos podido estudiar su segregación. El hecho de que Sod-5 muestre únicamente dos bandas en individuos que suponemos heterocigotos en principio no concuerda con la naturaleza de las CuZn-SOD, que en plantas superiores ha sido descrita como dimérica, con lo cual en individuos heterocigotos deberíamos encontrar el típico patrón de tres bandas. Sin embargo en algunos árboles, como los álamos, se ha encontrado SOD que muestra patrones monoméricos (Rajora, et al., 1991).

El no poder visualizar este gen en semillas ha imposibilitado comprobar la segregación de forma significativa. Sin embargo, en 4 plantones de semilla de SP78 x SP78 estudiados, hemos observado segregación, pero la muestra es demasiado pequeña para tener significación estadística.

FIGURA 3.25

Nº de cultivares que presentan los diferentes genotipos encontrados para el gen Sod-5.



Cuando fijamos nuestra atención en la distribución genotípica de Sod-5 (figura 3.25), observamos el predominio del alelo rápido (el 2) en la mayoría de los cultivares. Así son homocigotos para este alelo el 55.2% de los cultivares,

y heterocigotos el 40.5%. Únicamente once cultivares son homocigotos para el alelo Sod-5: 1 (figura 3.24, fenotipo B).

Cuando, en geles de almidón, hemos coloreado para tetrazolium oxidasas¹ (TO), aparece una zona de actividad con una única banda bien definida. Desde 1973 (Lippitt & Fridovich, 1973; Beckman, 1973; McCord, 1979) se conoce la identidad entre las TO y las SOD. Es por ello que cabe conjeturar que la Sod-4 es la que produce la banda observada en geles de almidón teñidos para las TO, puesto que es el isoenzima con mayor actividad y además es monomérica como la TO que encontramos.

TPI. Triosas fosfato isomerasa (EC 5.3.1.1)

Los geles teñidos para este enzima muestran una gran complejidad por el elevado número de bandas presentes. Hasta 8 llegan a aparecer en ciertos cultivares. Para determinar su control se ha seguido la interpretación propuesta por Patty et al. (1988).

Estos autores consideran tres zonas (figura 3.26). La más lenta sería codificado por el gen Tpi-1, que presenta tres alelos. Su estructura dimérica viene determinada por la presencia de heterodímeros en los cv. heterocigotos.

La zona más anodal sería codificada por el gen Tpi-2 (siguiendo la nomenclatura de Patty et al., 1988) y también presenta dos alelos en los cultivares aquí estudiados. Al igual que en el caso anterior es dimérico.

La zona intermedia (TPI-Z en su nomenclatura) es interpretada por estos investigadores como los heterodímeros intergénicos entre la Tpi-1 y otro gen que codifica una proteína inactiva. Es por ello que sólo observemos dos bandas en los individuos heterocigotos para este gen inactivo.

Esta hipótesis es coherente con nuestros datos. Sin embargo nos parece más apropiado llamar al gen "silencioso" que codifica para la zona TPI-Z junto con Tpi-1 como Tpi-2 (ya que podemos conocer el genotipo de este locus a partir de la zona TPI-Z) y obviamente la Tpi-2 de Patty y colaboradores debería

¹ La solución de coloración de las TO debe llevar tetrazolium (como por ejemplo MTT o NBT) en un tampón adecuado (Tris). La mayoría de las tinciones para deshidrogenasas utilizan el sistema del tetrazolium y por ello tras sobretinción aparecen bandas claras de actividad TO sobre un fondo azul.

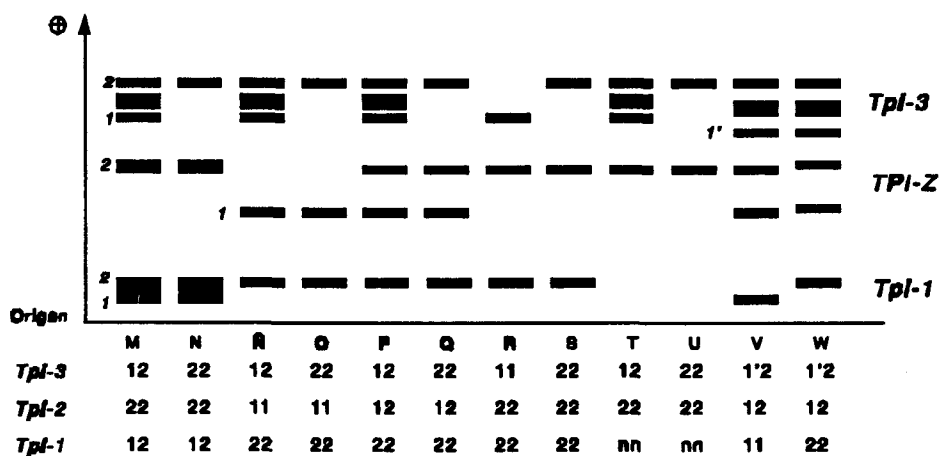


FIGURA 3.26

Zimogramas obtenidos para la Triosa Fosfato Isomerasa (TPI).

pasar a denominarse Tpi-3. Esta es la nomenclatura (Tpi-1, Tpi-2, Tpi-3) que seguimos en este trabajo.

Patty et al. (1988), por comparación con otras plantas, estiman que Tpi-3 es el isoenzima cloroplastidial y Tpi-1 el citosólico. Estos autores creen que Tpi-2 sería el producto de una duplicación génica, puesto que en la mayoría de las plantas únicamente encontramos dos TPI.

Algunos cultivares, como el cv. español Pinchudo, son heterocigotos para

TABLA III.11

Segregación del locus *Tpi-1*

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	P
PC	12	15:16:10	3.195	0.202	0.50	0.780
WH	12	33:51:21	2.829	0.243	2.02	0.363

La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad

los tres genes (fenotipo K de la figura 3.26), pero no solo encontramos este genotipo. Hasta 24 patrones de bandas hemos encontrado para este sistema isoenzimático, lo que lo hace muy útil para la identificación varietal. Los tres genes TPI identificados en chirimoyo son polimórficos, pero tan solo tienen 2 ó 3 alelos cada uno, y estos están ampliamente distribuidos en la colección de cultivares.

Tpi-1 presenta cuatro fenotipos diferentes, que pueden ser explicados por tres alelos, uno de ellos nulo. La existencia de genotipos homocigotos nulos es difícil de entender, a no ser que otro gen realizara la función de este, o bien que la actividad del nulo sea escasa pero suficiente. De hecho, si hay actividad en la zona TPI-Z (formada por los heterodímeros *Tpi-1* y *Tpi-2*) debemos pensar, si aceptamos las propuestas de Patty et al. (1988), que algo de actividad deben presentar los polipéptidos codificados por estos genes.

Por otra parte la tabla III.11 recoge la segregación de este locus en las progenies producidas por autofecundación de dos cultivares.

La figura 3.27 muestra la distribución, en las diferentes clases genotípicas del gen *Tpi-1*, de los cultivares estudiados. Como se observa, el genotipo mayoritario es el *Tpi-1*: 11, que acumula el 81.4% de los cultivares, le sigue el *Tpi-1*: 12 que llega al 11.0%. Los demás genotipos se presentan en menor porcentaje.

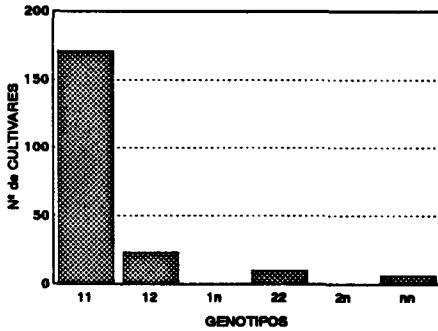


FIGURA 3.27

Clases genotípicas para el gen *Tpi-1* y n° de cultivares que las presentan. Se observa que el genotipo *Tpi-1: 11* aparece en una gran proporción de los cultivares de la colección. Por el contrario otros genotipos apenas están representados.

El gen *Tpi-2* presenta únicamente dos alelos, ambos con parecida frecuencia. En la tabla III.12 se observa la segregación de este locus para las progenies de autofecundaciones. En este caso la descendencia de la autofecundación del cultivar Chaffey Riverside presenta una distorsión con respecto a las proporciones esperadas. Se observa un incremento notable en los genotipos *Tpi-2:11* con respecto a los esperados.

La figura 3.28 recoge la distribución genotípica para el locus *Tpi-2*. Como se observa, los cultivares de chirimoyo presentan mayoritariamente el genotipo *Tpi-2: 12*, pero en general no se observa algún genotipo que este restringido a unos pocos cultivares.

TABLA III.12

Segregación del locus *Tpi-2*

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	p
CH	12	26:20:9	14.600	0.001	12.76	0.002
PC	12	12:14:8	2.000	0.368	1.40	0.497
PE	12	27:28:22	6.377	0.041	3.71	0.156
SP78	12	28:48:32	1.630	0.443	1.60	0.449

La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad

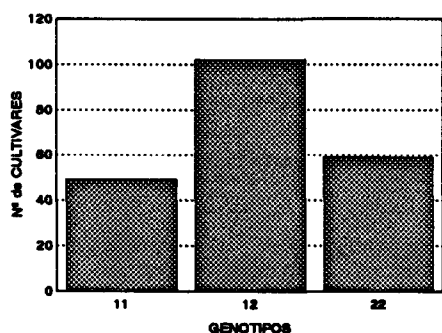


FIGURA 3.28

Nº de cultivares que presentan un determinado genotipo para el gen Tpi-2.

Para el gen Tpi-3, que no se expresa en semillas, hemos observado tres alelos. Tpi-3:1 y Tpi-3: 2 y Tpi-3: 1'. Este último alelo codifica para electromorfos que muestran una movilidad menor que la de los codificados por Tpi-3: 1 (figura 3.26), y además sólo lo hemos encontrado en los cultivares de atemoya AA, AG y AP.

El estudio de la segregación de este locus se ve dificultada por la ausencia de actividad de este gen en semillas. Sin embargo hemos podido estudiar hojas de *seedling* procedentes de autofecundaciones de los cultivares Serena y White, que ponen de manifiesto la segregación mendeliana de este locus. Estos datos están recogidos en la tabla III.13.

La figura 3.29 recoge la distribución de los cultivares en las clases genotípicas de este locus (Tpi-3). Se puede observar que mayoritariamente (130 de 210 cultivares) los cv. presentan el genotipo Tpi-3: 22. El genotipo homocigoto Tpi-3: 11 está presente en el 5.7% de los cv. y el Tpi-3: 1'1' no aparece. Si lo hace el Tpi-3: 1'2, pero al estar limitado a las atemoyas representa un porcentaje muy pequeño del total de la colección.

TABLA III.13

Segregación del locus Tpi-3

Cultivar	Genotipo	Segregación	χ^2	p	G	p
SE	12	12:18:8	0.947	0.623	0.91	0.634
WH	12	16:21:17	2.704	0.259	2.72	0.257

La segregación esperada es 1:2:1. χ^2 y G con 2 grados de libertad

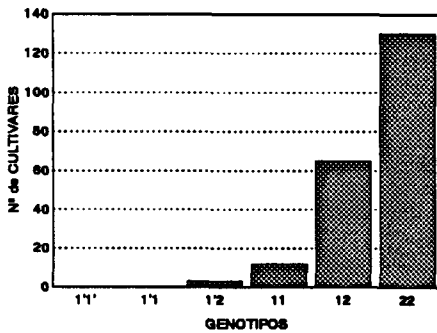


FIGURA 3.29
Distribución de Iso cultivares en las diferentes clases genotípicas del locus Tpi-3. El alelo 1' únicamente aparece en cv. de atemoya.

Expresión tisular de las isoenzimas

En general no existen grandes diferencias en la expresión de las isoenzimas estudiadas en los diferentes órganos analizados (hojas, estambres y semillas).

Únicamente algunos genes no se expresan en todo este material vegetal: Adh-1 no muestra actividad en hojas ni estambres, Sod-5 no se visualiza en semillas y Tpi-3 no aparece tampoco en semillas.

La siguiente tabla (III.14) resume los datos presentados anteriormente. En ella se presentan los sistemas isoenzimáticos analizados, el número de genes que los codifican, cuántos de estos loci son monomórficos o polimórficos y el número de alelos para estos últimos.

TABLA III.14

Cuadro resumen de los sistemas enzimáticos analizados

Enzima	Nº total de Loci	Nº de loci Monomórficos	Nº de loci Polimórficos (nº alelos)
ACPH	1	1	0
ADH	1	0	1 (2)
DIA	1	1	0
GDH	-	-	-
GOT	3	1	2 (4;5)
IDH	2	0	2 (2;4)
MDH	2	1	1 (3)
ME	1	0	1 (2)
6PGDH	1	1	0
PGI	2	1	1 (6)
PGM	2	0	2 (2;3)
SKDH	2	1	1 (2)
SOD	2	1	1 (2)
TPI	3	0	3 (3;2;3)
TOTAL	23	8	15

3.2 LIGAMIENTO

El análisis de las progenies obtenidas por autofecundación ha permitido el estudio de las relaciones de ligamiento entre los marcadores isoenzimáticos. La tabla III.15 presenta las parejas de genes que se han estudiado, así como el número de semillas y número de cultivares analizados.

De los quince genes polimórficos descritos, únicamente Idh-1 y Sod-5 no han sido utilizados en el estudio de las relaciones de ligamiento. Con los trece loci polimórficos restantes se pueden estudiar 78 parejas de genes. En el presente trabajo se recogen 64 de estas combinaciones (tabla III.15).

Estos análisis se han realizado tras la autofecundación de determinados cultivares (véase el capítulo segundo: *material y métodos*). La autofecundación de individuos heterocigotos equivale al cruzamiento de una F₁ para obtener la F₂. La progenie de la autofecundación, en caso de independencia entre una pareja de genes, se espera que mantenga las proporciones 1:2:1:2:4:2:1:2:1 (homocigoto lento para el gen 1 y homocigoto lento para el gen 2: homocigoto lento para el gen 1 y heterocigoto para el 2: homocigoto lento para el 1 y homocigoto rápido para el segundo: heterocigoto para el 1 y homocigoto lento

TABLA III.15

Parejas de genes estudiadas para el cálculo del ligamiento

	Adh-1	Got-1	Got-2	Idh-2	Mdh-1	Me-1	Pgl-1	Pgm-1	Pgm-2	Skd-1	Tpl-1	Tpl-2	Tpl-3
Adh-1	328	181	327	258	288	216	216	144	207	99	135	281	91
	5	2	4	4	3	3	3	2	4	2	2	4	2
Got-1		151	189	119	19	173	120	202	94	130	71	91	
		3	3	3	2	2	2	5	2	2	2	2	2
Got-2			105	113	115	67	-	77	-	-	53	-	-
			1	2	2	1	2	2	2	-	1	-	-
Idh-2				296	370	94	70	32	30	104	214	54	-
				4	4	2	1	1	1	2	3	1	-
Mdh-1					343	74	45	99	31	41	111	-	-
					5	2	1	3	1	1	2	-	-
Me-1						24	-	20	-	-	163	-	-
						1	-	1	-	-	2	-	-
Pgl-1							146	115	-	105	-	54	-
							2	2	-	1	-	1	-
Pgm-1								180	-	101	-	54	-
								3	-	1	-	1	-
Pgm-2									70	33	32	36	-
									2	1	1	1	-
Skd-1										30	31	36	-
										1	1	1	-
Tpl-1												33	54
												1	1
Tpl-2													-

Número de semillas analizadas para cada pareja de genes. Debajo número de cultivares.

para el 2: etc.).

Aunque las pruebas de contingencia empleadas para comprobar la ausencia de ligamiento son en principio robustas para las segregaciones no mendelianas en alguno de los dos loci (Mather, 1951; Bailey, 1961), no hay en la bibliografía un acuerdo unánime a la hora de considerar o no cruzamientos donde uno de los loci presenta desviaciones en la segregación. Por ejemplo, Torres et al. (1986) estudiando ligamiento en aguacate no consideran los datos que proceden de cruzamientos en los que alguno de los loci muestra distorsión en la segregación; el mismo criterio emplean Gaur & Slinkard (1990a) (1990b) cuando estudian el ligamiento en *Cicer* e igual hacen Vaillancourt & Slinkard (1993) al estudiar diversos loci morfológicos e isoenzimáticos en lenteja. Por el contrario otros autores si consideran estos casos, y por ejemplo Pham et al. (1989), estudiando las relaciones de ligamiento en arroz, consideran los cruzamientos en los que uno de los genes sufre ligeras distorsiones en su segregación; Szmidt & Muona (1989), Krueger & Knapp (1990) y van Heemstra et al. (1991), estudiando ligamiento en *Pinus sylvestris*, *Cuphea laminuligera* y arándano respectivamente, siguen el criterio de considerar este tipo de cruzamientos. En el presente estudio se ha optado por considerarlos siempre que la desviación no sea altamente significativa.

Tampoco se observa en la bibliografía una norma común a la hora de considerar los varios tipos de cruzamientos (acoplamiento/repulsión, etc.) que se realizan para determinar el ligamiento de una misma pareja de genes. En este trabajo se han agrupado los diferentes cruces donde el parental tenía igual genotipo (o se diferenciaban en un único alelo) y realizado un cambio de fase (de acoplamiento a repulsión o viceversa) cuando era el caso. Para agrupar los datos ha sido condición que el test de heterogeneidad no fuese significativo.

Por último se ha considerado que dos loci están ligados si el test de contingencia era significativo al nivel del 0.01, para así evitar considerar ligados a genes que no lo estan y pueden mostrar relaciones de ligamiento espurias (Szmidt & Muona, 1989). Este es un criterio conservador. Pero considerar la norma habitual de nivel de significación = 0.05 implica cometer errores de tipo I (aceptar ligamiento cuando no lo hay) con una probabilidad del 5%. Reducir el nivel de significación produce mayores garantías a la hora de establecer que una combinación específica de genes está ligada.

TABLA III.16

Cosegregación entre parejas de loci

Genes	cv	N	frecuencias genotípicas observadas									P	r	se
			L/L	L/H	L/R	H/L	H/H	H/R	R/L	R/H	R/R			
Adh1-Got1	MA	62	4	11	2	8	13	5	8	8	3	0.688		
Adh1-Got1	PC	24	2	3	0	5	4	3	2	4	1	0.664		
Adh1-Got1	SE	69	2	11	6	7	17	7	5	9	5	0.756		
Adh1-Got1	WH	103	11	13	11	7	23	16	4	12	6	0.415		
Adh1-Got1**	PE	70	0	12	8	4	18	12	3	8	5	0.447		
Adh1-Got2	MA	80	7	7	3	3	15	8	6	8	3	0.220		
Adh1-Got2	PE	101	7	18	4	10	25	15	5	9	8	0.397		
Adh1-Idh2	PC	31	1	4	1	5	6	4	3	3	4	0.662		
Adh1-Idh2	PE	121	14	16	5	10	30	19	3	15	9	0.032	0.383	0.042
Adh1-Idh2	WH	68	8	15	3	4	16	7	0	8	7	0.039	0.345	0.053
Adh1***-Idh2	SP78	107	1	8	8	7	23	8	20	21	11	0.012	0.374	0.044
Adh1-Mdh1	BO	50	5	8	2	4	13	4	1	9	4	0.474		
Adh1-Mdh1	PC	32	3	2	1	5	8	2	2	6	3	0.665		
Adh1-Mdh1	PE	119	2	22	10	20	31	7	9	15	3	0.014	0.384	0.042
Adh1-Mdh1**	CH	57	6	6	4	11	9	3	8	10	0	0.250		
Adh1-Men1	CH	57	3	6	7	9	10	4	8	7	3	0.287		
Adh1-Men1*	PE	121	7	13	15	24	21	14	10	12	5	0.123		
Adh1***-Men1	SP78	108	3	8	6	13	17	9	10	25	17	0.525		
Adh1-Pgi1	BO	50	4	8	3	5	8	8	2	7	5	0.727		
Adh1-Pgi1	MA	63	2	10	6	11	10	5	7	10	2	0.115		
Adh1-Pgi1	WH	103	10	17	8	16	19	11	2	14	6	0.258		
Adh1-Pgm1	BO	45	2	7	4	9	8	2	1	6	6	0.051		
Adh1-Pgm1***	WH	99	14	14	6	17	14	12	11	6	5	0.721		
Adh1-Pgm2	BO	45	5	4	4	6	6	7	5	5	3	0.943		
Adh1-Pgm2	MA	63	7	9	2	5	12	9	7	8	4	0.349		
Adh1-Pgm2***	PC	29	4	0	1	8	6	0	7	1	2	0.125		
Adh1-Pgm2**	SE	70	8	7	5	14	11	6	8	7	4	0.991		
Adh1-Skd1	SE	70	5	10	5	8	14	9	5	12	2	0.630		
Adh1-Skd1	PC	29	4	0	1	1	7	8	1	3	6	0.006	0.271	0.071
Adh1-Tpi1	PC	32	4	2	0	6	8	1	3	3	5	0.058		
Adh1-Tpi1	WH	103	27	8	0	5	39	2	0	3	19	0.000	0.091	0.021
Adh1-Tpi2	PC	29	3	1	1	7	4	3	0	7	3	0.070		
Adh1-Tpi2**	CH	54	7	5	3	10	10	2	8	5	4	0.720		
Adh1-Tpi2*	PE	70	7	8	5	13	12	10	2	7	6	0.536		
Adh1***-Tpi2	SP78	108	4	3	10	2	29	8	22	16	14	0.000	0.370	0.044
Adh1-Tpi3	SE	38	6	3	1	1	9	4	5	6	3	0.100		
Adh1-Tpi3	WH	53	7	7	8	6	10	7	2	4	2	0.897		
Got1-Got2	MA	67	5	9	6	8	22	7	3	5	2	0.822		
Got1-Got2	SA	10	0	2	2	3	1	2	0	0	0	0.548		
Got1**-Got2	PE	74	2	3	2	11	23	8	4	13	8	0.714		
Got1-Idh2	PC	26	1	6	2	4	2	6	1	3	1	0.188		
Got1-Idh2	WH	69	3	8	5	6	16	9	4	15	3	0.663		
Got1**-Idh2	PE	74	0	2	5	12	20	10	7	11	7	0.131		
Got1-Mdh1	PC	26	3	4	2	3	8	1	1	3	1	0.641		
Got1-Mdh1	SA	19	2	6	0	2	5	1	0	1	2	0.108		
Got1**-Mdh1	PE	74	2	4	1	8	25	9	7	16	2	0.648		

TABLA III.16

Cosegregación entre parejas de loci (continuación)

Genes	cv	N	frecuencias genotípicas observadas									p	r	se
			L/L	L/H	L/R	H/L	H/H	H/R	R/L	R/H	R/R			
Got1-Men1	SA	19	4	3	1	1	5	2	0	1	2	0.185		
Got1 ^{**} -Men1 [*]	PE	74	4	1	2	10	19	13	11	5	9	0.129		
Got1-Pgi1	MA	69	14	6	2	7	22	8	0	5	5	0.000	0.249	0.044
Got1-Pgi1	WH	104	10	10	2	16	25	7	3	15	16	0.001	0.324	0.042
Got1-Pgm1	B3	20	2	1	1	4	3	2	1	4	2	0.690		
Got1-Pgm1 ^{***}	WH	100	11	8	2	19	14	13	12	12	9	0.485		
Got1-Pgm2	B3	20	0	3	1	2	6	1	4	0	3	0.048	0.384	0.104
Got1-Pgm2	MA	69	5	5	12	7	28	2	7	1	2	0.000	0.251	0.044
Got1-Pgm2 ^{***}	PC	25	5	4	0	7	2	2	4	1	0	0.379		
Got1-Pgm2 [*]	SA	19	3	3	2	5	3	0	1	1	1	0.563		
Got1-Pgm2 ^{**}	SE	69	0	5	9	15	16	6	14	4	0	0.000	0.236	0.043
Got1-Skd1	SE	69	4	6	2	6	19	10	5	9	4	0.693		
Got1-Skd1	PC	25	4	4	1	1	4	6	0	3	2	0.116		
Got1-Tpi1	PC	26	3	5	1	4	6	2	2	1	2	0.650		
Got1-Tpi1	WH	104	10	10	2	12	24	12	11	16	7	0.411		
Got1-Tpi2	PC	25	4	1	4	2	9	0	3	2	0	0.001	0.331	0.086
Got1-Tpi2 [*]	PE	46	2	2	2	6	13	7	8	3	3	0.263		
Got1-Tpi3	SE	38	2	3	4	7	6	3	3	7	1	0.299		
Got1-Tpi3	WH	53	3	4	3	8	12	7	4	5	7	0.819		
Got2-Idh2	PE	105	4	11	8	12	30	13	9	9	9	0.377		
Got2-Mdh1	PE	103	1	8	14	6	46	2	21	6	0	0.000	0.125	0.025
Got2-Mdh1	SA	10	0	2	1	0	3	0	3	1	0	0.076		
Got2-Men1	SA	10	1	1	1	2	1	0	0	4	0	0.154		
Got2-Men1 [*]	PE	105	10	7	6	17	22	16	9	10	8	0.874		
Got2-Pgi1	MA	67	3	9	4	10	16	10	7	7	1	0.327		
Got2-Pgm2	MA	67	6	6	2	9	18	9	1	9	5	0.101		
Got2-Pgm2 [*]	SA	10	2	1	0	1	2	0	2	1	1	0.622		
Got2-Tpi2 [*]	PE	53	1	5	5	13	9	6	5	6	3	0.241		
Idh2-Mdh1	C3TE	29	4	1	2	1	9	2	4	3	3	0.071		
Idh2-Mdh1	CU	105	7	14	6	11	26	8	8	20	5	0.958		
Idh2-Mdh1	PC	34	3	5	1	3	9	3	4	5	1	0.823		
Idh2-Mdh1	PE	128	7	18	3	16	39	6	9	17	11	0.191		
Idh2-Men1	C3TE	29	4	3	0	1	6	5	2	3	5	0.081		
Idh2-Men1	CU	105	16	6	5	13	29	3	5	16	12	0.000	0.330	0.042
Idh2-Men1	SP78	107	11	11	6	10	26	16	4	13	10	0.209		
Idh2-Men1 [*]	PE	129	4	11	14	20	26	18	20	12	4	0.002	0.341	0.038
Idh2-Pgi1	C3TE	24	2	1	2	0	6	4	2	5	2	0.272		
Idh2-Pgi1	WH	70	3	6	4	11	17	11	6	10	2	0.659		
Idh2-Pgm1 ^{***}	WH	70	5	5	3	14	14	11	9	6	3	0.651		
Idh2-Pgm2 ^{***}	PC	32	5	2	0	9	4	2	7	2	1	0.678		
Idh2-Skd1	PC	30	0	3	3	4	4	6	2	4	4	0.667		
Idh2-Tpi1	PC	34	6	3	0	4	7	4	2	5	3	0.173		
Idh2-Tpi1	WH	70	6	7	0	14	17	8	3	10	5	0.198		
Idh2-Tpi2	PC	31	1	5	1	5	5	4	4	4	2	0.590		
Idh2-Tpi2	SP78	107	10	13	5	13	26	13	4	9	14	0.047	0.371	0.044
Idh2-Tpi2 [*]	PE	76	6	9	2	10	14	15	11	5	4	0.066		

TABLA III.16

Cosegregación entre parejas de loci (continuación)

Genes	cv	N	frecuencias alélicas observadas										P	r	se
			L/L	L/H	L/R	H/L	H/H	H/R	R/L	R/H	R/R				
Idh2-Tpi3	WH	54	5	4	3	7	9	12	4	8	2	0.283			
Mdh1-Men1	C3TE	29	3	3	3	0	8	5	4	1	2	0.052			
Mdh1-Men1	CU	105	9	10	7	20	28	12	5	13	1	0.270			
Mdh1-Men1	SA	23	1	3	1	6	5	3	0	2	2	0.445			
Mdh1-Men1*	PE	127	12	12	8	21	31	22	10	5	6	0.470			
Mdh1**Men1	CH	59	9	10	6	9	11	7	2	3	2	0.997			
Mdh1-Pgi1	BO	50	1	6	3	8	13	9	2	4	4	0.778			
Mdh1-Pgi1	C3TE	24	3	2	2	1	6	4	0	4	2	0.252			
Mdh1-Pgm1	BO	45	4	2	2	7	13	8	1	6	2	0.384			
Mdh1-Pgm2	BO	45	3	2	3	11	8	9	2	5	2	0.627			
Mdh1-Pgm2***	PC	34	5	3	1	14	3	2	4	2	0	0.728			
Mdh1-Pgm2*	SA	20	3	0	1	6	6	1	1	1	1	0.410			
Mdh1-Skd1	PC	31	3	2	3	1	8	8	2	2	2	0.337			
Mdh1-Tpi1	PC	41	6	3	1	5	10	5	4	3	4	0.293			
Mdh1-Tpi2	PC	34	4	2	3	6	10	2	2	2	3	0.293			
Mdh1-Tpi2*	PE	77	4	8	5	20	14	14	3	6	3	0.480			
Mdh1**-Tpi2**	CH	55	10	10	4	14	8	3	2	2	2	0.847			
Men1-Pgi1	C3TE	24	1	3	2	2	5	3	1	4	3	0.994			
Men1-Pgm2*	SA	20	3	3	0	4	2	3	3	2	0	0.323			
Men1-Tpi2	SP78	108	5	12	9	14	19	17	9	17	6	0.487			
Men1-Tpi2**	CH	55	9	7	4	12	8	2	5	5	3	0.784			
Men1*-Tpi2*	PE	76	14	6	6	8	14	9	5	8	6	0.190			
Pgi1-Pgm1	BO	45	1	5	3	7	10	3	4	6	6	0.446			
Pgi1-Pgm1***	WH	101	13	7	7	19	18	11	10	10	6	0.866			
Pgi1-Pgm2	BO	45	7	2	0	8	9	3	1	4	11	0.000	0.227	0.052	
Pgi1-Pgm2	MA	70	2	7	12	7	24	3	11	3	1	0.000	0.201	0.039	
Pgi1-Tpi1	WH	106	13	13	3	15	23	12	5	15	6	0.249			
Pgi1-Tpi3	WH	54	5	5	4	6	14	9	5	2	4	0.417			
Pgm1-Pgm2	B2	96	10	11	5	14	27	10	6	7	5	0.752			
Pgm1-Pgm2	B3	20	2	5	0	3	4	1	1	0	4	0.017	0.308	0.092	
Pgm1-Pgm2	BO	45	5	2	5	8	10	3	3	3	6	0.147			
Pgm1***-Tpi1	WH	101	11	21	10	13	17	5	7	11	6	0.749			
Pgm1***-Tpi3	WH	54	6	5	8	5	12	4	5	4	5	0.269			
Pgm2**Skd1	SE	70	8	16	6	6	12	7	4	8	3	0.665			
Pgm2***-Skd1	PC	30	4	5	10	1	5	2	1	1	1	0.464			
Pgm2***-Tpi1	PC	33	8	10	4	2	3	3	0	2	1	0.614			
Pgm2***-Tpi2	PC	32	9	9	3	2	3	3	0	2	1	0.443			
Pgm2**-Tpi3	SE	38	3	7	3	5	7	3	4	4	2	0.937			
Skd1-Tpi1	PC	30	3	3	0	4	4	3	2	7	4	0.397			
Skd1-Tpi2	PC	31	3	1	2	4	5	3	3	7	3	0.653			
Skd1-Tpi3	SE	38	4	5	2	6	9	4	2	4	2	0.989			
Tpi1-Tpi2	PC	33	5	3	2	6	6	3	1	5	2	0.552			
Tpi1-Tpi3	WH	54	5	7	7	9	11	7	2	3	3	0.934			

cv = cultivar N = número de semillas p = probabilidad r = fracción de recombinación se = error estándar
L = homocigoto para el alelo lento H = heterocigoto R = homocigoto para el alelo rápido
los asteriscos indican distorsión en la segregación de ese locus

La tabla III.16 recoge los resultados de los cruzamientos realizados. En esta tabla aparecen las segregaciones obtenidas, así como la probabilidad de que la desviación con respecto a lo esperado (ausencia de ligamiento) sea debida al azar. Con diversos asteriscos se marcan los loci que presentan desviaciones en su segregación.

De las 64 parejas de genes estudiados en 13 casos aparecen desviaciones con respecto a las proporciones esperadas en caso de ausencia de ligamiento. Estos trece casos merecen un comentario individualizado.

Adh-1 — Idh-2

Esta combinación de loci se ha comprobado en cuatro autofecundaciones realizadas en los cultivares PC, PE, WH y SP78, con progenies que se sitúan entre 32 y 119 semillas (tabla III.16). Uno de estos cruzamientos (SP78) muestra una importante desviación en la segregación del locus *Adh-1*, por lo que no se va a ser considerado.

PC y PE presentan idénticos genotipos e igual fase (acoplamiento) por lo que sus progenies pueden ser agrupadas ($\chi^2_H =$ heterogeneidad = 8.032, $p_H =$ 0.463). Al hacer esto no se observa ligamiento ($\chi^2 =$ 6.926, $p =$ 0.140).

WH presenta diferente genotipo y no se puede agrupar, por lo que debe considerarse independientemente.

En resumen, se tienen dos casos: WH (68 semillas) indicando ligamiento al nivel de $\alpha=0.05$ y PC y PE (152 semillas) que no muestran ligamiento. Es razonable por tanto, y basándose en los criterios anteriormente mencionados, pensar que *Adh-1* e *Idh-2* no se encuentran ligados. Suposición que se ve apoyada por los resultados de Lee & Ellstrand (1987), que tampoco encuentran ligamiento tras analizar 80 semillas procedentes de la autofecundación del cultivar WH.

Adh-1 — Mdh-1

Lee & Ellstrand (1987) encuentran que ambos loci están ligados a 27 u.m. tras analizar 80 semillas de la autofecundación del cultivar Spain.

En cuatro de las autofecundaciones realizadas se han obtenido semillas para comprobar esta relación. A saber, las producidas por los cv. BO, PC, PE

y CH (tabla III.16). La progenie del cv. CH muestra una apreciable distorsión de las proporciones mendelianas esperadas para el gen *Mdh-1*, por lo que no puede ser agrupado con los demás para obtener unos datos globales.

Si las progenies de los demás cultivares se agrupan (teniendo en cuenta la fase) se obtiene una $\chi^2 = 13.581$ y $p = 0.009$ ($\chi^2_H = 12.303$ con $p_H = 0.749$) lo que implica que ambos loci están ligados a una distancia de 38.7 ± 3.3 u.m.

Adh-1 — Skd-1

Únicamente en dos casos se han obtenido progenies para este par de loci: en SE y PC. Y en este último cultivar (con solo 29 semillas) se aprecia una desviación en las proporciones esperadas que indica ligamiento. Pero si se engloban los datos de los dos cruces ($\chi^2_H = 12.844$ con $p_H = 0.115$) no se aprecia ligamiento, puesto que $\chi^2 = 5.208$ y $p = 0.267$.

Adh-1 — Tpi-1

Mediante la autofecundación de PC y WH se han obtenido progenies donde estudiar las relaciones de ligamiento entre estos dos genes. En un caso (WH con 103 semillas analizadas) aparece ligamiento ($r = 0.09$). Si se engloban los dos cruzamientos se encuentra también ligamiento ($\chi^2 = 115.260$ y $p = 0.000$) con una distancia entre los marcadores de $r = 0.143 \pm 0.023$. Desgraciadamente no es lícito realizar este agrupamiento, puesto que el test de heterogeneidad produce valores significativos ($\chi^2_H = 21.235$ con $p_H = 0.002$).

Así pues hay que considerar los dos cruces independientemente. Si se tiene en cuenta que la autofecundación que indica ligamiento (WH) ha producido una descendencia tres veces mayor que la del otro cultivar (PC), cabe considerar más probable la existencia de ligamiento. Esta hipótesis se ve reforzada por los datos presentados por Lee & Ellstrand (1987), que al analizar 80 semillas de la autofecundación de WH encuentran ligamiento entre estos dos marcadores ($r = 0.10$).

Adh-1 — Tpi-2

Estos dos genes son situados en grupos de ligamiento diferentes por Lee & Ellstrand (1987), aunque su independencia no se comprueba directamente.

En este trabajo se ha estudiado este par de genes en cuatro diferentes autofecundaciones (tabla III.16): PC, CH, PE y SP78. Únicamente en este último cultivar aparece ligamiento, pero no se puede considerar debido a la gran distorsión en la segregación que presenta la progenie en el locus *Adh-1*.

En los demás casos, aún con ligeras distorsiones en la segregación, no aparece ligamiento, tanto de forma independiente como agrupando los datos.

Got-1 — Pgi-1

Las progenies de los dos cultivares analizados (MA y WH) muestran la existencia de ligamiento entre ambos loci. Puesto que los genotipos de los dos cv. difieren para ambos genes, no es a priori justificable el agruparlos en una única serie de valores, a pesar de que las frecuencias genotípicas que presentan son homogéneas. Por tanto se puede concluir que ambos loci estén ligados y presenten una distancia que este comprendida entre 24.9 y 32.4 u.m. Una media ponderada arroja un valor de 29.4 u.m. (similar al valor que se obtiene si a pesar de todo se engloban los datos: $r = 0.295 \pm 0.031$).

Lee & Ellstrand (1987) hayan un valor de $r = 0.23$ tras estudiar las autofecundaciones de cuatro cultivares (WH, SP, CT y BO).

Got-1 — Pgm-2

Cinco autofecundaciones se han realizado para estudiar el posible ligamiento entre estos dos genes. De estos cruzamientos tres (PC, SA, SE) muestran algún tipo de segregación monogénica no mendeliana. Además hay una heterogeneidad evidente al mostrar algunas progenies ligamiento y otras no.

La progenie de PC manifiesta una fuerte distorsión en la segregación y por tanto no es considerada. De las restantes cuatro autofecundaciones (tabla III.16), las que han producido más semillas (y por tanto producen cálculos más fiables) indican ligamiento. El problema es que al presentar desviaciones en la segregación, los cruces no pueden ser agrupados (la χ^2_H resulta significativa).

La visión que se tiene considerando esta situación es la de que posiblemente *Got-1* y *Pgm-2* puedan estar ligados, pero los que datos aquí se presentan no son concluyentes. Lee & Ellstrand (1987) no encuentran

ligamiento, si bien su análisis de la variabilidad en PGM es diferente al presentado en este trabajo.

Got-1 — Tpi-2

Lee & Ellstrand (1987) sitúan a estos genes en el mismo grupo de ligamiento aunque no realizan un test específico de ligamiento entre ellos. En este trabajo se han analizado dos autofecundaciones (PC y PE) donde ha sido posible estudiar las relaciones entre este par de loci.

La progenie de PC indica que ambos están ligados. Sin embargo la de PE muestra lo contrario. Los datos se pueden agrupar ($\chi^2_{\text{H}} = 11.677$ con $p_{\text{H}} = 0.171$) e implican ligamiento ($r = 0.366 \pm 0.054$) pero al nivel del 0.05 ($\chi^2 = 12.936$ y $p = 0.012$).

Got-2 — Mdh-1

Dos autofecundaciones (PE y SA) analizan las relaciones de ligamiento entre este par de genes. Si se suman las dos progenies ($\chi^2_{\text{H}} = 3.558$ con $p_{\text{H}} = 0.744$) el valor de $\chi^2 = 96.170$ y $p = 0.000$ indica que los loci están ligados con $r = 0.129 \pm 0.024$.

Lee & Ellstrand (1987) también encuentran ligamiento entre estos dos genes, pero a una menor distancia ($r = 0.03 \pm 0.01$).

Idh-2 — Me-1

Las progenies obtenidas en las cuatro autofecundaciones (tabla III.16) realizadas para estudiar las relaciones entre estos dos genes pueden agruparse ($\chi^2_{\text{H}} = 24.752$ con $p_{\text{H}} = 0.426$) y muestran que ambos loci están ligados ($\chi^2 = 41.603$ y $p = 0.000$) a una distancia de $r = 0.353 \pm 0.023$.

Aunque en uno de los cruzamientos hay una desviación de la segregación del locus Me-1 está es ligera y no afecta al cálculo del ligamiento.

Idh-2 — Tpi-2

Lee & Ellstrand (1987) estudian esta pareja de genes en únicamente 30

semillas procedentes de la autofecundación de WH y no encuentran ligamiento. En el presente trabajo se estudian tres autofecundaciones (PC, SP78 y PE) siendo el cv. SP78, que produjo mayor número de semillas, el que muestra ligamiento.

Cuando se engloban todos los datos (teniendo en cuenta la fase) ($\chi^2_{\text{H}} = 19.287$ con $p_{\text{H}} = 0.248$) se obtiene una frecuencia de recombinantes $r = 0.421 \pm 0.033$ ($\chi^2 = 13.631$ y $p = 0.009$).

Por tanto se puede considerar que estos genes están ligados pero situados a una considerable distancia.

Pgi-1 — Pgm-2

Se estudian dos autofecundaciones que producen resultados semejantes. Ambos cruces indican que estos marcadores están ligados ($p = 0.000$). Si se agrupan los datos ($\chi^2_{\text{H}} = 4.968$ con $p_{\text{H}} = 0.819$) se obtiene una $r = 0.216 \pm 0.031$ ($\chi^2 = 53.660$ y $p = 0.000$).

Pgm-1 — Pgm-2

En tres autofecundaciones se obtienen progenies donde estudiar las relaciones de ligamiento entre estos loci. En uno de estos cruzamientos aparece ligamiento al nivel del 0.5. Si se agrupan las tres progenies ($\chi^2_{\text{H}} = 16.544$ con $p_{\text{H}} = 0.403$) se obtiene en el test de ligamiento una $\chi^2 = 10.178$ y $p = 0.038$, lo que implica una $r = 0.425 \pm 0.038$. Sin embargo y atendiendo al criterio de $\alpha = 0.01$ se debe cuestionar esta relación de ligamiento.

La tabla III.17 recoge un resumen de las relaciones de ligamiento anteriormente comentadas.

Los diferentes marcadores ligados se pueden estructurar, en principio, en tres grupos de ligamiento:

- 1) formado por Tpi-1, Adh-1, Mdh-1 y Got-2.
- 2) formado por Me-1, Idh-2, Tpi-2
- 3) formado por Got-1, Pgi-1, Pgm-2.

TABLA III.17

Relaciones de ligamiento entre diferentes loci

Genes	cv	N	χ^2	p	χ^2_H	P_H	r	se
<i>Adh1-Idh2</i>	PC, PE	152	6.926	0.140	8.032	0.463	-	-
	WH	68	10.077	0.039			0.345	0.053
<i>Adh1-Mdh1</i>	BO, PC, PE	201	13.581	0.009	12.303	0.749	0.387	0.033
	CH	57	5.387	0.250			-	-
<i>Adh1-Skd1</i>	SE, PC	99	5.208	0.267	12.844	0.115	0.434	0.033
<i>Adh1-Tpi1</i>	WH	103	119.424	0.000			0.091	0.021
	PC	32	9.120	0.058			-	-
<i>Adh1-Tpi2</i>	PC, CH, PE	153	4.613	0.329	19.467	0.240	-	-
<i>Got1-Pgi1</i>	MA	69	20.917	0.000			0.249	0.044
	WH	104	19.005	0.001			0.324	0.042
<i>Got1-Pgm2</i>	B3, MA	69	37.670	0.000	8.838	0.367	0.281	0.041
	SA	19	2.965	0.563			-	-
	SE	69	28.945	0.000			0.238	0.043
<i>Got1-Tpi2</i>	PC, PE	71	12.936	0.012	11.677	0.171	0.366	0.054
<i>Got2-Mdh1</i>	PE, SA	113	96.170	0.000	3.558	0.744	0.129	0.024
<i>Idh2-Me1</i>	C3te, CU,	370	41.603	0.000	24.752	0.426	0.353	0.023
	SP78, PE							
<i>Idh2-Tpi2</i>	PC, SP78,	214	13.631	0.009	19.287	0.248	0.421	0.033
	PE							
<i>Pgi1-Pgm2</i>	BO, MA	115	53.660	0.000	4.968	0.819	0.216	0.031

N = número de semillas estudiadas p = probabilidad para ese valor de χ^2 χ^2_H = test de heterogeneidad
 P_H = probabilidad para el test de heterogeneidad r = % de recombinación se = error estándar

Únicamente tres loci (*Pgm-1*, *Skd-1*, *Tpi-3*) del total estudiado no aparecen ligados y a falta de otros datos podemos suponer que se corresponden con otros tantos grupos de ligamiento.

3.3 TABLAS DE GENOTIPOS E IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES

A partir del análisis de los diferentes sistemas isoenzimáticos se han obtenido los genotipos para los loci analizados. Del total de 23 loci, ocho se presentan como monomórficos (AcpH-2, Dia-1, Got-3, Mdh-2, 6Pgd-2, Pgi-2, Skdh-2 y Sod-4), por lo que no son presentados en las tablas de genotipos.

TABLA III.18

Genotipos para el gen Adh-1

Cultivar	Adh-1	Cultivar	Adh-1	Cultivar	Adh-1
CA	12	SP	11	C3Td	12
CM	12	WH	12	C3Te	22
FI	12	B1	11	C4	12
MA	12	B2	12	CU	22
NE	12	B3	11	P410	12
PC	12	BS	12	P604	22
PÑ	22	CL	11	P606	12
BA	12	CO	12	PE	12
BO	12	CN	12	SP77	22
BH	22	CR	22	SP78	12
CH	12	EM	12	ATEMOYAS	
CT	22	EN	12	AA	22
LO	22	HI	12	AG	22
PI	22	SE	12	AP	22
SA	22	ZA	22		

En la tabla III.18 se muestran los genotipos para el locus Adh-1 de los cultivares de la parcela 29. En dicha tabla los cv aparecen agrupados por países de procedencia (España, EE.UU., Bolivia, Chile, Otros, Perú, y por último, las atemoayas). Estos agrupamientos se usan ampliamente en los siguientes apartados de este capítulo.

La siguiente tabla (III.19) muestran los genotipos de todos los cultivares para el resto de genes estudiados. En ellas también se agrupan los cv. por países.

TABLA III. 19

Genotipos de los cv. para los diferentes loci polimórficos estudiados

	Got1	Got2	Idh1	Idh2	Mdh1	Me1	Pgi1	Pgm1	Pgm2	Skd1	Sod5	Tpi1	Tpi2	Tpi3
<i>Atemoyas</i>														
AA	33	13	11	23	23	22	35	11	12'	12	12	11	12	L2
AG	34	13	11	23	23	22	35	11	12'	12	12	11	12	L2
AP	33	24	11	23	12	22	36	11	12	12	11	22	12	L2
JOY	33	13	12	23	23	22	35	11	12'	12	12	11	12	22
<i>Cv. Españoles</i>														
CA	34	22	22	22	11	11	45	11	11	12	22	11	11	12
CM	34	22	22	22	11	11	45	11	11	12	22	11	11	12
FI	24	22	22	22	11	11	44	11	12	12	22	11	11	12
MA	24	12	22	22	11	11	25	11	12	22	22	11	11	11
NE	44	22	22	24	11	11	44	11	11	12	22	11	12	12
PC	24	22	22	24	12	11	44	11	12	12	22	12	12	12
PÑ	44	22	22	22	11	11	26	11	11	22	22	11	11	11
PAZ	44	22	22	22	11	11	44	11	12	12	22	11	11	11
<i>Cv. de EE. UU.</i>														
BA	34	22	22	24	11	12	5n	11	11	22	22	11	12	22
BO	33	22	22	22	12	22	46	12	12	22	22	11	22	12
BH	13	12	22	22	12	22	56	11	22	22	22	11	22	22
CH	33	22	22	44	12	12	44	11	11	22	12	11	12	22
CT	13	24	22	24	11	12	25	11	12	22	22	12	22	22
LO	34	22	22	22	11	12	45	11	11	22	22	11	11	11
PI	24	22	22	24	11	11	46	11	11	22	22	11	12	22
SA	34	12	22	22	13	12	44	11	12	22	22	11	22	22
SP	34	22	22	14	12	11	26	11	11	12	22	11	22	12

TABLA III. 19 (CONT.)

Genotipos de los cultivares (continuación)

	Got1	Got2	Idh1	Idh2	Mdh1	Me1	Pgl1	Pgm1	Pgm2	Skd1	Sod5	Tpl1	Tpl2	Tpl3
WH	23	22	22	12	11	11	46	12	11	22	22	12	22	12
<i>Cv. Bolivianos</i>														
B1	13	12	22	22	11	11	66	11	11	22	22	22	22	11
B2	13	12	22	22	11	22	66	12	12	22	22	12	22	12
B3	13	11	22	22	11	11	66	12	12	22	22	22	22	11
<i>Cv. Chilenos</i>														
BS	33	22	22	44	11	12	44	11	11	22	22	12	22	22
CL	33	22	22	24	11	12	66	11	11	22	12	11	22	22
CO	33	22	22	44	11	22	44	11	11	22	22	11	22	22
CN	33	22	22	44	11	22	44	11	11	22	22	11	22	22
CR	33	22	22	24	11	12	66	11	11	22	22	22	22	22
EM	13	22	22	24	12	22	66	11	11	22	11	11	12	22
EN	34	22	22	22	12	12	66	11	11	22	12	11	11	22
HI	24	22	22	22	11	11	44	11	12	12	22	11	11	12
SE	34	22	22	22	11	11	44	11	12	12	22	11	11	12
AZ	33	22	22	44	11	22	44	11	11	22	22	11	22	22
<i>Cv. de otros orígenes</i>														
ZA	34	22	22	22	11	11	44	11	11	22	22	11	12	12
BRON	33	22	22	24	12	22	66	11	11	22	11	11	12	22
BURT	44	22	22	24	11	11	45	11	11	22	22	11	11	12
MOS	34	12	22	44	13	11	46	11	11	12	22	11	12	22
<i>Cv. de Madeira</i>														
M 4	44	12	22	22	13	22	44	11	11	22	22	11	12	22
M 5	24	11	22	22	33	22	66	11	11	22	22	11	22	12

TABLA III.19 (CONT.)

Genotipos de los cultivares (continuación)

	Got1	Got2	ldh1	ldh2	Mdh1	Me1	Pgl1	Pgm1	Pgm2	Skd1	Sod5	Tpl1	Tpl2	Tpl3
M7	24	11	22	22	33	12	26	11	11	22	22	11	22	12
M10	22	12	22	24	33	12	66	11	11	22	12	11	12	12
M14	24	12	22	22	13	22	66	11	11	22	12	11	22	22
M16	22	11	22	22	13	12	66	11	11	22	12	11	22	22
M17	22	11	22	22	33	22	25	11	11	22	22	11	22	12
M19	44	11	22	22	33	12	66	11	11	22	22	11	22	12
M23	24	11	22	22	33	22	66	11	11	22	22	11	22	12
M25	22	11	22	22	33	11	66	11	11	22	12	11	12	22
<i>Cv. de Ecuador</i>														
LPL	33	22	22	24	11	11	26	11	11	22	22	0	22	22
LPP	44	22	22	22	11	12	24	11	11	22	12	11	12	22
E1	34	22	22	44	11	12	24	11	11	22	12	11	12	22
E2	34	22	22	24	11	12	45	11	11	22	12	11	11	22
E3	33	nn	22	44	11	12	66	12	11	22	12	12	22	12
E4	33	22	22	24	11	11	26	12	11	22	22	12	12	22
E5	33	22	22	24	11	11	66	11	11	22	12	11	12	12
E6	23	22	22	24	11	11	66	11	11	22	12	11	12	11
E8	23	22	22	44	11	11	66	11	11	22	22	11	12	22
E9	33	22	22	22	11	11	66	12	11	22	12	11	12	22
E10	33	22	22	24	11	12	66	11	11	22	12	11	22	22
E11	34	22	22	24	11	22	45	11	11	22	12	11	12	22
E12	34	22	22	24	11	11	66	11	11	22	22	11	12	22
E13	33	22	22	22	12	11	25	11	11	22	12	11	12	12
E14	33	22	22	44	11	11	25	11	11	22	12	11	12	22

TABLA III.19 (CONT.)

Genotipos de los cultivares (continuación)

	Got1	Got2	ldh1	ldh2	Mdh1	Me1	Pgl1	Pgm1	Pgm2	Skd1	Sod5	Tpl1	Tpl2	Tpl3
E15	33	22	22	24	11	11	46	11	11	22	12	11	12	22
E16	33	22	22	24	11	11	55	11	11	22	12	11	12	12
E17	24	22	22	22	11	11	46	11	11	22	22	11	12	12
E18	33	22	22	24	11	11	66	11	11	22	12	11	12	22
E20	34	22	22	22	11	12	46	11	11	22	12	11	11	22
E21	34	22	22	22	11	11	46	11	11	22	22	11	12	22
E22	34	22	22	24	11	12	46	11	11	22	12	11	12	11
E23	33	22	22	24	11	22	25	11	11	22	22	11	12	22
E24	33	24	22	24	12	11	26	11	11	22	22	11	22	12
E25	33	22	22	24	11	11	66	11	11	22	12	11	22	12
E26	34	22	22	22	11	11	66	11	11	22	12	11	12	22
E27	33	22	22	22	12	11	46	11	11	22	22	11	12	22
E28	33	22	22	22	11	11	26	11	11	22	12	11	22	22
E29	34	22	22	24	12	11	66	11	11	22	12	11	12	22
E30	34	22	22	22	11	11	66	11	11	22	12	11	11	22
E31	33	22	22	24	11	12	66	11	11	22	22	11	22	22
E32	33	12	22	24	23	11	66	11	11	22	12	11	11	11
E33	33	22	22	24	11	12	45	11	11	22	12	11	12	22
E34	34	22	22	22	11	11	46	11	11	22	12	11	11	22
E35	33	22	22	22	12	11	24	11	11	22	12	0	22	22
E36	44	22	22	22	11	11	24	11	11	22	11	11	11	22
E37	34	22	22	44	11	11	46	11	11	22	22	11	11	22
E38	34	22	22	24	11	11	46	11	11	22	22	11	12	22
E39	34	22	22	24	11	11	46	11	11	22	12	11	12	22

TABLA III.19 (CONT.)

Genotipos de los cultivares (continuación)

	Got1	Got2	ldh1	ldh2	Mdh1	Me1	Pgl1	Pgm1	Pgm2	Skd1	Sod5	Tpl1	Tpl2	Tpl3
<i>Cv. de Perú</i>														
C1	33	22	22	22	12	12	66	11	11	22	22	11	22	22
C2	33	22	22	24	11	12	46	11	11	22	22	11	12	22
C3Td	33	22	22	44	11	12	25	11	11	22	22	11	12	22
C3Te	33	22	22	24	12	12	65	11	11	22	22	11	22	22
C4	33	12	22	24	23	12	46	11	11	22	12	11	22	22
CU	33	22	22	24	12	12	56	11	11	22	22	11	22	22
P410	12	22	22	22	11	11	44	11	12	12	22	11	11	12
P604	12	22	22	24	11	12	66	12	11	22	22	11	22	22
P606	14	22	22	22	11	11	44	11	12	12	22	11	11	12
PE	23	12	22	24	13	12	44	11	11	22	22	11	12	22
SP77	33	22	22	24	12	11	56	11	11	22	12	11	11	22
P78	23	22	22	24	11	12	44	11	11	22	12	11	12	12
P1	33	22	22	24	12	11	44	11	11	22	12	11	12	22
P2	33	22	22	24	11	12	46	11	11	22	22	11	22	22
P3	33	22	22	22	11	11	44	11	11	22	12	11	11	22
P4	34	22	22	24	11	11	46	11	11	22	12	11	12	22
P5	34	12	22	44	13	22	44	11	11	22	12	11	11	22
P6	33	22	22	44	12	11	44	11	11	22	12	11	11	22
P7	33	22	22	24	11	12	44	11	11	22	12	11	12	22
P8	33	22	22	44	11	11	44	11	11	22	12	11	12	22
P10	33	22	22	24	13	22	44	11	11	22	12	11	12	22
P11	33	11	22	22	33	12	44	11	11	22	22	11	12	22

TABLA III.19 (CONT.)

Genotipos de los cultivares (continuación)

	Got1	Got2	ldh1	ldh2	Mdh1	Me1	Pgl1	Pgm1	Pgm2	Skd1	Sod5	Tpl1	Tpl2	Tpl3
P12	33	12	22	24	13	22	46	11	11	22	12	11	12	22
P13	33	22	22	44	11	11	66	11	11	22	12	22	12	22
P15	33	22	22	24	11	11	44	11	11	22	12	11	11	22
P17	33	22	22	44	11	22	46	11	11	22	22	12	22	22
P18	33	22	22	44	22	12	46	11	11	22	22	11	12	22
P19	34	22	22	24	11	11	44	11	11	22	22	11	12	22
P20	34	44	22	24	11	11	44	22	11	22	12	11	12	12
P22	33	nn	22	24	11	11	44	12	11	22	22	11	11	22
P23	22	11	22	22	33	22	44	11	11	22	12	11	12	22
P25	34	22	22	24	12	12	46	11	11	22	22	11	11	22
P26	33	22	22	24	11	11	44	11	11	22	22	11	22	22
P27	33	22	22	44	22	22	44	11	11	22	22	11	12	22
P29	33	22	22	24	12	11	46	11	11	22	22	11	12	12
P33	22	22	22	44	11	12	44	11	12	22	12	11	12	22
P34	33	24	22	22	11	11	24	11	11	22	22	11	11	12
P35	34	22	22	24	12	12	44	11	11	22	12	11	12	11
P38	22	22	22	24	11	11	46	12	11	22	12	11	12	12
P39	34	22	22	22	11	11	46	11	11	22	12	11	22	12
P40	34	22	22	22	11	11	44	11	11	22	22	11	12	22
P41	33	22	22	22	11	11	44	11	11	22	12	12	11	12
P42	33	44	22	22	11	11	24	11	11	22	22	11	11	12
P43	33	22	22	24	11	11	44	11	11	22	22	11	11	12
P44	22	22	22	22	11	11	44	11	11	22	22	11	12	22
P45	33	22	22	24	11	12	46	11	11	22	12	11	12	22

TABLA III.19 (CONT.)

Genotipos de los cultivares (continuación)

	Got1	Got2	ldh1	ldh2	Mdh1	Me1	Pgl1	Pgm1	Pgm2	Skd1	Sod5	Tpl1	Tpl2	Tpl3
P46	33	22	22	24	11	22	46	11	11	22	12	nm	22	22
P47	34	22	22	24	11	12	44	11	11	22	12	11	11	22
P48	34	22	22	22	11	22	44	12	11	22	22	11	12	12
P49	34	24	22	44	11	11	44	12	11	22	22	11	11	12
P50	44	24	22	22	11	12	24	11	11	22	22	12	12	12
P51	34	22	22	22	11	11	44	11	11	22	22	11	11	22
P52	33	22	22	24	12	12	44	11	11	22	22	22	12	22
P53	34	22	22	22	11	11	25	11	11	22	12	11	11	12
P54	34	22	22	44	11	11	46	11	11	22	22	12	22	22
P55	33	22	22	44	13	11	24	11	11	22	22	22	12	12
P56	44	22	22	24	11	12	44	11	11	22	12	11	12	12
P57	34	22	22	22	11	12	44	11	11	22	12	11	12	22
P58	33	24	22	44	11	12	56	11	11	22	22	12	12	12
P59	34	22	22	24	11	11	25	11	11	22	12	22	11	12
P60	34	22	22	22	11	11	46	11	11	22	12	11	22	12
P61	24	22	22	22	11	11	46	11	11	22	22	11	11	22
P62	33	22	22	22	11	12	24	11	11	22	22	11	11	22
P64	24	24	22	24	11	11	24	12	11	22	22	11	11	22
P66	24	22	22	24	11	11	44	11	11	22	22	11	12	22
P67	33	22	22	24	11	11	24	11	11	22	12	11	12	22
P68	33	22	22	24	11	11	24	11	11	22	12	11	12	22
P69	24	22	22	22	11	12	44	11	11	22	12	nm	22	12
P71	34	22	22	24	11	11	24	11	11	22	11	11	12	12
P72	33	22	22	22	11	22	66	11	11	22	22	11	12	12

TABLA III.19 (CONT)

Genotipos de los cultivares (continuación)

	Got1	Got2	Idh1	Idh2	Mdh1	Me1	Pgl1	Pgm1	Pgm2	Skd1	Sod5	Tpl1	Tpl2	Tpl3
P73	34	24	22	24	11	11	44	12	11	22	12	11	12	12
P74	44	22	22	22	11	11	44	11	11	22	22	nn	22	12
P75	34	22	22	44	11	11	46	11	11	22	22	11	11	22
P76	34	22	22	44	11	12	44	11	11	22	12	11	12	12
P77	34	24	22	44	11	11	46	11	11	22	22	11	11	12
P78	33	22	22	24	11	11	44	11	11	22	12	12	12	12
P79	34	22	22	24	11	11	25	12	11	22	12	11	12	22
P80	33	22	22	24	11	11	24	11	11	22	11	11	12	22
P81	33	22	22	22	11	12	46	11	11	22	22	11	12	12
P83	33	22	22	24	11	12	44	11	11	22	12	12	12	12
P84	33	22	22	44	11	12	44	11	11	22	22	11	12	22
P85	33	22	22	24	11	11	44	11	11	22	22	11	12	11
P86	33	22	22	44	11	22	44	11	11	22	22	11	12	12
P87	34	22	22	22	11	12	44	11	11	22	22	11	12	22
P88	33	22	22	44	11	11	44	11	11	22	12	11	12	12
P89	23	22	22	44	11	22	46	11	11	22	12	11	12	12
P90	33	24	22	24	11	11	46	11	11	22	12	11	11	12
P91	33	24	22	24	11	12	25	11	11	22	12	12	12	22
P92	44	22	22	22	11	11	24	12	11	22	22	nn	22	22
P93	34	22	22	24	11	12	24	12	11	22	22	11	12	12
P94	23	22	22	22	11	11	24	11	11	22	12	11	12	12
P95	34	24	22	44	11	12	46	11	11	22	22	11	22	22
P96	34	22	22	44	11	11	44	22	11	22	11	22	11	22
P102	23	22	22	24	11	11	44	11	11	22	11	11	12	22

TABLA III.19 (CONT.)

Genotipos de los cultivares (continuación)

	Got1	Got2	ldh1	ldh2	Mdh1	Me1	Pgi1	Pgm1	Pgm2	Skd1	Sod5	Tpl1	Tpl2	Tpl3
P104	23	24	22	44	11	11	44	11	11	22	22	11	12	22
P105	33	44	22	22	11	11	44	11	11	22	22	11	12	22
P108	33	22	22	44	11	12	44	11	11	22	11	11	12	11
P107	33	22	22	24	11	11	44	11	11	22	22	12	11	22
P108	33	12	22	24	23	12	66	11	11	22	12	12	11	22
P114	33	12	22	44	13	12	46	11	11	22	22	11	22	22
P115	34	22	22	24	12	12	46	11	11	22	22	12	22	22
P116	44	11	22	22	33	22	44	11	11	22	22	11	12	22
P117	34	22	22	44	11	22	46	11	11	22	12	12	11	22
P118	33	12	22	24	23	22	44	11	11	22	12	11	22	22
P119	33	22	22	44	11	22	66	11	11	22	22	11	22	22
P120	34	22	22	24	11	12	46	11	11	22	22	11	22	22
P121	33	12	22	44	33	22	46	11	11	22	22	12	12	22
P122	33	12	22	44	23	22	66	11	11	22	22	11	12	22
P123	33	22	22	22	11	11	44	11	11	12	22	11	12	12
P125	33	12	22	44	23	22	44	11	11	22	22	22	22	22
P126	33	12	22	22	13	12	56	11	11	22	22	12	22	22
P127	34	11	22	44	23	12	56	11	11	22	12	12	22	22
P128	33	22	22	44	11	12	44	11	11	22	22	11	22	12
P129	33	22	22	24	12	12	44	11	11	22	22	11	22	22
P130	33	22	22	22	22	11	44	11	11	22	22	11	22	22
P131	33	22	22	22	12	12	56	11	11	22	22	11	22	22
P132	33	12	22	22	11	12	44	11	11	22	22	11	11	12
P133	23	22	22	24	13	11	56	11	11	22	12	12	12	22

TABLA III.19 (CONT.)

Genotipos de los cultivares (continuación)

	Got1	Got2	Idh1	Idh2	Mdh1	Me1	Pgl1	Pgm1	Pgm2	Skd1	Sod5	Tpl1	Tpl2	Tpl3
P135	33	22	22	24	12	22	44	11	11	22	12	11	22	22
P136	33	22	22	44	22	12	44	11	11	22	22	11	11	22
P137	33	22	22	24	12	12	44	11	11	22	22	11	12	22
P138	33	22	22	24	12	11	44	11	11	22	12	11	11	22

En los 210 cultivares genotipados encontramos 200 genotipos diferentes y diez cv. que muestran genotipos idénticos a los de otros cultivares. En total hay nueve grupos de cv. de genotipo idéntico:

Campas y Campas Mejorada. Estos dos cultivares españoles muestran el mismo patrón de bandas para los 23 genes estudiados, así como para Lap-1, Lap-2, Lap-3 y Aco-1, cuatro genes más no analizados en el presente trabajo (Perfecti, 1992; Pascual et al., 1993).

Ambos cultivares presentan características morfológicas y fisiológicas similares cuando crecen en la misma parcela y por lo tanto es lícito suponer que se trata del mismo cultivar, o mucho más improbable, de una mutación ocurrida en algún locus no isoenzimático y por lo tanto no detectable con la metodología empleada.

Fino de Jete y Hill. Fino de Jete es el cv. más cultivado en España y Hill proviene de Chile, aunque hay dudas acerca de su ascendencia (J. M. Farré, comunicación personal), es por tanto improbable que se trate de una entrada duplicada. Estos cultivares presentan genotipos, para determinados loci, que se hayan en baja frecuencia en la colección (así Got-1: 24 aparece en menos de 20 cv. o Pgm-2: 12 en tan solo en 14 cultivares). Además también son idénticos para Adh-1. Todo ello nos lleva a concluir que se trata del mismo cultivar.

Concha, Concha Lisa y Azapa-II. Estas entradas que provienen de Chile, pueden posiblemente tratarse del mismo cultivar, que ha recibido diferentes denominaciones según el lugar de procedencia: Concha procede de la Estación Experimental "La Platina" (Chile), Concha Lisa ha sido

incorporado a la colección desde California y Azapa-II desde la E. E. "Esmeralda" (Chile).

Madeira 5 y Madeira 23. Estos cultivares que, como su denominación indica, proceden de Madeira probablemente representan entradas duplicadas en el banco de germoplasma.

Selección Perú 67 y Selección Perú 68. Son dos entradas del banco de germoplasma incorporadas tras la expedición a Perú, recolectados en la región de San Pablo (Cajamarca). Posiblemente el fenotipo que presentaban divergía por causas ambientales y motivo su inclusión como dos cv. diferentes.

Selección Perú 39 y Selección Perú 60. Estos cv. proceden de dos localidades próximas (Marra y Chuanche) de la zona de Asunción (Cajamarca, Perú).

Selección Perú 4 y Selección Ecuador 39. En este caso los cultivares proceden de lugares claramente diferentes y alejados. Puede que sean diferentes para otras características pero para los 22 genes analizados son idénticos.

Selección Perú 75 y Selección Ecuador 37. Al igual que en el caso anterior, se trata de dos zonas de recogida claramente diferenciadas en las que aparecen genotipos idénticos.

Selección Ecuador 10 y Chilena. El primer cv. procede de la zona de Puellarro de Ecuador y el segundo de Chile, pero ha sido incorporado a la colección desde California.

En varios de los casos anteriores se dan genotipos "típicos", entendiendo por tales los formados por los genotipos más frecuentes para cada gen estudiado. Sin embargo, ningún cultivar de los analizados posee el genotipo teórico "más común": Got-1: 33, Got-2: 22, Idh-1: 22, Idh-2: 24, Mdh-1: 11, Me-1: 11, Pgi-1: 44, Pgm-1: 11, Pgm-2: 11, Skd-1: 22, Sod-5: 22, Tpi-1: 11, Tpi-2: 12, Tpi-3: 22 y 11 para los demás loci monomórficos.

Con los alelos puestos de manifiesto en este trabajo se pueden identificar más de ochenta mil millones (89 282 100 000) de genotipos diferentes (si consideramos solo los alelos de chirimoyo la cifra baja a 2 125 760 000), por lo tanto no es de extrañar que menos del 10% de los cultivares estudiados presenten genotipos idénticos.

3.4. FRECUENCIAS ALÉLICAS.

En las siguientes tablas aparecen recogidas las frecuencias alélicas que encontramos en toda la colección (210 cultivares) (tabla III.20) y las que encontramos en según el país de procedencia de los cv. de chirimoyo (tabla III.21).

Cuando se estudia la tabla III.20 se observa la clara diferencia entre las chirimoyas y las atemoyas. Estas últimas poseen alelos "extraños", como ya comentamos en la sección 3.1, que posiblemente procedan del otro progenitor de este híbrido, la especie *A. squamosa*.

Además puede observarse que 11 alelos de chirimoyos aparecen con una frecuencia menor o igual al 10 %, pudiéndose considerar raros. Esto representa un 25 % (un 30 % si sólo consideramos los genes polimórficos) de todos los alelos encontrados en chirimoyo.

En cuanto a la distribución por países (excluyendo a los atemoyos), como se observa en la tabla III.21, los alelos no muestran un claro patrón geográfico. La mayoría de de estos aparecen en gran parte de los países. Si clasificamos los alelos siguiendo el criterio de Nevo & Beiles (1989):

I. *Comunes* (frecuencia ≥ 0.1 en al menos una población, en nuestro caso procedencia)

-*locales* (en una población)

-*esporádicos* (en dos poblaciones)

-*distribución amplia* (en más de tres poblaciones)

II. *Raros* (frecuencia < 0.1)

-*locales* (en una población)

-*distribución amplia* (en más de una población)

la mayoría (89% -ó el 86% si no consideramos los loci monomórficos-) se encuadran dentro de los alelos comunes de distribución amplia. Únicamente cinco alelos (11% -ó el 14% sin considerar los genes que no presentan variabilidad-) muestran distribuciones más restringidas. A saber: Got-2:4, Got-2:n y Tpi-1: n únicamente aparecen en cv. de Ecuador y Perú, y entrarían en la categoría de alelos *raros de distribución amplia*; Idh-2:1 y Pgi-1:n aparecen únicamente en cv. de Estados Unidos con lo que son considerados *locales*. La mayoría de estos alelos son nulos, lo que en cierta forma explica su escasa

presencia en la colección de cv. Sin embargo hay que destacar que son países como Perú y Ecuador los que muestran principalmente estos alelos, quizás debido al mayor tamaño de muestra o bien a que precisamente son estos países las region de origen del chirimoyo. Los cv. de Estados Unidos presentan dos alelos exclusivos de esta procedencia. Es el único país que presenta alelos de esta categoría, a pesar de haber analizado sólo 10 cv. de origen californiano. Así, este país presenta más del 90% de los alelos encontrados en chirimoyo (figura 3.30). USA es, junto a Perú, el país de procedencia que presenta un más alto porcentaje de los alelos encontrados en chirimoyo.

FIGURA 3.30

En esta figura se representa el porcentaje de alelos (sin contabilizar los de los genes monomórficos) que encontramos en diferentes grupos de cultivares según su procedencia. Para las atemoyas no se han contabilizado los alelos exclusivos de estos cv.

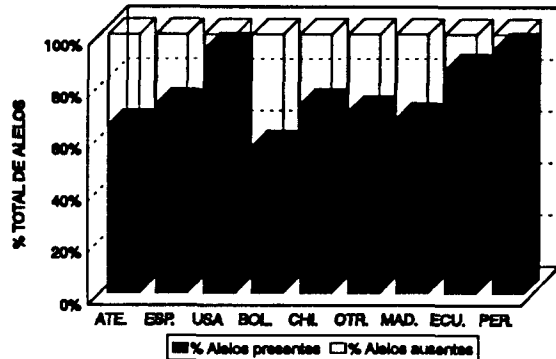


TABLA III.20

Frecuencias alélicas para toda la colección, en chirimoyas y atemoyas.

GEN	ALELO	COLECCIÓN	ATEMOYAS	CHIRIMOYAS
Got-1	1	0.021	0.000	0.022
	2	0.100	0.000	0.102
	3	0.648	0.875	0.643
	4	0.231	0.125	0.233
Got-2	1	0.117	0.375	0.112
	2	0.819	0.125	0.833
	3	0.007	0.375	0.000
	4	0.048	0.125	0.046
	n	0.010	0.000	0.010
ldh-1	1	0.017	0.875	0.000
	2	0.983	0.125	1.000
ldh-2	1	0.005	0.000	0.005
	2	0.567	0.500	0.568
	3	0.010	0.500	0.000
	4	0.419	0.000	0.427
Mdh-1	1	0.779	0.125	0.791
	2	0.114	0.500	0.107
	3	0.107	0.375	0.102
Men-1	1	0.657	0.000	0.670
	2	0.343	1.000	0.330
Pgi-1	2	0.083	0.000	0.085
	3	0.010	0.500	0.000
	4	0.517	0.000	0.527
	5	0.079	0.375	0.073
	6	0.310	0.125	0.313
	n	0.002	0.000	0.002

TABLA III.20 (CONT.)

Frecuencias alélicas para la colección de cultivares (continuación).

GEN	ALELO	COLECCIÓN	ATEMOYAS	CHIRIMOYAS
Pgm-1	1	0.950	1.000	0.949
	2	0.050	0.000	0.051
Pgm-2	1	0.952	0.500	0.961
	2	0.038	0.000	0.039
	2'	0.010	0.500	0.000
Skd-1	1	0.040	0.500	0.032
	2	0.960	0.500	0.968
Sod-6	1	0.245	0.625	0.238
	2	0.755	0.375	0.762
Tpi-1	1	0.869	0.750	0.871
	2	0.102	0.250	0.100
	n	0.029	0.000	0.029
Tpi-2	1	0.476	0.500	0.476
	2	0.524	0.500	0.524
Tpi-3	1	0.212	0.000	0.216
	2	0.781	0.625	0.784
	1'	0.007	0.375	0.000
Acp-2	1	1.000	1.000	1.000
Dia-1	1	1.000	1.000	1.000
Got-3	1	1.000	1.000	1.000
Mdh-2	1	1.000	1.000	1.000
Pgl-2	1	1.000	1.000	1.000
Pgd-2	1	1.000	1.000	1.000
Skd-2	1	1.000	1.000	1.000
Sod-5	1	1.000	1.000	1.000

3.5 DIVERSIDAD

Se han calculado varios parámetros que miden diversos aspectos de la variabilidad genética que presenta la colección de cultivares. Los valores n° de loci polimórficos, porcentaje de estos con respecto al total de genes estudiados (con excepción de Adh-1), n° de alelos y n° alelos/locus para cada cultivar se presentan tabulados en el anexo II. Las medias de estos valores, para toda la colección, para chirimoyos, atemoyas y por procedencias aparecen en la tabla III.22.

En dicha tabla se puede observar que varios de los valores de variabilidad genética son mayores en las atemoyas que en las chirimoyas y que, al incluir en los cálculos a las primeras, los valores para toda la colección aumentan. Así el polimorfismo (P) pasa de 59.09 en los chirimoyos al 63.64 en toda la colección, lo que supone un aumento del 7.7%; el número de alelos por locus (A) aumenta un 13.2%, pasando de 2.05 a 2.32 alelos/locus; los valores de heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) aumentan un 3.4% y un 3% respectivamente. Sin embargo, los valores ligados a medias ponderadas con el total de cultivares (media del número de loci heterocigotos en cada cultivar (LH/cv), media del número de alelos por locus en cada cultivar (A/L) o el número de alelos diferentes por cultivar ($n^{\circ}A/cv$)) apenas si se ven incrementados debido al pequeño número de atemoyas estudiado en proporción al total de cultivares. El número de alelos/locus y el polimorfismo muestran en atemoyas valores más bajos que en el caso de los chirimoyos, posiblemente debido a que estos parámetros son claramente dependientes del tamaño de la muestra (Nei, 1987) y el número de atemoyas estudiadas es reducido.

Pasemos a continuación a comentar de forma individualizada cada uno de los parámetros de variabilidad para los diferentes países de procedencia de los cultivares.

N^o de alelos por locus (A).

En chirimoyos obtenemos un valor de 2.05 alelos/locus. A este valor contribuyen notablemente dos procedencias: Perú y Estados Unidos. Estos países presentan la mayor parte de los alelos encontrados en chirimoyos (figura 3.30). Ambas procedencias muestran los valores máximos para los países de origen (1.95 alelos/locus) pero a partir de tamaños muestrales muy diferentes

TABLA III.22

Algunas medidas de la variabilidad genética que presenta la colección de cultivares.

	A	P	He	Ho	LH/cv	n ^o A/cv	A/L
<i>Colección</i>	2.32 (.30)	63.64	0.206 (.047)	0.167 (.039)	3.65 (.12)	25.65 (.12)	1.17 (.01)
<i>Atemoyas</i>	1.75 (.18)	54.55	0.292 (.063)	0.409 (.099)	9.00 (.41)	31.00 (.41)	1.41 (.02)
<i>Chirimoyas</i>	2.05 (.25)	59.09	0.199 (.046)	0.162 (0.039)	3.53 (.11)	25.55 (.11)	1.16 (.00)
<i>España</i>	1.59 .17)	45.45	0.150 (.044)	0.176 (.054)	3.88 (.72)	25.88 (.72)	1.18 (.03)
<i>USA</i>	1.95 (.23)	59.09	0.225 (.053)	0.223 (.055)	4.90 (.38)	26.90 (.38)	1.22 (.02)
<i>Bolivia</i>	1.32 (.10)	31.82	0.155 (.051)	0.167 (.065)	3.67 (1.20)	25.67 (1.20)	1.17 (.05)
<i>Chile</i>	1.59 (.16)	50.00	0.173 (.029)	0.105 (.029)	2.30 (.56)	24.30 (.56)	1.10 (.03)
<i>Otros</i>	1.55 (.14)	45.45	.209 (.054)	0.170 (.053)	3.75 (.75)	25.75 (.75)	1.17 (.03)
<i>Madeira</i>	1.50 (.16)	40.91	0.139 (.040)	0.136 (.040)	3.00 (.42)	25.00 (.42)	1.14 (.02)
<i>Ecuador</i>	1.82 (.21)	50.00	0.163 (.045)	0.164 (.051)	3.62 (.19)	25.62 (.19)	1.17 (.01)
<i>Perú</i>	1.95 (.22)	59.09	0.188 (.044)	0.162 (.040)	3.53 (.15)	25.53 (.15)	1.16 (.01)

A = n^o medio de alelos por locus

P = polimorfismo (criterio del 0.99)

He = heterocigosidad esperada

Ho = heterocigosidad observada

LH/cv = media del n^o de loci heterocigotos en cada cultivar

n^oA/cv = media del n^o de alelos en cada cultivar

A/L = media del n^o de alelos por locus en cada cultivar

Entre parentesis figura el error estandar.

(USA con 10 cv. y Perú con 122). En el otro extremo se situa Bolivia con tan sólo 1.32 alelos/locus. Entre estos dos valores se sitúan los demás grupos de cultivares (figura 3.31). En general se aprecia un patrón característico, que

también observaremos en otras medidas de variabilidad: Perú y Ecuador muestran valores altos, los demás orígenes mantienen menor cantidad de variabilidad, salvo Estados Unidos que destaca sobre el resto de países que no están incluidos en la región de origen de la especie.

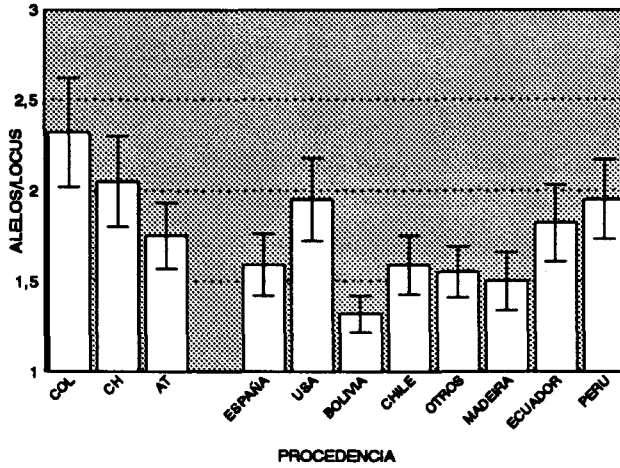


FIGURA 3.31

Valor del número de alelos/locus (A) en las diferentes regiones de procedencia de los cultivares de chirimoyo. Los valores se sitúan entre 1.32 de Chile y 1.95 de Perú y Estados Unidos. COL = toda la colección. CH = sólo los chirimoyos. AT = sólo los atemoyos.

Polimorfismo (P)

Para el total de los chirimoyos obtenemos un nivel de polimorfismo idéntico al que encontramos en Perú y Estados Unidos, un valor de 50.09 (tabla III.22). El mínimo aparece en Bolivia, con tan solo el 31.82 % de sus loci polimórficos. Salvo USA, los demás países de origen muestran niveles de polimorfismo menores que los encontrados en Perú y Ecuador.

Los valores máximos en chirimoyos son mayores que el que aparece en atemoyas. El incremento del polimorfismo que se produce como consecuencia de la aparición de alelos extraños, procedentes de *A. squamosa*, no es suficiente para elevar por encima del total de chirimoyos, el valor de P en atemoyas. Si

no consideramos estos alelos extraños, las atemoyas presentarían un valor de aproximadamente 36.4 %, similar al del mínimo de chirimoyos (Chile), y probablemente debido al pequeño número de individuos estudiados en atemoyas.

Diversidad Genética (H_e)

La heterocigosidad esperada o Diversidad genética (Nei, 1973b) es uno de los parámetros más usados para medir el grado de variabilidad que presentan las poblaciones.

Como comentamos anteriormente, las atemoyas presentan mayores niveles de H_e que los chirimoyos, pero no de forma significativa como muestran las barras de error en la figura 3.32.

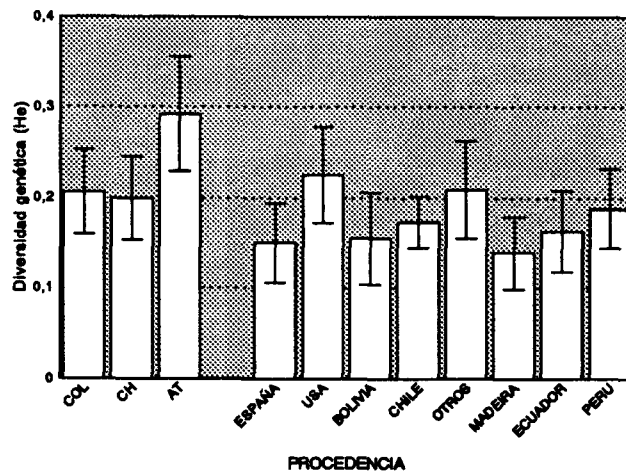


FIGURA 3.32

Valores de Diversidad Genética (H_e) para los diferentes grupos de cultivares. Como se aprecia las barras de errores se solapan indicando la ausencia de diferencias significativas. COL = toda la colección. CH = sólo los chirimoyos. AT = sólo los atemoyas.

Como se aprecia en la figura 3.32 no aparecen diferencias significativas

entre los valores de H_e para los diferentes países de procedencia. Con tamaños de muestra pequeños este valor puede ser muy variable y por tanto presenta márgenes de error considerables. Estudiando más de diez individuos, H_e se estabiliza y ofrece unos valores fiables. Esto es así ya que H_e depende más del número de loci estudiado que del número de individuos (Nei, 1987).

Heterocigosidad observada (H_o)

Cuando se observa la figura 3.33 lo primero que se hace evidente es la gran diferencia en heterocigosidad entre los chirimoyos y los atemoyos. Estos últimos presentan niveles de H_o de más del doble de los que presentan los chirimoyos (tabla III.19).

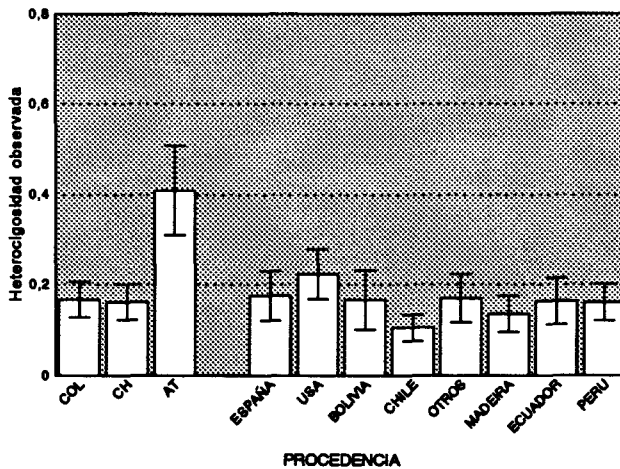


FIGURA 3.33

Heterocigosidad observada. La H_o que presenta las atemoyas (AT) es más del doble de la que presentan los chirimoyos (CH) y la media de toda la colección (COL).

Este valor de H_o en las atemoyas es debido a su origen híbrido, lo que hace que gran parte de sus loci aparezcan ocupados por alelos diferentes (uno

de *A. cherimola* y el otro de *A. squamosa*) y por lo tanto sean heterocigotos. Pero su papel en el nivel de heterocigosidad de toda la colección es muy limitado.

En cuanto a los valores de este parámetro para las diferentes procedencias de los cultivares de chirimoyo se puede apreciar que USA presenta el valor máximo, pero sin ser significativamente diferente al de los demás países de procedencia. Únicamente Chile destaca por un valor claramente (y significativamente) inferior al de USA. Este valor es posiblemente inferior al real pues estamos considerando tres cultivares (Concha, Concha lisa y Azapa-II) con idéntico genotipo y ambos con $H_o = 0$, lo que hace que la media descienda y marque el mínimo entre los chirimoyos. Si descartáramos a los cv. de igual genotipo, la media de Chile no sería significativamente diferente a la de los demás grupos de chirimoyos.

Si se compara el polimorfismo con la Heterocigosidad observada se puede advertir como el polimorfismo es una medida que aumenta con el número de alelos, y por tanto del número de loci que pueden ser heterocigotos (de forma independiente a como están distribuidos los loci heterocigotos entre los cultivares). H_o , sin embargo, es un valor *medio* entre todos los cultivares y por tanto refleja más claramente como está distribuida la variabilidad entre los cultivares (o grupos de cv.).

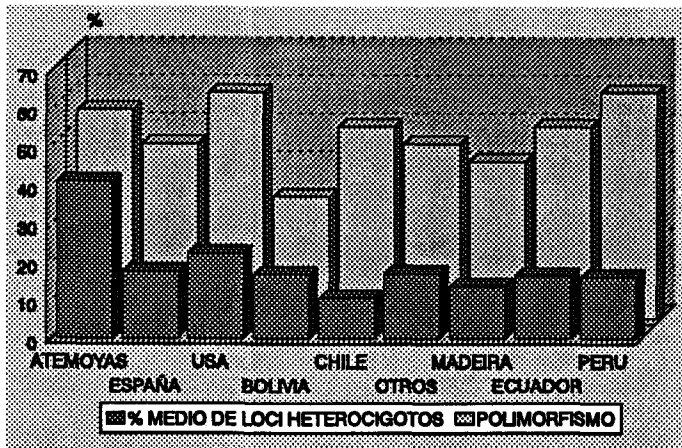


FIGURA 3.34

Polimorfismo y Heterocigosidad observada para los diferentes grupos de cultivares estudiados.

Por ejemplo, en la figura 3.34 se aprecia que las atemoyas presentan el valor máximo de H_o que indica que más de la mitad de sus loci son heterocigotos y por lo tanto polimórficos. Sin embargo el polimorfismo que presentan no es el máximo, pues este depende directamente de la cantidad de alelos muestreados y esta cantidad a su vez es proporcional al número de individuos (cv.) analizados. Por el contrario Perú presenta valores bajos de H_o , pero máximos de P , indicando que aunque el cultivar *medio* de Perú tiene pocos loci heterocigotos, el conjunto de ellos mantiene una gran diversidad.

La heterocigosidad observada también puede indicarse mediante el número de loci heterocigotos por cultivar (que a fin de cuentas es el valor del que se obtiene H_o). La figura 3.35 presenta los intervalos de variación que se dan en los diferentes grupos de cultivares para este valor. Se aprecia lo comentado anteriormente, a saber, los atemoyos aparecen como más heterocigotos que el resto. Además se advierten los amplios márgenes de variación de algunas procedencias.

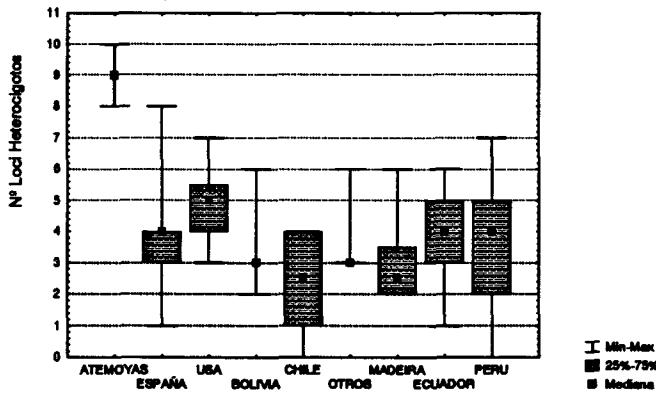


FIGURA 3.35

Intervalos de variación del número de loci heterocigotos que presentan los atemoyos y los diferentes países de procedencia de los cultivares.

Es lógico esperar que las procedencias ampliamente representadas (Perú y Ecuador) presenten amplios intervalos de variación. Más sorprende es

encontrar un amplio margen de variación en países de procedencia peor representados (como España). Únicamente Chile y Perú son los países de procedencia entre los estudiados que presentan cultivares sin ningún loci heterocigoto.

Si se consideran los valores medios de LH/cv. se aprecia como los chirimoyos quedan totalmente separados de los atemoyos, y dentro de los chirimoyos países como USA presentan valores altos para el número de loci heterocigotos por cultivar.

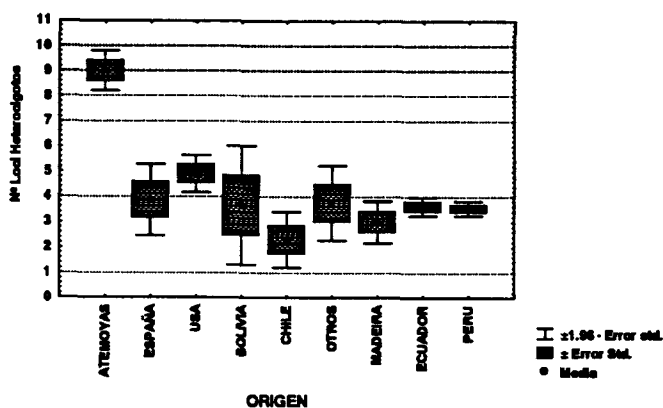


FIGURA 3.36

Medias del número de loci heterocigotos por cultivar (LH/cv) en los diferentes países de procedencia y en las atemoyas.

Se aprecia en la figura 3.36 que al disminuir el número de cv. muestreado aumenta el error estándar asociado a la media. Por eso es arriesgado hacer conjeturas acerca de si USA presentaría una media más próxima a los demás grupos de chirimoyos (Perú y Ecuador como modelo) si la muestra de cv. estudiados de dicha procedencia hubiese sido más amplia. Lo que si se puede decir es que la muestra de cultivares de USA es más heterocigota que la mayoría de las otras procedencias (tabla III.23).

En general, el número de loci heterocigotos por cultivar sigue una distribución parecida a la de la curva normal con una media de 4 LH/cv., tal y como se aprecia en el histograma de la figura 3.37. El 60 % de los cultivares presentan de 3 a 5 loci heterocigotos.

Sin embargo, la distribución de este parámetro en cada país de procedencia muestra una distribución más discontinua, poniendo de manifiesto, en muchos casos, que las muestras son demasiado pequeñas.

En la figura 3.38 se intenta reflejar este hecho, países como Bolivia, España o Chile presentan distribuciones claramente discontinuas que bien pueden significar un tamaño muestral muy reducido o bien la poca variabilidad a partir de la cual se han desarrollado los cultivares que ahora reconocemos como procedentes de esos países.

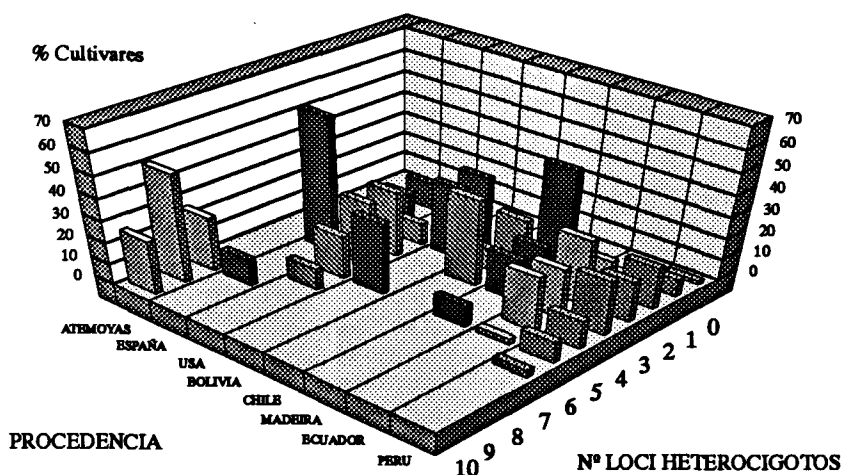


FIGURA 3.38

Porcentaje de cultivares de cada procedencia que muestran un determinado número de loci heterocigotos

Distribución de la diversidad

La diversidad genética se puede particionar en diversos componentes inter e intra grupales. Varios son los métodos para realizar este tipo de análisis (Weir, 1990; Nei, 1987). Aquí se ha utilizado el análisis de la varianza de Wright (1978), que es fácilmente equiparable al de Nei (1973, 1977).

Hemos realizado este tipo de análisis para averiguar que proporción de la diversidad se encuentra intra-países y cual en las diferencias entre países. La tabla III.24 muestra los resultados para los chirimoyos, habiéndose eliminado las atemoyas del análisis. Los valores de Diversidad Total (H_T) para los loci polimórficos aparecen bajo el epígrafe *Varianza límite* y para el total de los chirimoyos se ha obtenido un valor de 0.379. D_{ST} , la diversidad inter-países, aparece en la columna denominada *Varianza actual*, y tiene un valor medio de 0.085. La diversidad intra-países de procedencia (H_S) no aparece reflejada directamente, pero se obtiene fácilmente como $H_T - D_{ST}$, con el valor 0.294. Por último la proporción de la diversidad total que se encuentra entre países es G_{ST} que aparece en la tabla III.21 como F_{DT} , y muestra un valor medio para los loci polimórficos de 0.223. Todos los valores de G_{ST} son significativamente distintos de 0 (Test de Workman & Niswander (1970), nivel de significación: 0.001).

Si consideramos las atemoyas como otro grupo de cultivares al mismo nivel que los países de procedencia de los cultivares, se produce un pequeño aumento en estos parámetros de variabilidad. La Diversidad Total (H_T) para los loci polimórficos sube hasta un valor de 0.402. D_{ST} , la diversidad inter-países aumenta hasta 0.108. La diversidad intra-grupos (atemoyas y países de procedencia) (H_S) pasa a 0.293 y la G_{ST} toma el valor 0.269 que aparece en la tabla III.21 como F_{DT} , y muestra un valor medio para los loci polimórficos de 0.223.

Si se evalúan estos parámetros considerando únicamente dos grupos (atemoyas y chirimoyas) los parámetros de diversidad intra e inter-grupales siguen estando en el mismo abanico de valores ($H_T = 0.472$, $D_{ST} = 0.095$, $H_S = 0.377$ y $G_{ST} = 0.202$).

TABLA III.2A

Partición de la diversidad en componentes inter e intra grupales (procedencias)

LOCUS	Alelo	Frecuencia media	Varianza muestral	Varianza actual	Varianza limite	F ₀₂
Got-1	1	.08279	.00607	.01990	.07593	.262
	2	.13275	.00365	.03080	.11513	.267
	3	.48201	.01312	.05513	.24968	.221
	4	.30245	.00943	.03191	.21097	.151
	Total	---	.03227	.13774	.65171	.211
Got-2	1	.23737	.00821	.08586	.18103	.474
	2	.74184	.00854	.07946	.19151	.415
	4	.01656	.00035	.00032	.01629	.019
	n	.00423	.00004	.00003	.00421	.007
	Total	---	.01715	.16567	.39304	.421
Idh-2	1	.01250	.00056	.00053	.01234	.043
	2	.68521	.00862	.03410	.21570	.158
	4	.30229	.00843	.03325	.21091	.158
	Total	---	.01761	.06789	.43895	.155
Mdh-1	1	.77308	.00614	.05673	.17543	.323
	2	.08592	.00390	.00004	.07854	.001
	3	.14100	.00287	.07087	.12112	.585
	Total	---	.01290	.12764	.37508	.340
Men-1	1	.64447	.01226	.03289	.22913	.144
	2	.35553	.01226	.03289	.22913	.144
	Total	---	.02451	.06578	.45826	.144
Pgi-1	2	.06747	.00221	.00086	.06292	.014
	4	.38938	.00969	.04743	.23776	.199
	5	.08979	.00437	.00090	.08173	.011
	6	.44710	.00844	.07413	.24720	.300
	7	.00625	.00030	.00000	.00621	.000
	Total	---	.02500	.12332	.63583	.194
Pgm-1	1	.93385	.00528	.00608	.06177	.098
	2	.06615	.00528	.00608	.06177	.098
	Total	---	.01056	.01216	.12354	.098
Pgm-2	1	.88180	.00784	.00898	.10423	.086
	2	.11820	.00784	.00898	.10423	.086
	Total	---	.01567	.01795	.20846	.086

136 *Capítulo tercero. Resultados*

TABLA III.24 (CONT.)

LOCUS	Alelo	Frecuencia media	Varianza muestral	Varianza actual	Varianza límite	F_{DT}
Skd-1	1	.08279	.00441	.00985	.07593	.130
	2	.91721	.00441	.00985	.07593	.130
	Total	---	.00881	.01971	.15187	.130
Sod-6	1	.16260	.00569	.00941	.13616	.069
	2	.83740	.00569	.00941	.13616	.069
	Total	---	.01138	.01883	.27232	.069
Tpi-1	1	.82871	.00489	.06059	.14195	.427
	2	.16078	.00480	.06243	.13493	.463
	3	.01051	.00009	.00026	.01040	.025
	Total	---	.00979	.12328	.28727	.429
Tpi-2	1	.40567	.00844	.05941	.24110	.246
	2	.59433	.00844	.05941	.24110	.246
	Total	---	.01687	.11883	.48220	.246
Tpi-3	1	.34649	.01085	.05083	.22643	.224
	2	.65351	.01085	.05083	.22643	.224
	Total	---	.02170	.10166	.45287	.224
Media		----	.01725	.08465	.37934	.223

Varianza límite = H_T = Diversidad total para los genes polimórficos

Varianza actual = $H_T - H_S = D_{ST}$ = Divesidad inter-países de procedencia

$F_{DT} = G_{ST}$ = proporción de la diversidad total que se encuentra en las diferencias entre países

3.6 DISTANCIAS GENÉTICAS Y DENDROGRAMA.

A partir de los genotipos de los cultivares se ha obtenido la matriz de distancias de χ^2 y la matriz de distancias insesgadas de Nei (Nei, 1978) (anexo III y IV respectivamente).

La distancia de χ^2 no es una verdadera distancia genética, pues al contrario que la de Nei, sus valores no implican un modelo poblacional o evolutivo, simplemente proporcionando un valor numerico a las diferencias en frecuencias alélicas entre dos cultivares. Se ha calculado esta distancia pues maximiza las diferencias entre cultivares obteniendo así una visión a mejor escala de las relaciones entre los diferentes cv. estudiados. Sin embargo, como las distancias de χ^2 dependen del número de alelos muestreado, no son comparables con otros datos obtenidos con otras muestras de alelos, por ello se ha calculado la distancia insesgada de Nei, que al ser un valor normalizado para el número de loci y ser ampliamente utilizado, proporciona un valor de referencia para comparar con otros estudios. Hay que hacer notar que la utilización de la distancia de Nei no implica aquí la asunción de su significado evolutivo, pues nosotros trabajamos con cultivares (individuos) y no con poblaciones naturales.

Todos los estudios basados en las distancias se han realizado con la matriz de distancias de χ^2 y no con la de Nei. No obstante, también se podían haber realizado con esta última, sin haber encontrado marcadas diferencias en los resultados. Esto es así debido a que ambas matrices son similares, mostrando una gran concordancia en sus valores. Así el coeficiente de correlación de rangos (Kendall τ) = 0.930320 con un nivel de significación de $p = 0.00$.

Distancias de χ^2

Los valores de distancia de χ^2 que aparecen en la matriz están comprendidos entre 0 y 4.55. La distancia 0 la presentan aquellos cultivares que son idénticos genotípicamente (CA y CM, FI y HI, etc, como ya se comentó en este mismo capítulo -sección 3.3-). El máximo lo encontramos entre un cultivar de Madeira (M17) y uno de Perú (P96).

En general, la mayoría de las distancias entre cultivares se sitúan entre los valores 2 y 3 lo que viene a significar diferencias medias en 4 y 9 genes respectivamente.

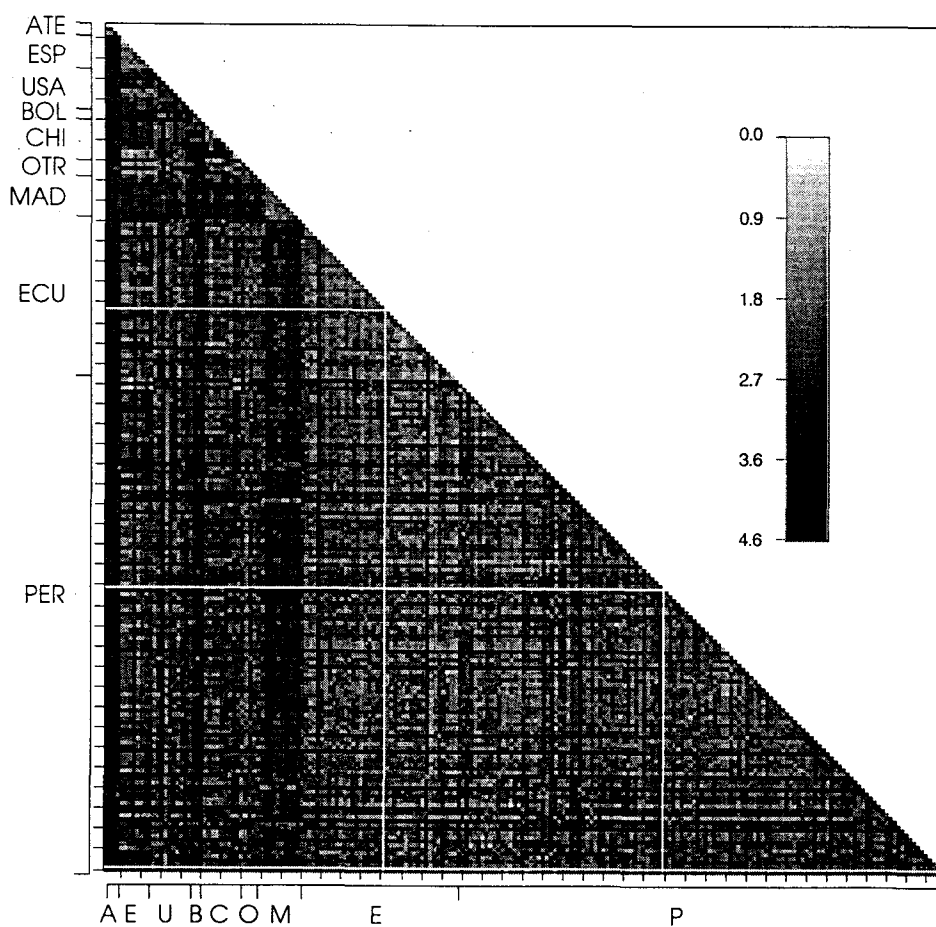


FIGURA 3.38
Representación gráfica de la matriz de distancias de χ^2 .

esto es, primero las 4 atemoyas (indicadas por la abreviatura ATE en la horizontal y A en la vertical), seguido por los 8 cv. de procedencia española (representados por ESP y E), los 10 de USA (abreviatura: USA y U), los 3 de Bolivia (BOL y B), los 10 chilenos (CHI y C), los 4 de otros orígenes (OTR y O), los 10 de Madeira (MAD y M), los 39 de Ecuador (ECU Y E) y por último los 122 de Perú (indicados por PER y P).

Los valores de distancias han sido clasificadas en 10 clases, de tal forma que a cada una de ellas le corresponde una tonalidad de gris, en una escala que va desde el blanco (distancia de 0.00) al negro (la máxima distancia = 4.55).

En esta gráfica se pueden visualizar las relaciones globales de un cv. o grupo de cv. con los demás cultivares. Así por ejemplo, las atemoyas mantienen altos valores de distancias con respecto a los demás cv. de chirimoyo, que contrastan con las menores distancias que existen entre los componentes de este grupo de cv.. Esto puede observarse por la banda oscura que aparece justamente encima del eje horizontal de la matriz, que representa las distancias entre las atemoyas y los chirimoyos; sin embargo, como puede observarse al inicio de la matriz, cerca de la diagonal, la banda se hace más gris, reflejando lo comentado anteriormente: las distancias entre las atemoyas son menores que las existentes entre estas y los chirimoyos.

Otro ejemplo pueden constituirlo los cultivares de Madeira, que también muestran un patrón similar al de las atemoyas. Los cv. de Madeira muestran una amplia franja oscura cuando "atraviesan" las regiones de la matriz determinadas por otros países de procedencia y sin embargo esta zona es más clara (menores valores de distancia) cuando se enfrentan entre ellos (cerca de la diagonal).

Este mismo patrón de diferencias lo muestran otros grupos de cultivares como los procedentes de Bolivia, Chile y algunas selecciones de Perú, como los cv. P410, P604 y P606 o la selección P23.

Relaciones entre procedencias.

Las relaciones intra e inter-países de procedencia pueden estudiarse si se obtienen las medias de las distancias de χ^2 de los cultivares de un mismo país y relacionan con las medias de las distancias entre países de procedencia. La siguiente tabla (tabla III.23) recoge las medias, el error y los máximos y mínimos de los valores de distancias de χ^2 para cada procedencia. Al mismo

TABLA III.26

Medias de las distancias de χ^2 entre procedencias.

χ^2	ATE	ESP	USA	BOL	CHI	OTR	MAD	ECU	PER
ATE	2.19±.37 (0.82-3.21)								
ESP	3.82±.04	1.85±.10 (0.00-2.71)							
USA	3.55±.05	2.69±.05	2.59±.05 (1.91-3.16)						
BOL	3.86±.09	3.19±.04	2.92±.08	1.86±.23 (1.41-2.16)					
CHI	3.56±.05	2.76±.08	2.52±.04	3.11±.08	2.33±.13 (0.00-3.46)				
OTR	3.55±.09	2.37±.13	2.53±.08	3.20±.09	2.47±.08	2.55±.23 (1.63-3.16)			
MAD	3.43±.06	3.18±.03	2.97±.03	3.04±.05	3.10±.03	2.98±.05	1.91±.08 (0.00-2.83)		
ECU	3.55±.02	2.60±.02	2.47±.02	3.02±.03	2.39±.02	2.29±.03	2.98±.02	2.07±.02 (0.82-3.65)	
PER	3.57±.01	2.65±.02	2.52±.01	3.15±.02	2.41±.01	2.38±.02	3.04±.01	2.31±.01	2.34±.01 (0.00-4.00)

Distancias medias y su error estandar. Entre paréntesis el mínimo y el máximo para cada grupo de distancias de χ^2 .

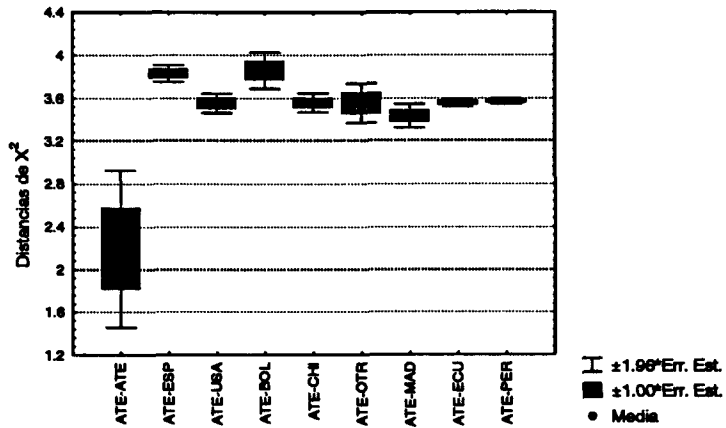
tiempo es una matriz de distancias medias entre países de procedencia.

Estas distancias medias pueden compararse entre si mediante pruebas estadísticas no paramétricas, debido a que sus distribuciones no siguen una normal. El test empleado ha sido el de la U de Mann-Whitney. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto las relaciones de homogeneidad o heterogeneidad de los cultivares de una misma procedencia.

Empezando con las atemoyas, se puede apreciar en la figura 3.39 que las distancias intra-procedencia son menores que las distancias con los cv. de otras procedencias. Mediante el estadístico U de Mann-Whitney se ha comprobado que las diferencias entre medias son estadísticamente altamente significativas ($p < 0.001$), lo que implica que los cv. de atemoyas muestra características comunes que los hacen marcadamente diferentes del resto de los cv.

FIGURA 3.39

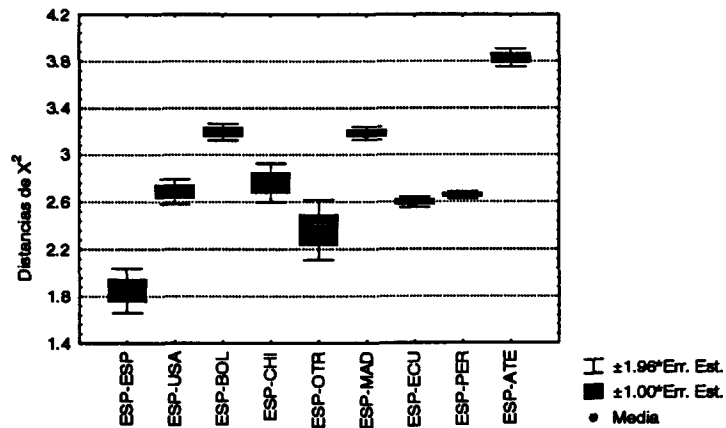
Relaciones entre las medias de las distancias de χ^2 entre las atemoyas y entre estas y los demás países de procedencia de los cultivares.



El siguiente grupo de cultivares es el de procedencia española. Al igual que ocurre con las atemoyas, los cultivares de España forman un grupo homogéneo en el sentido de que los valores medios de distancias intra-grupo son menores que los valores medios al enfrentarlos a los demás países de procedencia, tal y como podemos apreciar visualmente en la figura 3.40. Todos los valores son significativamente diferentes de la media de distancias entre los cv. de España.

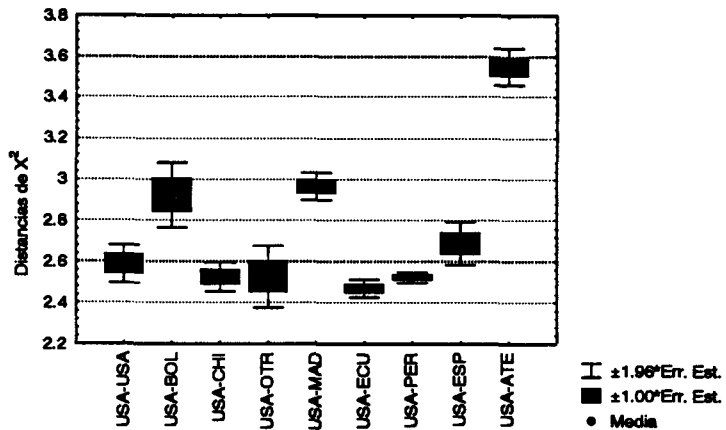
FIGURA 3.40

Comparación de las medias de las distancias de χ^2 entre las cv. de España y entre estos y los demás países de procedencia de los cultivares.



Los cultivares de Estados Unidos sin embargo muestran un patrón diferente, las distancias intra-grupo son en algunos casos iguales o incluso mayores que las distancias inter-países, tal y como se pone de manifiesto en la figura 3.41. La media de distancia entre los cv. de USA no es significativamente diferente (test U de Mann-Whitney) de la media de distancia entre USA y Perú, USA y Ecuador, USA y Chile, USA y España y entre USA y los cultivares incluidos bajo el epígrafe Otros.

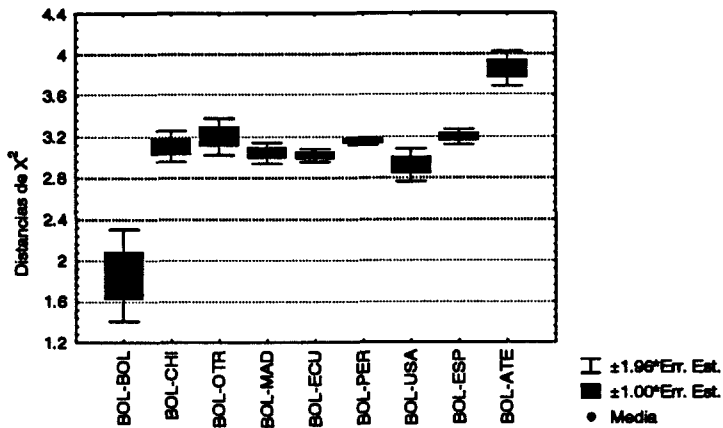
FIGURA 3.41
Medias de las distancias de χ^2 entre los cultivares de Estados Unidos y entre estos y los demás países de procedencia.



Bolivia muestra unos cultivares muy homogéneos, con una distancia media entre ellos reducida y menor que las distancias con los otros agrupamientos de cultivares (figura 3.42). Las diferencias de las medias intra país con las medias inter países son significativas.

FIGURA 3.42

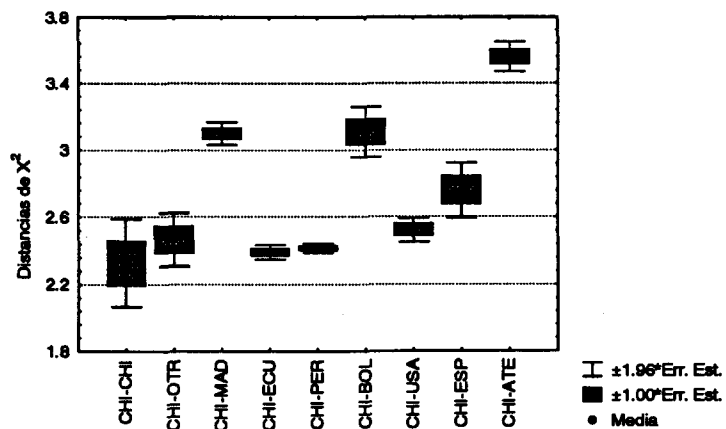
Medias de las distancias de χ^2 entre los cultivares de Bolivia y entre estos y los demás países de procedencia.



Al igual que los cultivares de Estados Unidos, los chilenos no muestran una media intra-país significativamente diferente a la que muestran con otros países como USA, Perú, Ecuador o los cuatro agrupados bajo Otros (figura 3.43).

FIGURA 3.43

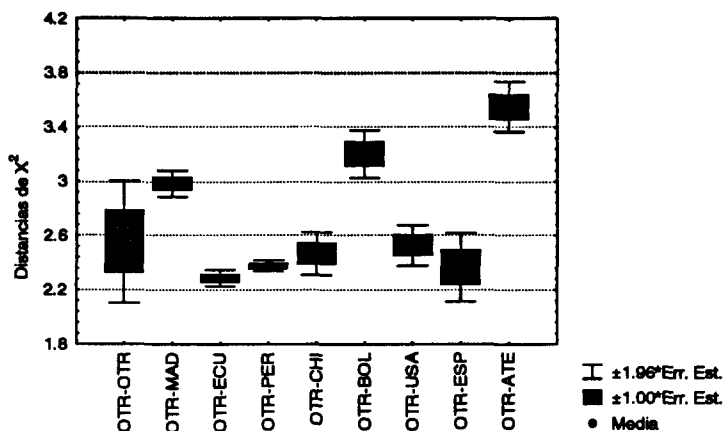
Medias de las distancias de χ^2 entre los cultivares chilenos y entre estos y los demás países de procedencia.



Los cuatro cultivares englobados bajo el epígrafe de "otros" muestran un patrón similar al comentado anteriormente para USA (figura 3.44), esto no es sorprendente ya que realmente estos cultivares tienen orígenes diversos. No aparecen diferencias significativas con las medias de las distancias entre Otros y los siguientes países: Perú, Ecuador, Madeira, Chile, Estados Unidos y España.

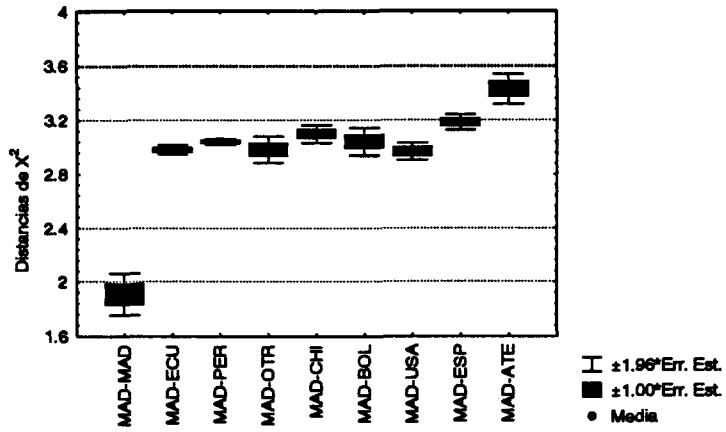
FIGURA 3.44

Medias de las distancias de χ^2 entre los cultivares englobados bajo Otros y entre estos y los demás países de procedencia.



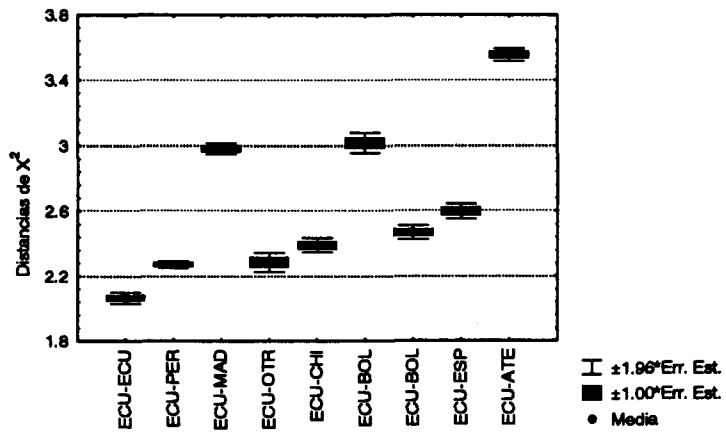
Los cultivares de Madeira aparecen (figura 3.45) como un agrupamiento muy homogéneo y con distancias medias inferiores a las que mantienen con los cultivares de otros países (tal y como se comentó al explicar la figura 3.38). Las diferencias entre las medias son altamente significativas en todos los casos.

FIGURA 3.45
Medias de las distancias de χ^2 entre los cultivares procedentes de Madeira y entre estos y los demás países de procedencia.



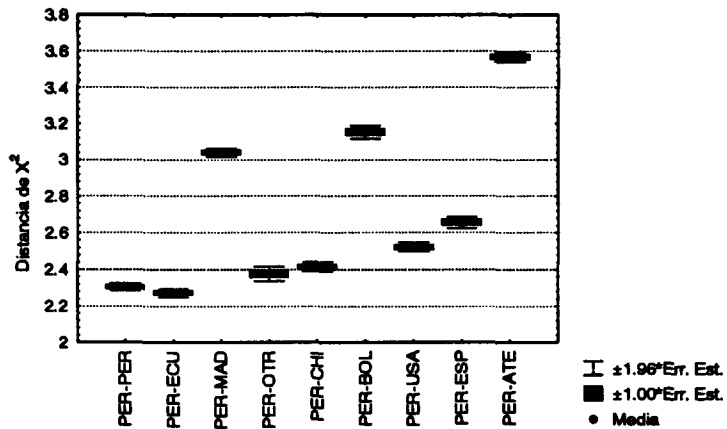
Las selecciones procedentes de Ecuador, en general, muestran mayor relación de similitud entre si que con las selecciones procedentes de otros lugares. La media de las distancias de χ^2 intra-país es significativamente menor que las medias de las distancias con los demás orígenes (figura 3.46), prueba de la homogeneidad de las selecciones.

FIGURA 3.46
Medias de las distancias de χ^2 entre los cultivares procedentes de Ecuador y entre estos y los demás países de procedencia.



Por último los cultivares de Perú muestran algunas características interesantes (figura 3.47). Su distancia media intra-país es mayor que la que presentan con respecto a Ecuador. Además dicha media no es significativamente diferente de la media de las distancias entre Perú y Otros. Todo esto indica que los cultivares de Perú se muestran como un grupo heterogeneo.

FIGURA 3.47
Medias de las distancias de χ^2 entre los cultivares procedentes de Perú y entre estos y los demás países de procedencia.

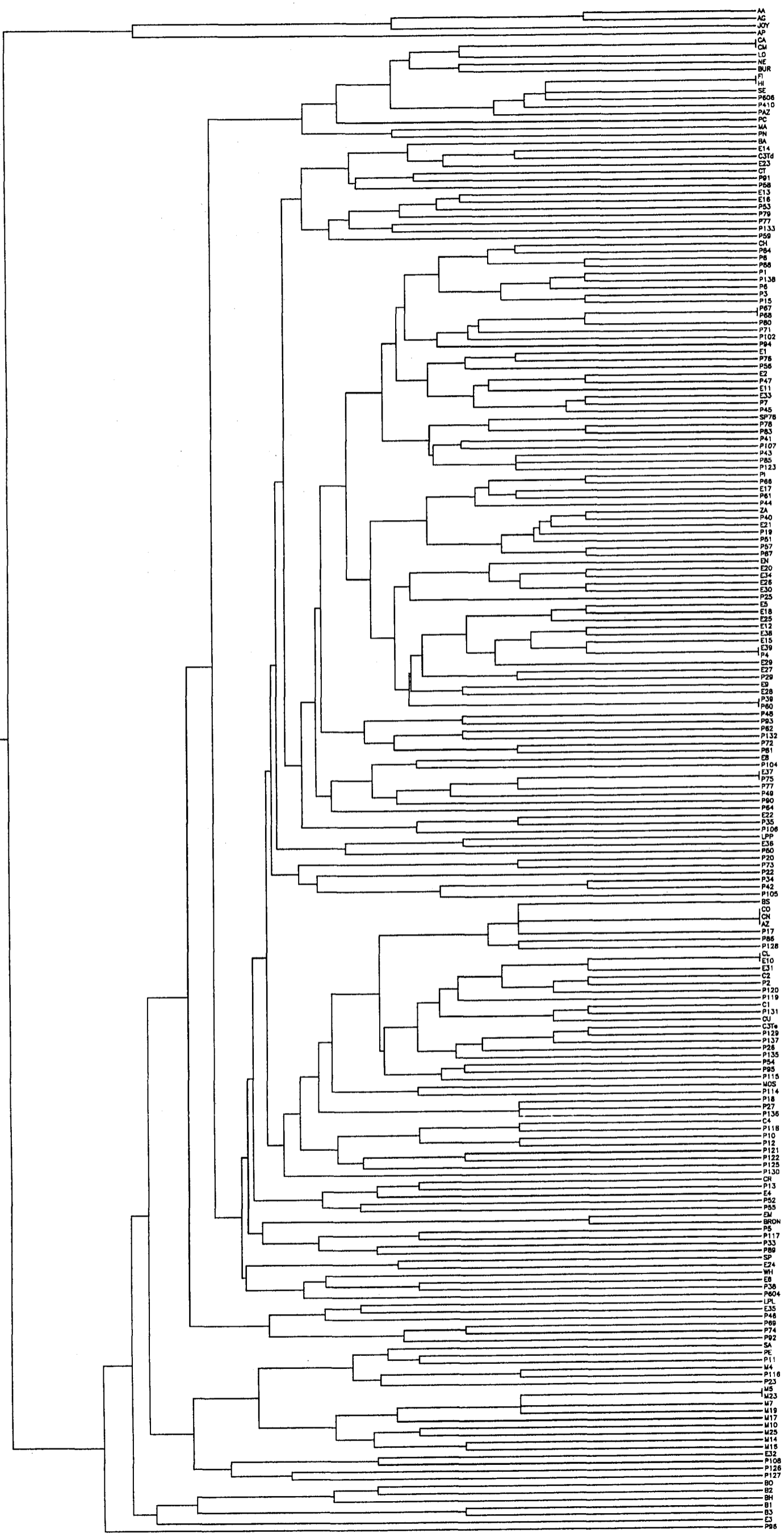


Dendrograma

A partir de la matriz de distancias de χ^2 se ha construido un dendrograma mediante el procedimiento UPGMA (lamina I) que muestra las relaciones de similitud de los diferentes cultivares. Este dendrograma, que no debe interpretarse como un árbol evolutivo o de parentesco, muestra relaciones de similitud alélica entre los cultivares.

Si se observa en detalle pueden apreciarse ciertas relaciones entre los cultivares. Como era esperado, los cultivares de atemoya aparecen agrupados

(en la zona superior del dendrograma) en un cluster diferente del que reúne a las chirimoyas. Dentro de estas últimas los cultivares españoles, que aparecen en la zona inmediatamente inferior al cluster de las atemoyas, se muestran agrupados en un cluster junto con algunos cultivares de Perú (P606 u P410). Asimismo los cv. procedentes de Bolivia aparecen también en un cluster separado junto a algunos cv. de USA (en la zona inferior del dendrograma). Los cultivares de Madeira se encuentran agrupados en otro cluster (en la figura aparecen en el cluster que se encuentra inmediatamente por encima de los cv. de Bolivia). El resto de cultivares aparecen repartidos por los demás agrupamientos.



3.7. ANÁLISIS FACTORIAL

En esta sección se reúnen los resultados de someter las frecuencias alélicas a varias técnicas de agrupamiento, para así intentar establecer patrones de divergencia entre cultivares. Se tratarán dos procedimientos estadísticos con características bien distintas. Primero el análisis factorial de correspondencias (AFC) y posteriormente el análisis discriminante (AD). El AFC utiliza toda la información (variables) para representar los patrones de variación existentes. El AD extrae las variables más útiles para ajustar los casos a un modelo propuesto.

Análisis Factorial de Correspondencias

Cuando sometemos nuestros datos (tabla de cultivares x frecuencias alélicas) al análisis factorial de correspondencias obtenemos una representación sintética de la organización de la variación isoenzimática (Bennaceur et al., 1991).

El AFC encuentra asociaciones entre las variables (frecuencias alélicas) y una serie de ejes ortogonales que recogen la variación que encontramos, de tal forma que los primeros ejes muestran la mayor parte de esta. Al disminuir el número de variables a un número considerablemente menor de ejes, podemos visualizar más claramente las relaciones entre los cultivares.

La asociación entre cultivares y frecuencias alélicas es medida por una χ^2 de Pearson, que es repartida en ejes independientes (el análisis de componentes principales prácticamente opera igual, al particionar la varianza total en lugar de la χ^2) (BMDP manual). Patrones similares de distribución espacial en el espacio definido por estos ejes nos indican patrones isoenzimáticos parecidos.

El recuadro III.1 muestra un resumen de los resultados de someter la tabla de frec. alélicas al AFC. Al valor χ^2/N (similar a la variación total) se le denomina *inercia total*, y al valor de esa inercia total que retiene cada eje *eigenvalue* (valor propio).

Como se puede observar los dos primeros ejes tan solo llegan a explicar el 28.3 % de la inercia total, y los tres primeros el 35.6 %. Se plantea así la imposibilidad de representar los datos en espacios bidimensionales o tridimensionales sin perder la mayor parte de la variación (información).

RECUADRO III.1

Análisis factorial de correspondencias de la tabla de frecuencias alélicas.

ANÁLISIS DE LA TABLA DE FRECUENCIAS OBSERVADAS				
INERCIA TOTAL = SUMA DE EIGENVALUES = 0.7894				
EJES	EIGENVALUE	% DE INERCIA	ACUM %	HISTOGRAMA
1	0.147	18.7	18.7	*****
2	0.076	9.6	28.3	*****
3	0.058	7.4	35.6	*****
4	0.053	6.7	42.3	*****
5	0.050	6.4	48.7	****
6	0.044	5.5	54.2	****
7	0.036	4.5	58.7	***
8	0.032	4.0	62.7	**
9	0.030	3.8	66.5	**
10	0.027	3.4	69.9	**
11	0.026	3.3	73.2	**
12	0.024	3.1	76.3	**
13	0.023	2.9	79.2	**
14	0.021	2.7	81.9	**
15	0.019	2.5	84.4	*
16	0.018	2.3	86.7	*
17	0.018	2.3	88.9	*
18	0.016	2.0	90.9	*
19	0.014	1.7	92.7	*
20	0.012	1.6	94.3	*
21	0.012	1.5	95.7	*
22	0.011	1.4	97.1	*
23	0.010	1.2	98.3	
24	0.007	0.9	99.2	
25	0.003	0.4	99.6	
26	0.003	0.3	99.9	
27	0.001	0.1	100.0	
CUT-OFF TOLERANCE				90.00%
NUMERO DE FACTORES QUE ACUMULAN EL 90 % DE LA INERCIA ...				18
NUMERO DE FACTORES EXTRAIDOS				18

Este es un problema general que aparece recogido frecuentemente en la bibliografía, donde se pueden encontrar análisis factoriales con porcentajes de la variabilidad explicada en muchas ocasiones por debajo del 50%. Así, por ejemplo, Smith et al. (1985) estudiando maíz y teosinte de México y Guatemala realizan un análisis de componentes principales (ACP) donde los dos primeros ejes explican tan sólo el 38.5 % de la variación, Bennaceur et al. (1991) estudiando cv. de palmera datilera realizan un AFC que en sus dos primeros ejes acumulan el 49.54 % de la variación, Leffort-Buson et al. (1991) también en maíz realizan un ACP que en sus dos primeros ejes explican el 18 y el 15 % de

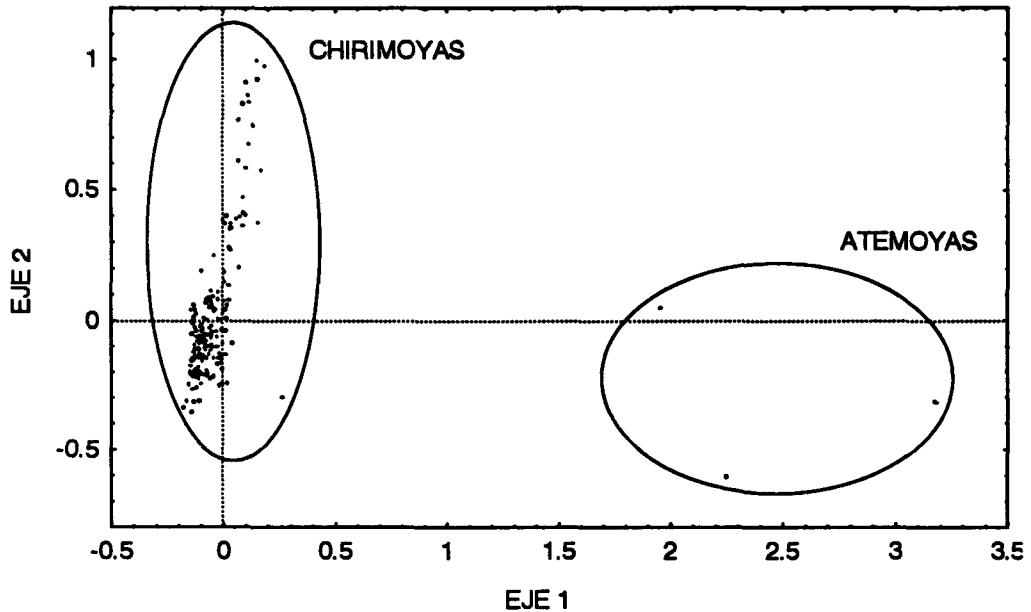


FIGURA 3.48

Análisis factorial de correspondencias. Plano definido por los dos primeros ejes

la variación, Wendel et al. (1992) en una colección de cv. de algodón (agrupados por países de procedencia) realizan un ACP y en los dos primeros ejes se contabiliza el 36 % de la variación.

Cuando se representa a los cultivares en el espacio definido por los dos primeros ejes (figura 3.48) se puede observar la clara diferenciación de las chirimoyas y las atemoyas. Esta separación está claramente explicada por el eje 1. Los chirimoyos se agrupan en un pequeño intervalo de valores del eje 1 y se distribuyen a lo largo del segundo eje. En general, el eje 1 tan sólo representa bien a las atemoyas, que mantienen correlaciones altas con este eje (datos no mostrados).

El segundo eje separa claramente a los cultivares de Madeira, tal y como se puede apreciar en la figura 3.49 que representa el espacio bidimensional delimitado por los ejes segundo y tercero. El segundo eje tan sólo puede representar correctamente a los cultivares de Madeira pues únicamente estos mantienen correlaciones altas con este eje (datos no mostrados).

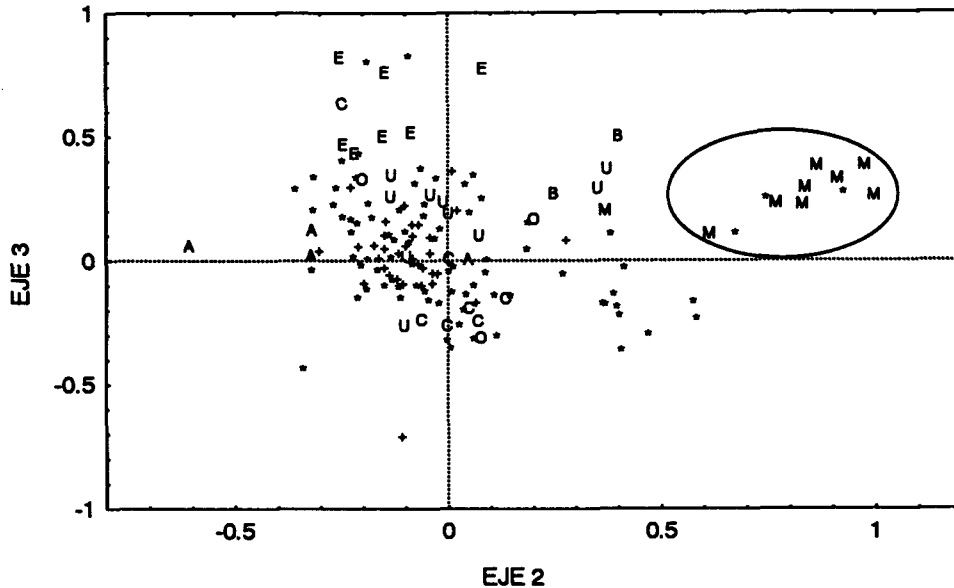


FIGURA 3.49

AFC. Espacio definido por los ejes 2º y 3º. Los cultivares están representados por la Inicial de su región de procedencia (E = España, U = USA, B = Bolivia, C = Chile, O = otros, M = Madeira) salvo Ecuador representado por + y Perú por *.

También se ha realizado un AFC para las frecuencias alélicas de los cultivares agrupados por países de procedencia, en un intento de visualizar las relaciones existentes entre estos. Los cuatro primeros ejes acumulan el 93.7 % de la variación existente en la tabla de frecuencias alélicas. En este caso los primeros ejes retienen gran parte de la información y por tanto se pueden visualizar las relaciones entre los países en el espacio definido por estos sin una apreciable disminución de precisión. El primer eje (49 % de la inercia) separa, como se esperaba, a los cultivares de chirimoyo de las atemoyas. Los ejes segundo (21.8 %), tercero (15 %) y cuarto (7.8 %) muestran la variación que existe entre los países de procedencia de los chirimoyos.

La figura 3.50 representa el espacio definido por los ejes 2º y 3º, donde se puede apreciar como Bolivia y Madeira quedan claramente separados en función de estos ejes. No se muestra el punto correspondiente a las atemoyas

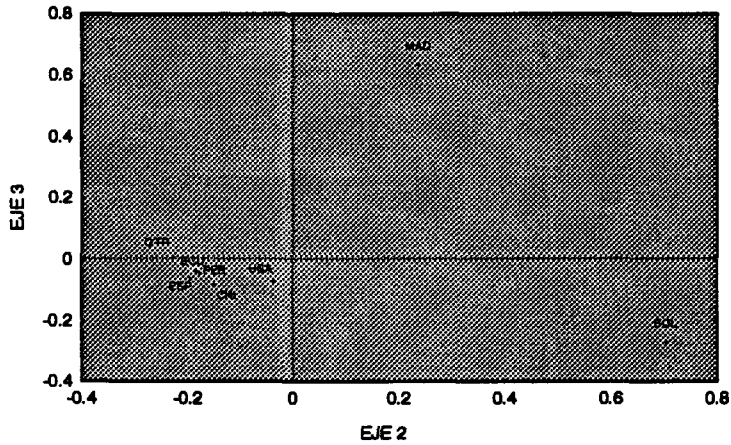


FIGURA 3.50
AFC de la tabla de frecuencias alélicas x países de procedencia. Plano formado por los ejes 2º y 3º.

para mayor claridad. Asimismo no se muestra las gráficas con el primer eje que no aportan más información a lo expuesto anteriormente: el primer eje separa claramente a los cultivares de atemoya no diferenciando entre los diversos orígenes de las chirimoyas, igual que en el AFC para la tabla de frecuencias alélicas de todos los cultivares (figura 3.48).

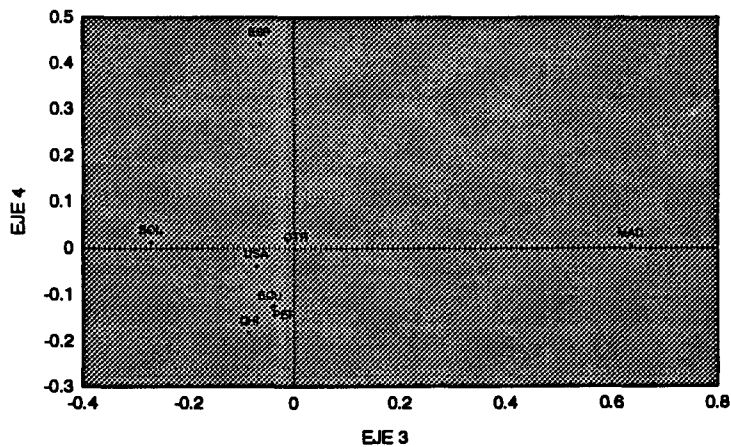


FIGURA 3.50
AFC de la tabla de frecuencias alélicas x países de procedencia. Plano formado por los ejes 3º y 4º.

Por último la figura 3.51 representa el espacio bidimensional configurado por los ejes tercero y cuarto. Aparte de observarse los patrones de ubicación en el eje 3º, se puede advertir que el país de procedencia España que queda claramente diferenciado por el eje 4º.

Análisis Discriminante

Se ha realizado un análisis discriminante para encontrar las variables (alelos) que mejor agrupan a los cultivares de chirimoyo en los diferentes países de procedencia. Al mismo tiempo se puede cuantificar el éxito de esta clasificación mediante un procedimiento *jackknife* (véase el capítulo segundo).

Este análisis se ha realizado únicamente para los cultivares de chirimoyo. Los atemoyos son fácilmente identificables gracias a los alelos *propios* que no presentan los chirimoyos.

Para este procedimiento estadístico se han agrupado los cv. en siete grupos correspondientes a las zonas de procedencia de los cultivares (España, Estados Unidos, Bolivia, Chile, Madeira, Ecuador y Perú). Los cultivares que agrupamos anteriormente como "otros", que tienen diversos orígenes, no se han considerado en los grupos que se establecen previamente al análisis. Se han escogido estos grupos basados en la zona geográfica de procedencia del cultivar por ser esta característica una de las más evidentes y, a priori, incuestionable.

Este análisis extrae los alelos que mejor agrupan a los cultivares en los grupos previamente definidos. El recuadro III.2 muestra un resumen del proceso de obtención de la función discriminante (alelos que van a ser los que mejor discriminan entre grupos). En este recuadro se puede apreciar que se han empleado diez alelos para obtener las funciones de clasificación. Así, por ejemplo, para España tenemos:

$$y = 19.17 \text{ Got-1:1} + 1.27 \text{ Got-1:3} - 19.42 \text{ Got-2:1} + 125.46 \text{ Idh-2:1} + 16.52 \text{ Mdh-1:3} + 10.94 \text{ Pgi-1:4} + 58.46 \text{ Pgi-1:n} + 63.03 \text{ Pgm-2:2} + 145.08 \text{ Skd-1:2} + 0.13 \text{ Tpi-1:2} - 58.06$$

donde *Got-1:1* representa la frecuencia del alelo 1 del gen *Got-1*, y así sucesivamente para las otras 9 variables. Cada cultivar será asignado al país que maximice su valor de "y".

Con las funciones de discriminación se procede a clasificar a los cultivares, obteniéndose la siguiente tabla de clasificación (tabla III.27), donde se puede

RECUADRO III.2

Análisis discriminante. Resumen del proceso de obtención de la función discriminante

SUMMARY TABLE							
STEP NO.	VARIABLE ENTERED REMOVED	F VALUE TO ENTER REMOVE	NO. OF VARIAB. INCLUDED	U-STATISTIC	F-STATISTIC	DEGREES OF FREEDOM	
1	7 Got-2:1	29.454	1	0.5246	29.454	6.0	195.0
2	35 Skd-1:2	23.971	2	0.3012	26.577	12.0	388.0
3	3 Got-1:1	20.330	3	0.1846	24.810	18.0	546.4
4	25 Pgi-1:4	11.201	4	0.1367	21.498	24.0	671.0
5	14 Idh-2:1	11.107	5	0.1014	19.719	30.0	766.0
6	20 Mdh-1:3	9.833	6	0.0773	18.396	36.0	837.1
7	32 Pgm-2:2	8.232	7	0.0613	17.234	42.0	889.9
8	5 Got-1:3	6.380	8	0.0509	16.091	48.0	929.1
9	28 Pgi-1:n	6.439	9	0.0422	15.262	54.0	958.1
10	39 Tpi-1:2	5.359	10	0.0360	14.466	60.0	979.6

CLASSIFICATION FUNCTIONS							
VARIABLE	ESPAÑA	USA	BOLIVIA	CHILE	MADERA	ECUADOR	PERU
Got-1:1	19.16766	60.08892	127.48228	51.91175	43.12426	45.74311	52.85095
Got-1:3	1.27497	6.23007	6.93648	6.74055	-1.94340	5.19902	5.75339
Got-2:1	-19.41672	-32.53611	23.15919	-29.01553	-19.10144	-30.20954	-28.90660
Idh-2:1	125.46220	257.69995	192.27609	160.44856	158.13065	161.06973	165.83762

apreciar que el 71.8 % de los cultivares es agrupado correctamente en su región de origen. El 0 % que aparece en *Otros* no es considerado, pues dicho grupo no se ha empleado en las funciones de clasificación. Además dicha tabla proporciona el número de cultivares que quedan agrupados en grupos erróneos. El anexo 4 presenta el listado de todos los cultivares y la zona de procedencia en la que quedan agrupados (si es errónea), así como la distancia D^2 de Mahalanobis a la media de cada grupo y la probabilidad a posteriori (en un principio las probabilidades se consideran iguales para cada grupo) de que cada cv. pertenezca a un determinado país de procedencia.

Para reducir el sesgo de la tabla de clasificación se ha realizado una validación por el procedimiento conocido como *Jackknife* (tabla III.25). Con este método cada cultivar es clasificado a partir de unas funciones de clasificación obtenidas con todos los cultivares excepto el cv. en cuestión. El *jackknife* es un

TABLA 3.27

Clasificación obtenida mediante el análisis discriminante

MATRIX DE CLASIFICACIÓN

GRUPO	%	NÚMERO DE CLASES CLASIFICADO EN CADA GRUPO						
		CORRECTO	ESPAÑA	USA	BOLIVIA	CHILE	MADEIRA	ECUADOR
ESPAÑA	75.0	6	1	0	0	0	1	0
USA	70.0	0	7	0	0	0	2	1
BOLIVIA	100.0	0	0	3	0	0	0	0
CHILE	10.0	2	0	0	1	0	2	5

caso particular del método general de validación cruzada en el cual las funciones de clasificación son calculadas a partir de un subconjunto de los casos y la probabilidad de clasificación errónea es estimada con los casos restantes (BMDP manual, 1990).

Como se aprecia en la tabla III.25, el empleo del procedimiento Jackknife reduce el éxito del análisis discriminante hasta situarlo en el 68.3 %.

Por último este programa (BMDP 7M) proporciona una representación gráfica de los cultivares a partir de la función discriminante. Se obtienen variables canónicas como combinaciones lineales de las variables de la función de clasificación. En este trabajo se han obtenido seis variables canónicas (ejes ortogonales) que comprenden el 100 % de la dispersión (recuadro III.2). Estas nuevas variables explican la variación de una forma decreciente, así la primera variable canónica recoge la mayor parte de la dispersión (32%), la segunda una parte menor y así sucesivamente.

TABLA III.28

Clasificación Jackknife

GRUPO	%	NÚMERO DE CASOS CLASIFICADOS EN CADA GRUPO						
		CORRECTO	ESPAÑA	USA	BOLIVIA	CHILE	MADEIRA	ECUADOR
ESPAÑA	75.0	6	1	0	0	0	1	0
USA	50.0	1	5	1	0	0	2	1
BOLIVIA	100.0	0	0	3	0	0	0	0
CHILE	0.0	2	0	1	0	0	2	5
OTROS	0.0	1	0	0	0	0	2	1

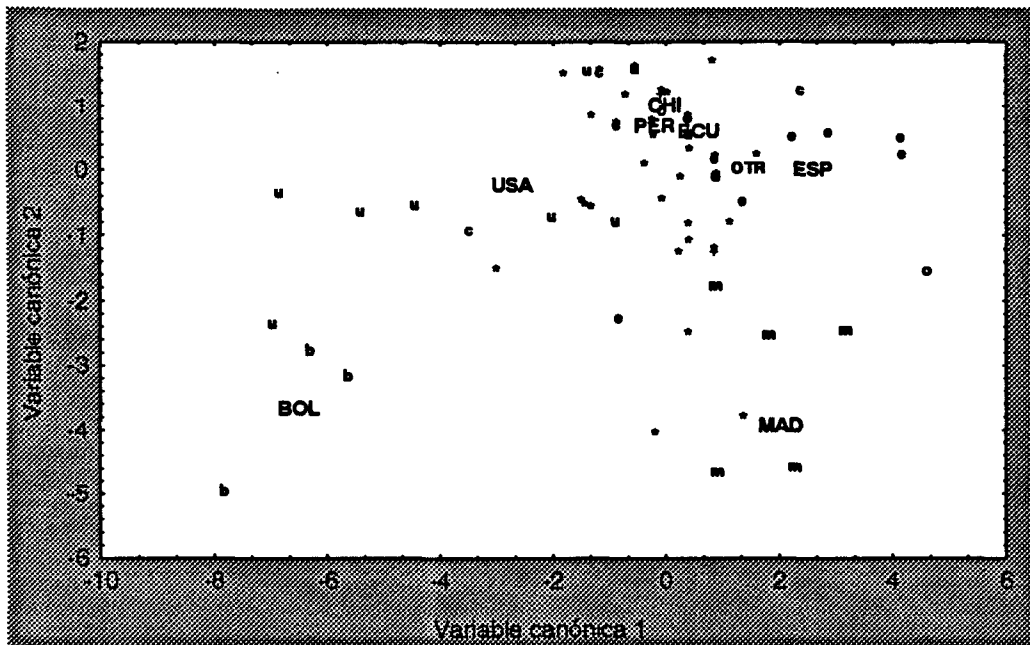


FIGURA 3.52

Análisis discriminante. Espacio definido por las dos primeras variables canónicas

La figura 3.52 presenta el espacio definido por las dos primeras variables canónicas. En esta gráfica los cultivares aparecen representados por letras y símbolos. A saber, e = cv. de España, u = cv. de USA, b = cv. de Bolivia, c = cv. de Chile, o = cv. de otros orígenes, m = cv. de Madeira, + = cv. de Ecuador y * = cv. de Perú. Además con códigos de las tres letras (iniciales de cada zona de origen) se representan puntos *medios* para cada país.

3.8 RELACIONES ENTRE ISOENZIMAS Y DATOS AGRONÓMICOS

En este apartado se estudian las relaciones entre las frecuencias alélicas de los isoenzimas y diversos datos pomológicos y cuantitativos obtenidos a lo largo de varios años en la parcela 29 de la E.E. "La Mayora" por Ramos Díaz (1987), González Yuste (1991), Bueno Sánchez (1992) y Martín Morales (1993) dirigidos por el Dr. J.M. Farré. Aunque estos autores también estudian cultivares de otras parcelas, los análisis realizados en este trabajo se han basado en la parcela 29, con lo que la variabilidad asociada a las diferentes parcelas se minimiza. También se ha tenido en cuenta en la elección que la parcela 29 presenta una amplia selección de cultivares en plena producción.

Se han estudiado 13 características pomológicas y 4 características foliares: peso del fruto (PESF), porcentaje de piel en el fruto (PPIEL), porcentaje de corazón (PCOR), porcentaje de pulpa (PPUL), porcentaje de semillas (PSEM), índice de semillas (IS), peso de una semilla (PESOSEM), caracter de la semilla (CS), resistencia al penetrómetro (RESISP), porcentaje de ataque por *Ceratitidis* (PCER), grados brix de la pulpa (BRIX), sabor (SAB) y tipo de epidemis (EPID) como caracteres pomológicos y longitud de la lámina de la hoja dividida por su anchura a $\frac{1}{2}$ de su longitud (HLA), anchura de la lámina de la hoja a $\frac{3}{4}$ de su longitud dividido por la anchura a $\frac{1}{4}$ de su longitud (HAL), espesor de la hoja en orientación sur (HES) y grosor de la capa de pelos en orientación sur (HGS) como características foliares. La tabla III.29 resume los valores medios para cada variable.

Con estos datos se ha realizado varios tipos de análisis. Un test de Mantel para conocer de manera global la relación existente entre los dos tipos de datos (genéticos y morfo-fisiológicos) y un estudio de regresión por pasos conocer si la variación en los datos pomológicos y foliares puede explicarse a partir de las frecuencias alélicas.

Relaciones globales. Estadístico de Mantel

Los datos pomológicos y foliares fueron estandarizados y a partir de ellos se obtuvo una matriz de distancias de χ^2 . Esta matriz se comparó con la de distancias de χ^2 para las frecuencias alélicas mediante varios test de asociación (el test de permutación de Mantel y la τ de Kendall).

El test de permutación arroja un valor de r , que mide la correlación entre ambas matrices, igual a 0.460 (equivalente al valor del estadístico normalizado

TABLA III.29

Datos pomológicos y foliares. Valores medios en la parcela 29

	Nº cv	Media	Mínimo	Máximo	Desv. std.
PESF (g)	42	213.24	134.50	511.20	67.25
PPIEL (%)	42	24.25	19.86	31.24	2.33
PCOR (%)	42	1.07	0.59	2.15	0.33
PPUL (%)	42	68.17	61.11	73.13	3.05
PSEM (%)	42	6.32	3.37	9.82	1.64
IS	42	12.50	6.09	20.57	3.30
PESOSEM (g)	42	0.52	0.33	0.70	0.09
CS	42	0.56	0.12	1.33	0.28
RESIP (kg)	42	0.59	0.39	1.11	0.15
PCER (%)	42	7.96	0.00	36.40	7.20
BRIX (° brix)	42	19.98	13.48	24.30	2..08
SAB	42	4.20	1.62	6.76	1.20
EPID	42	1.77	0.23	3.77	0.91
HLA	42	1.71	1.30	2.38	0.22
HAL	42	0.92	0.73	1.09	0.09
HES (mm)	41	0.16	0.11	0.23	0.03
HGS (mm)	41	0.31	0.20	0.40	0.04

de Mantel). El valor de t (estadístico de Mantel) es 3.954 y tras 2000 permutaciones muestra un valor de $p = 0.001$.

Por otro lado el test de Kendall proporciona unos valores parecidos ($\tau = 0.231$, $Z = 9.900$ y $p = 0.00000$). Estos tests implican que la correlación entre ambas matrices no se debe al azar y es estadísticamente muy significativa.

Se demuestra que ambas matrices están asociadas (correlacionadas) y muestra unos patrones de variación semejantes, aunque los valores absolutos en ambas matrices de distancias sean diferentes (figura 3.53). En esta figura se

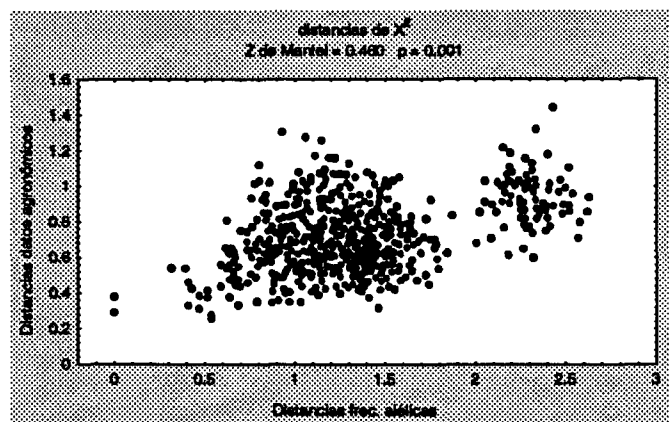


FIGURA 3.53

Análisis de asociación entre matrices de distancias de datos pomológicos-foliare y frec. alélicas

aprecian dos grupos de puntos que corresponden, aproximadamente, uno a las relaciones existentes entre chirimoyos-chirimoyos y atemoyos-atemoyos y el otro a las distancias chirimoyos-atemoyos.

Una vez que se ha determinado que ambos tipos de datos muestran una clara relación, se hace necesario individualizar las variables pomológicas y foliarias e intentar mostrar si su variación puede explicarse, en parte, por factores genéticos ligados a los isoenzimas.

Análisis de regresión

Se han realizado análisis de regresión múltiple manteniendo como variables dependientes las características pomológicas y foliarias y como independientes las frecuencias alélicas.

La clara diferenciación entre chirimoyas y atemoyas, puesta de manifiesto a lo largo de este capítulo, ha condicionado la realización de los análisis estadísticos. La presencia de los cultivares de atemoyas puede distorsionar los resultados en los tests de regresión y por ello se ha optado por no incluirlos al realizar estas pruebas.

Se ha efectuado una regresión múltiple manteniendo como variable dependiente cada uno de los parámetros pomológicos y como variables

independientes las frecuencias alélicas. Posteriormente se realizó una regresión sobre componentes principales para intentar soslayar el problema de la correlación entre algunas de las variables *independientes*. La regresión sobre componentes principales no varía la varianza explicada (R^2) y, desgraciadamente, no produce una reducción importante en el número de variables (en este caso serían los ejes ortogonales) de la recta de regresión. Finalmente se ha optado por considerar la recta de regresión obtenida mediante el análisis por pasos que, aunque puede no ser *correcta* en *sensu stricto*, es más intuitiva, de más fácil interpretación y operacionalmente más útil.

Por último se han utilizado los cultivares de la parcela *El Llano* para comprobar la validez predictiva de las rectas de regresión.

Peso del fruto (PESF)

Esta variable tiene un valor medio en la parcela 29 (excluyendo a las atemoyas) de 200 g, oscilando entre 135 y 300 g. como valores medios extremos. Los cultivares presentan una gran variabilidad (Martín Morales, 1993).

Cuando se realiza la regresión lineal por pasos se extraen 12 alelos que conjuntamente explican el 65% de la variación presente. La tabla III.30 presenta un sumario del proceso de obtención de la recta de regresión. Dicha recta toma los valores siguientes:

$$\text{PESF} = 31.62 \text{ PGI14} - 218.47 \text{ IDH24} + 73.46 \text{ TPI32} - 137.43 \text{ IDH22} + 77.82 \text{ MDH11} + 112.15 \text{ GOT13} + 116.32 \text{ GOT14} + 77.34 \text{ GOT12} - 36.80 \text{ PGM21} - 40.57 \text{ SOD52} - 28.68 \text{ TPI11} - 24.87 \text{ ME11} + 242.68^1$$

Como se puede advertir, 12 alelos de 8 genes isoenzimáticos aparecen en la recta de regresión. Sin embargo, no todos contribuyen por igual a explicar la varianza. La columna R^2 de la tabla III.30 muestra en tanto por uno la varianza explicada por cada alelo. Así, Tpi-3:2 explica un 10.8%, Pgi-1:4 el 8.9%, Got-1:3 un 8.6%, etc.

La figura 3.54 presenta los valores observados y los valores esperados para el peso de fruto. El valor medio de los residuos (diferencias entre observados y esperados) expresado como tanto por ciento del valor esperado es 9.56%.

¹ En este función el alelo Pgi-1:4 aparece como PGI14, Idh-2:4 como IDH24, etc.

TABLA III.30

Regresión múltiple por pasos para el peso del fruto. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R ² = 0.654	1 Pgi-1:4	31.615	12.573	0.089	3.625	0.068
R ² ajust = 0.494	2 Idh-2:4	-218.465	51.107	0.049	2.057	0.163
F _(12,20) = 4.090	3 Tpi-3:2	73.456	20.950	0.108	5.025	0.034
p < 0.001	4 Idh-2:2	-137.430	46.910	0.082	4.181	0.051
	5 Mdh-1:1	77.823	23.020	0.071	3.898	0.059
	6 Got-1:3	112.153	31.089	0.086	5.389	0.028
	7 Got-1:4	116.322	33.746	0.065	4.521	0.043
	8 Got-1:2	77.342	38.725	0.018	1.268	0.270
	9 Pgm-2:1	-36.804	25.874	0.021	1.521	0.229
	10 Sod-5:2	-40.568	25.982	0.026	1.881	0.182
	11 Tpi-1:1	-28.678	20.796	0.016	1.182	0.287
	12 Me-1:1	-24.865	20.047	0.020	1.539	0.226
	Interc.	242.683	65.165			

Esto es, la predicción se aleja de la realidad en un 10% como media.

Para comprobar el valor predictivo de la recta de regresión se procedió a calcular los valores teóricos de la variable peso de fruto en 90 cv. de la parcela *El LLano* y compararlos con los observados. La mayoría de los errores son positivos, esto es mayores pesos de fruto observados que los esperados, y el error medio alcanza el 22%.

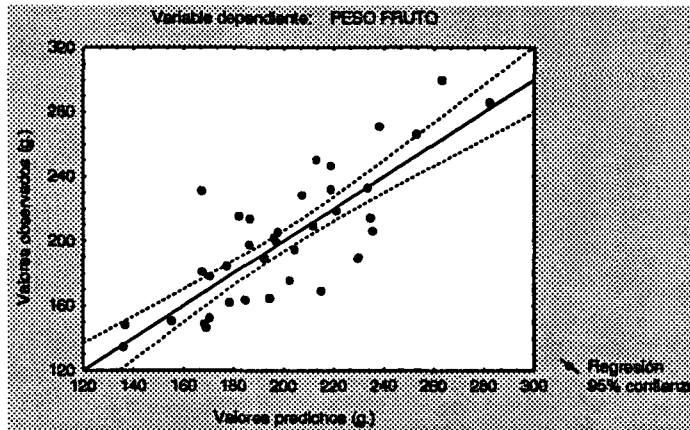


FIGURA 3.54
Peso del Fruto. Valores observados frente a esperados

Porcentaje de piel en el fruto (PPIEL)

El porcentaje de piel del fruto con respecto al peso de este muestra un rango de variación relativamente pequeño según los datos de Ramos Díaz (1987), González Yuste (1991), Bueno Sánchez (1992) y Martín Morales (1993)), siendo el mínimo de las medias igual a 19.86% y el valor medio máximo de 28.80% y la media de todos los cultivares de chirimoyo de la parcela 29 se sitúa en el 24%.

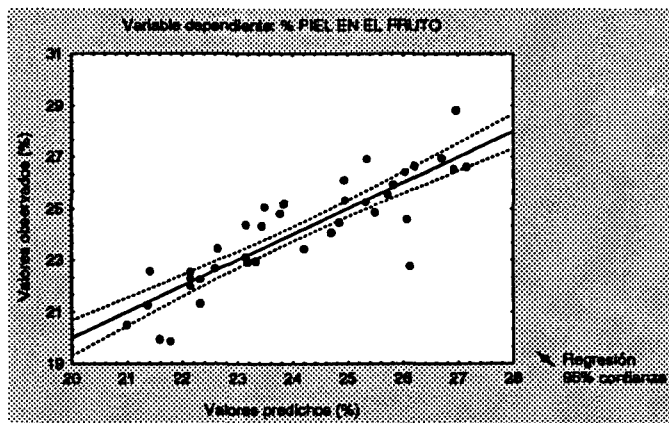


FIGURA 3.55
Porcentaje de piel en el fruto. Valores esperados frente a observados

TABLA III.31

Regresión múltiple para el porcentaje de piel en el fruto. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R ² = 0.755	1 Idh-2:4	8.002	2.441	0.262	13.123	0.001
R ² ajust = 0.612	2 Pgi-1:6	2.455	1.190	0.118	6.878	0.015
F _(14,24) = 5.281	3 Me-1:1	3.754	1.001	0.058	3.592	0.070
p < 0.000	4 Adh-1:2	1.933	0.800	0.063	4.260	0.050
	5 Sod-5:2	-3.354	1.475	0.078	6.068	0.021
	6 Got-1:4	-2.591	1.077	0.034	2.827	0.106
	7 Mdh-1:2	-1.109	2.264	0.019	1.567	0.223
	8 Mdh-1:1	-0.334	1.861	0.019	1.611	0.217
	9 Pgi-1:2	4.843	2.060	0.016	1.379	0.252
	10 Idh-2:2	6.526	2.649	0.019	1.701	0.205
	11 Ppi-1:4	1.383	0.997	0.015	1.334	0.260
	12 Pgm-2:1	1.731	1.226	0.019	1.753	0.198
	13 Tpi-2:2	1.749	1.056	0.017	1.599	0.218
	14 Tpi-1:1	1.457	1.058	0.019	1.897	0.181
	Interc.	12.184	4.760			

El análisis de regresión consigue explicar el 75% de la variación existente, pero a costa de recurrir a 14 variables (alelos) que implican a 10 genes diferentes. La tabla III.31 presenta un resumen de los resultados del análisis de regresión. En ella se puede apreciar que dos alelos, Idh-2:4 y Pgi-1:6, explican conjuntamente el 37% de la varianza (R²), o sea, más de la mitad de la varianza explicada por la recta de regresión.

Quando se calculan las diferencias entre los datos observados y los esperados al realizar la regresión, se obtienen unas diferencias (residuos) que, expresadas en porcentaje de los valores esperados, presentan una media del 3%

Al igual que con el peso del fruto, se ha calculado el error medio de la estima de PPIEL en 90 cultivares de la parcela *El Llanó*². Este parámetro alcanza, tan solo, el valor del 10%.

Porcentaje de corazón en el fruto (PCOR)

El valor medio de este parámetro en los cultivares de la parcela 29 se situa en el 1% con el intervalo 0.59-2.15%.

Los valores de esta variable en esta parcela no se distribuyen siguiendo una curva gaussiana y, por tanto, ha sido necesario realizar una transformación para normalizarla y así poder efectuar el análisis de regresión. La transformación que se ha utilizado ha sido la función logaritmo neperiano.

La recta de regresión obtenida implica a 5 alelos pertenecientes a otros tantos genes (tabla III.32) y consigue explicar el 37% de la varianza. Un único alelo (Skd-1:2) representa el 15% de la variación.

La figura 3.56 muestra los datos observados frente a los esperados. La media de las desviaciones entre ambos tipos de valores se situa en la parcela 29 en el 18%, lo que supone un valor considerable. Cuando se utiliza la parcela

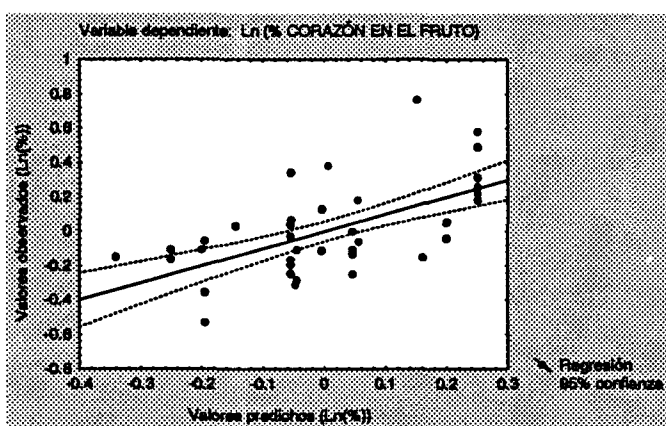


FIGURA 3.56

Ln del porcentaje de corazón en el fruto. Valores esperados frente a observados

² Puesto que en la recta de regresión aparece el alelo Adh-1:2 y teniendo en cuenta que los cultivares de esta parcela no han sido genotipados para este gen, se le ha asignado a esta variable, de forma arbitraria, el valor 0.5.

TABLA III.32

Regresión múltiple para el Ln. del % de corazón en el fruto. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R ² = 0.369	1 Skd-1:2	-0.203	0.099	0.153	6.684	0.014
R ² ajust = 0.273	2 Pgm-1:1	0.141	0.118	0.060	2.756	0.106
F(5,33) = 3.859	3 Mdh-1:2	-0.196	0.094	0.043	2.027	0.164
p < 0.007	4 Sod-5:2	-0.206	0.095	0.091	4.745	0.037
	5 Pgl-1:4	0.051	0.048	0.022	1.128	0.296
	Interc.	0.484	0.409			

El Llano para comprobar las posibilidades predictivas de la recta de regresión, se obtiene un elevado valor de error que se sitúa en torno al 26%. Bueno Sánchez (1992) comenta que el rango de este parámetro es en general pequeño y que en general no es un factor importante en la discriminación de cultivares.

Porcentaje de pulpa en el fruto (PPUL)

Las medias del porcentaje de pulpa del fruto oscila entre el 61% de Chilena y el 73% del cv. Bonita, con una media entorno al 68% (tabla III.29).

La varianza explicada por la recta de regresión es del 70%, un valor considerablemente elevado, que se consigue por la inclusión de 13 variables (alelos) en la recta. Estos alelos (tabla III.33) pertenecen a 9 genes diferentes, y uno de ellos (Idh-2:4) explica por si solo el 33% de la varianza presente.

La figura 3.57 presenta la recta de regresión y los valores observados enfrentados a los esperados. Como se puede apreciar en la figura, no aparecen grandes desviaciones entre ambos tipos de valores siendo el ajuste bastante bueno. De hecho, la media de los errores (valor observado - valor esperado) es de tan solo el 1.87% con respecto al valor esperado.

Para comprobar el carácter predictivo de la recta de regresión se ha realizado, como para los demás casos, el cálculo de los valores previstos para los cultivares de la parcela *El Llano*, para así compararlos con los valores

TABLA III.33

Regresión múltiple para el porcentaje de piel en el fruto. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R² = 0.702 R²ajust = 0.546 F_(13,25) = 4.522 p < 0.001	1 Idh-2:4	-10.807	3.850	0.326	17.931	0.000
	2 Sod-5:2	3.195	1.923	0.063	3.716	0.065
	3 Idh-2:2	-7.817	3.684	0.028	1.693	0.205
	4 Pgl-1:6	-2.923	1.198	0.031	1.900	0.180
	5 Me-1:1	-1.982	1.338	0.050	3.255	0.083
	6 Adh-1:2	-2.930	1.367	0.025	1.682	0.206
	7 Got-1:3	-5.203	1.695	0.024	1.662	0.209
	8 Pgl-1:5	3.765	1.803	0.030	2.099	0.160
	9 Pgl-1:2	-5.624	2.498	0.044	3.405	0.077
	10 Got-1:2	-4.240	2.133	0.027	2.160	0.154
	11 Pgm-1_1	-3.512	2.749	0.022	1.811	0.191
	12 Mdh-1:2	2.762	1.901	0.015	1.232	0.278
	13 Skd-1:2	2.977	2.558	0.016	1.355	0.255
	Interc.	81.531	5.401			

observados. La media de los errores se sitúa en el 5.24%, un valor claramente bajo. A pesar de que los árboles jóvenes, como los de la parcela *El Llano*, producen frutos ligeramente más grandes y con menor número de semillas, lo que implica mayor porcentaje en peso de la pulpa y el error consiguiente al haber obtenido la recta a partir de árboles no tan jóvenes.



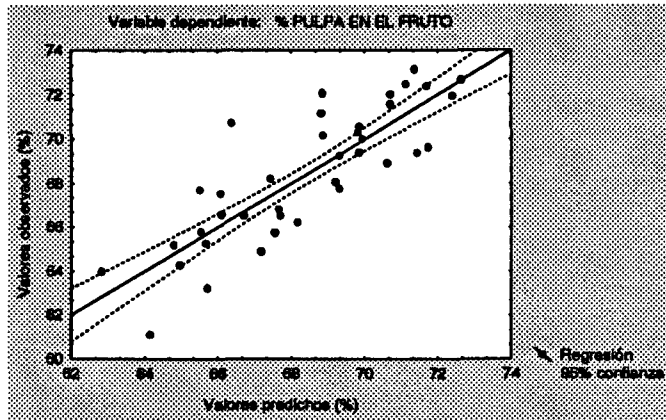


FIGURA 3.57
Porcentaje de pulpa en el fruto. Valores esperados frente a observados

Porcentaje de semillas en el fruto (PSEM)

El porcentaje de semillas (en peso) en el fruto muestra entre los cultivares de la parcela 29 un valor medio de aproximadamente el 6 por ciento y presenta un intervalo de variación que extiende desde el 3.4 al 9.8%

Al realizar la regresión se obtiene una recta que reúne 11 alelos de 8 genes diferentes y que explica el 58.8% de la varianza presente (tabla III.34). El alelo que más varianza explica es Idh-2:4

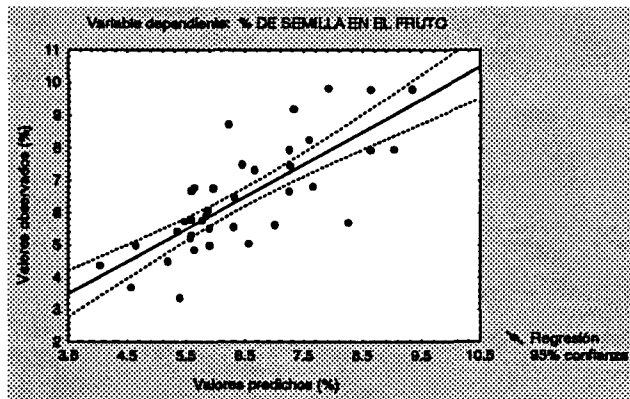


FIGURA 3.58
Porcentaje de semillas en el fruto. Valores esperados frente a observados

Aunque casi un 60% de varianza explicada es un valor considerable, la recta de regresión no proporciona unas estimas adecuadas (con un error pequeño) del porcentaje de semilla en un fruto. Así la media de este error en la parcela 29 es del 12.42% que sube hasta, a todas luces exagerado, 60.66% en la parcela *El Llano*.

TABLA III.34

Regresión múltiple para el porcentaje de semilla en el fruto. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R ² = 0.588	1 Idh-2:4	1.083	0.974	0.151	6.565	0.016
R ² ajust = 0.420	2 Pgm-1:1	3.289	1.682	0.048	2.141	0.155
F _(11,27) = 3.504	3 Got-1:3	2.955	1.356	0.029	1.336	0.258
p < 0.004	4 Sod-5:2	4.586	1.305	0.038	1.765	0.195
	5 Tpi-2:2	2.849	0.834	0.059	2.885	0.101
	6 Pgi-1:5	-2.685	1.088	0.068	3.590	0.069
	7 Pgm-2:1	-1.889	1.163	0.057	3.226	0.084
	8 Pgi-1:6	-3.441	0.847	0.074	4.652	0.040
	9 Mdh-1:2	2.351	1.159	0.025	1.613	0.215
	10 Got-1:2	-1.786	1.616	0.021	1.389	0.249
	11 Got-1:4	2.580	1.491	0.018	1.154	0.292
	Interc.	1.083	2.364			

Indice de semilla (IS)

El índice de semillas se mide el número de semillas por cada 100 g de peso del fruto. Este carácter se ve influenciado por la edad del árbol (Bueno Sánchez, 1992).

No se ha podido obtener una recta de regresión mediante el

procedimiento por pasos, puesto que ninguna variable (alelo) ha cumplido los *requisitos mínimos* (véase el capítulo dedicado a material y métodos) y ha podido *entrar* en dicha recta. Por tanto cabe concluir que la variación encontrada no puede explicarse con los datos isoenzimáticos presentados en este trabajo.

Peso de una semilla (PESOSEM)

La media del peso medio de las semillas para todos los cultivares de la parcela 29 es 0.51 g (con un amplio intervalo de valores que va desde 0.33 a 0.67 g).

La regresión por pasos consigue explicar el 68% de la varianza tras adicionar a la recta 8 variables (alelos) que pertenecen a 6 genes diferentes (tabla III.35). Siendo el alelo Pgm-2:1 el que más contribuye a acrecentar el valor de R^2 , con casi el 24%

La figura 3.59 enfrenta los valores esperados con los observados. No se aprecia una gran dispersión de la nube de puntos. De hecho, el error medio de la estima del valor en la parcela 29 es del 7.4%.

Sin embargo, *El LLano* muestra el bajo valor predictivo de la recta de regresión, puesto que la media de los errores se sitúa, cuando se consideran los cultivares de esta parcela, en el 32%.

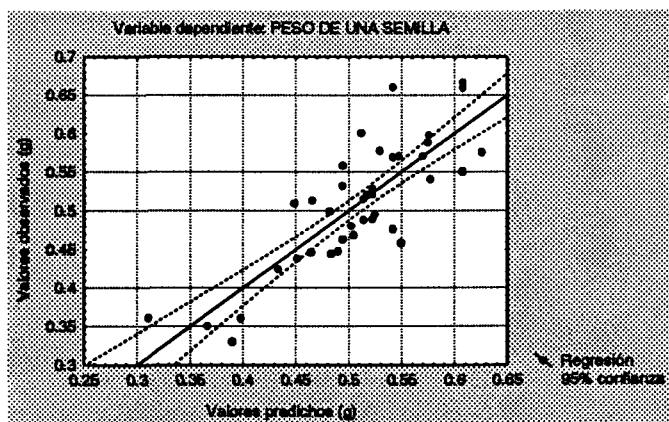


FIGURA 3.59
Peso de una semilla. Valores esperados frente a observados

TABLA III.35

Regresión múltiple para el peso individual de las semillas. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R ² = 0.681	1 Pgm-1:1	0.108	0.066	0.236	11.439	0.002
R ² ajust = 0.596	2 Got-1:3	0.130	0.035	0.167	10.035	0.004
F _(8,30) = 8.011	3 Pgl-1:4	0.066	0.024	0.118	8.593	0.006
p < 0.000	4 Got-2:1	-0.050	0.041	0.063	5.111	0.031
	5 Got-1:2	0.081	0.051	0.047	4.161	0.050
	6 Tpl-3:2	0.061	0.033	0.014	1.284	0.266
	7 Pgl-1:2	0.096	0.061	0.021	1.921	0.176
	11 Tpl-2:2	-0.035	0.028	0.016	1.535	0.225
	Interc.	0.278	0.064			

Caracter de la semilla (CS)

Este parámetro se ha medido de forma arbitraria en una escala que va desde el 0 (semilla encamisada) a 2 (semilla suelta). La media para los cultivares de chirimoyo de la parcela 29 se sitúa en 0.6 (encamisada-semienencamisada) y el intervalo de valores de 0.12 a 1.33.

El análisis de regresión por pasos muestra que 11 alelos (8 genes) pueden explicar hasta el 51% de la varianza (tabla III.36). No hay ningún alelo que, individualmente, explique más del 10% de la varianza. Siendo Pgm-2:1 la variable que más varianza asume, con el 8%.

Aunque la varianza explicada es importante, hay que ser considerablemente exceptivo al analizar la fiabilidad predictiva de la recta de regresión. Esto es así puesto que la media de los residuos ponderados con

TABLA III.36

Regresión múltiple para el carácter de la semilla. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R² = 0.513 R²ajust = 0.314 F(11,27) = 2.585 p < 0.022	1 Pgm-2:1	0.740	0.195	0.081	3.280	0.081
	2 Adh-1:2	0.198	0.148	0.064	2.680	0.113
	3 Got-1:3	-0.460	0.152	0.052	2.289	0.142
	4 Mdh-1:2	1.186	0.500	0.044	1.991	0.170
	5 Pgl-1:5	0.378	0.235	0.44	2.053	0.163
	6 Pgl-1:2	-0.506	0.248	0.065	3.230	0.083
	7 Tpl-2:2	0.195	0.130	0.051	2.678	0.113
	8 Pgl-1:6	-0.302	0.143	0.021	1.098	0.304
	9 Pgm-1:1	-0.354	0.289	0.042	2.254	0.145
	10 Mdh-1:1	0.682	0.423	0.023	1.235	0.276
	11 Got-2:1	0.321	0.276	0.024	1.355	0.255
	Interc.	-0.372	0.622			

respecto al valor predicho presenta un valor de casi el 32% en la parcela 29. Obviamente, en la parcela el Llano este valor debe elevarse y de hecho así sucede creciendo hasta el 145%

Resistencia al penetrómetro (RESISP)

Este parámetro mide la fuerza en Kg. que es necesario aplicar para atravesar la piel del fruto y está claramente correlacionado con la resistencia de la epidermis al transporte (Bueno Sánchez, 1992). Los valores se han obtenido a partir de 5 medidas por fruto y realizando al final la media para cada cultivar (Bueno Sanchez, 1992).

La media de todos los cultivares se sitúa en 0.57 Kg. El rango de valores (0.39 - 0.96) de estas medias es menor que el encontrado en años particulares, con lo que la variación resultante se reduce al realizar medias plurianuales.

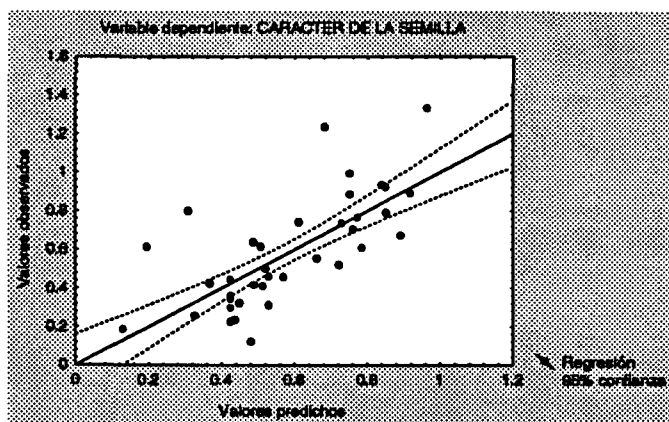


FIGURA 3.60
Carácter de la semilla. Valores esperados frente a observados

Los valores de esta variable no se ajustan a una curva normal, por lo que ha sido necesario normalizarla mediante la aplicación de la función logaritmo neperiano.

Aunque el análisis de regresión por pasos resulta significativo ($p < 0.044$) la varianza explicada es escasa ($R^2 = 0.281$). Cinco genes están implicados en la recta de regresión, siendo Got-2:1 el alelo que consigue explicar la mayor parte de esta varianza (9%) (tabla III.37).

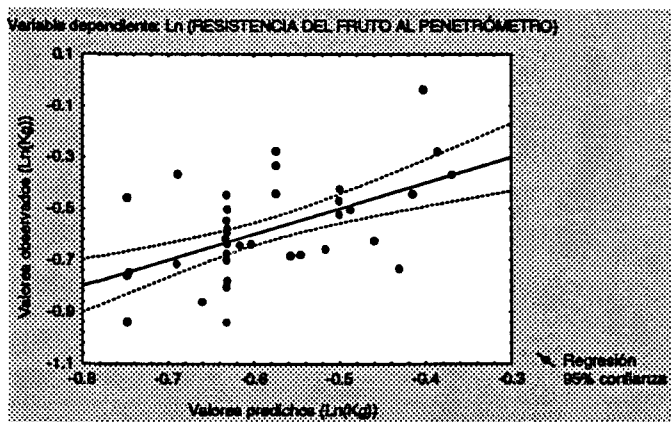


FIGURA 3.61
Resistencia al penetrómetro. Valores esperados frente a observados

TABLA III.37

Regresión múltiple para la resistencia de la piel al penetrómetro. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R ² = 0.281	1 Got-2:1	0.263	0.136	0.092	3.743	0.062
R ² ajust = 0.172	2 Sod-5:2	-0.402	0.124	0.062	2.658	0.113
F _(5,33) = 2.583	3 Mdh-1:2	-0.231	0.147	0.052	2.285	0.140
p < 0.044	4 Got-1:4	0.229	0.144	0.038	1.708	0.200
	5 Tpi-2:2	0.114	0.125	0.037	1.707	0.200
	Interc.	-0.343	0.087			

De igual manera que para los anteriores parámetros se ha realizado el cálculo del error que se comete al considerar los valores esperados. En la parcela 29 el error se sitúa en el 12% y en *El Llano* se eleva hasta casi el 24%

Porcentaje de frutos atacados por *Ceratitis* (PCER)

El problema parasitario principal que presenta el cultivo en la zona de producción en España es la mosca de la fruta o mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata*) que produce graves daños en los frutos (el desarrollo de la larva dentro del fruto conlleva la aceleración del proceso de maduración y una depreciación del mismo) sobre todo en los más tempranos (González Yuste, 1991).

La distribución de esta variable no se ajusta a una curva gaussiana y por eso ha sido necesario normalizar aplicando la función $x' = \ln(x+1)$. (El adicionar una unidad consigue que se puedan considerar los cultivares con media igual a 0).

El análisis de por pasos proporciona una recta de regresión que no es estadísticamente significativa ($p < 0.094$).

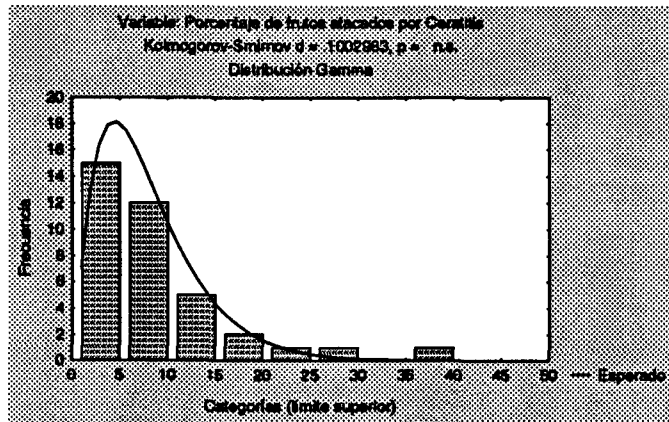


FIGURA 3.62
Distribución seguida por la variable PCER y curva teórica de una distribución Gamma

Esto parece indicar que no hay una relación evidente entre los marcadores isoenzimáticos (y los loci ligados a estos) y el porcentaje de frutos atacados por la mosca del mediterráneo. Además el ataque varía mucho con la parcela (Bueno Sánchez, 1994).

La figura 3.62 muestra que la distribución del porcentaje de frutos atacados por *Ceratitidis* se ajusta muy estrechamente a una distribución gamma. Este tipo de distribuciones son típicas del parasitismo y por ejemplo se ha encontrado en diversos estudios de la distribución espacial de larvas de *Pyrausta nubilalis* y de *Bryobia rubrioculus* en árboles frutales (Margalef, 1986).

Grados brix de la pulpa (BRIX)

Los grados brix equivalen a la concentración de azúcares solubles medidos como porcentaje de sacarosa (Martín Morales, 1993).

El valor medio de este parámetro entre todos los cultivares de la parcela 29 es 20.2 y con un rango de valores que va desde 13.5 a 24.3. Valores por debajo de 19 no son aceptables en el mercado español (Bueno Sanchez, 1992).

La distribución de estos valores tampoco sigue una normal, por lo que para realizar el análisis de regresión se han elevado al cuadrado dichos valores.

Los resultados del análisis indican que el 41.3% de la varianza es explicada por una recta de regresión que implica a 9 alelos (de un total de 8 genes)

TABLA III.38

Regresión múltiple para los grados brix de la pulpa. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R ² = 0.413	1 Mdh-1:2	-66.675	26.247	0.082	3.283	0.080
R ² ajust = 0.231	2 Idh-2:4	332.511	61.038	0.077	3.278	0.081
F(9,29) = 2.265	3 Tpl-3:2	-76.069	24.103	0.047	2.078	0.160
p < 0.046	4 Adh-1:2	42.763	40.811	0.064	2.959	0.096
	5 Pgm-1:1	-178.050	40.201	0.024	1.100	0.303
	6 Idh-2:2	187.572	55.384	0.033	1.576	0.219
	7 Me-1:1	57.780	20.696	0.031	1.488	0.232
	8 Pgl-1:5	61.696	26.070	0.032	1.591	0.217
	9 Tpl-1:1	43.154	19.919	0.024	1.174	0.287
	Interc.	303.764	114.318			

(Tabla III.38).

La figura 3.63 presenta los valores observados en la parcela 29 frente a los predichos por la recta de regresión. La media del error de estimación se sitúa en el 5.2% . Cuando calculamos los valores teóricos esperados para los cultivares de la parcela el Llano encontramos un 11.2% de error. El error en esta última parcela duplica al de la parcela 29, a pesar de que los valores de brix en las dos parcelas son equivalentes (Martín Morales, 1993).

Sabor (SAB)

Esta cualidad organoléptica está medida de forma subjetiva y se ha cuantificado asignando a cada fruto un número del 0 al 9, de tal forma que 0 significa frutos con ningún o muy mal sabor y 9 frutos de sabor excelente. Lógicamente las medias restringen el rango, obteniéndose un abanico de valores que va desde 2.18 a 6.76 y situando el valor medio para todos los

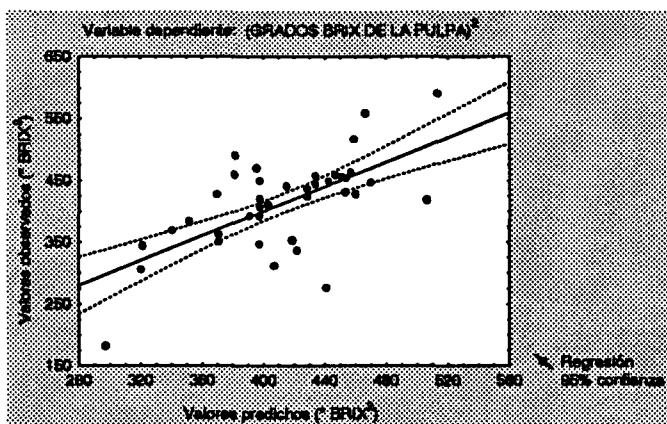


FIGURA 3.63
Grados Brix de la pulpa. Valores observados frente a esperados.

chirimoyos de la parcela 29 en 4.31.

La regresión por pasos obtiene una recta de regresión que incluye 9 alelos

TABLA III.39

Regresión múltiple para la variable sabor. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R ² = 0.506	1 Tpi-1:1	1.610	0.583	0.161	7.104	0.012
R ² ajust = 0.352	2 Sod-5:2	0.263	0.793	0.917	4.419	0.044
F _(9,29) = 3.297	3 Skd-1:2	-2.383	0.899	0.032	1.581	0.219
p < 0.007	4 Pgm-1:1	-3.107	1.090	0.050	2.571	0.120
	5 Pgi-1:5	1.402	0.734	0.067	3.720	0.064
	6 Idh-2:4	2.802	1.595	0.032	1.833	0.186
	7 Idh-2:2	1.451	1.436	0.023	1.341	0.256
	8 Tpi-3:2	-0.965	0.626	0.025	1.430	0.241
	9 Adh-1:2	0.741	0.643	0.023	1.328	0.259
	Interc.	5.880	2.159			

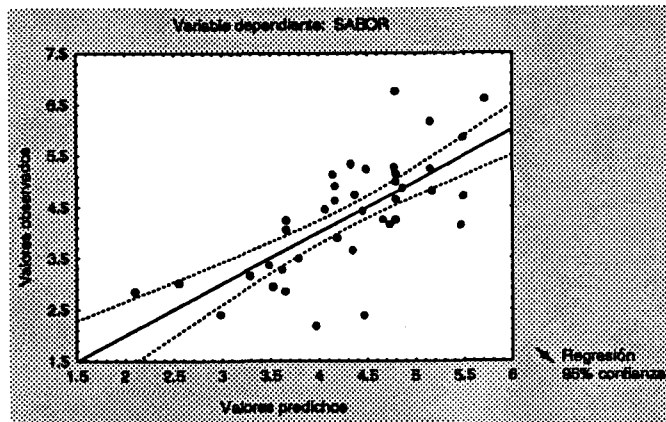


FIGURA 3.64

Sabor. Valores observados frente a esperados.

de 8 genes diferentes. La varianza explicada es del 51% (tabla III.39), habiendo un alelo (Tpi-1:1) que muestra, individualmente, una R^2 de 0.16.

La dispersión de los puntos que se observa en la figura 3.64 indica la alta discordancia entre los valores observados y esperados en la parcela 29. De hecho, el error de la estima del sabor en esta misma parcela es del 14.8%. Claramente será difícil confiar en la capacidad predictiva de la recta de regresión, y de hecho, cuando se calcula el porcentaje de error en la estimas de este parámetro en *El Llano* se obtiene un valor considerablemente alto: el 34.83%.

Epidemis (EPID)

La epidermis de la chirimoya se clasifica en cinco tipos (véase Introducción), a saber: lisa, impresa, umbonata, mamillata y tuberculata, a las cuales se le ha asignado arbitrariamente un valor numérico (0, 1, 2, 3 y 4 respectivamente) intentando reflejar un gradiente de textura en la piel del fruto.

La media es de 1.6 (impresa-umbonata) y el intervalo de valores va desde 0.2 (lisa) a 3.5 (tuberculata).

La regresión por pasos obtiene una recta de regresión que explica el 35% de la varianza utilizando 5 alelos de 4 genes. Tpi-1:1 muestra una R^2 del 14%. (tabla III.40)

TABLA III.40

Regresión múltiple para la variable epidermis. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R ² = 0.346	1 Tpi-1:1	-1.443	0.439	0.145	6.288	0.017
R ² ajust = 0.247	2 Mdh-1:2	1.363	0.555	0.045	2.018	0.165
F _(6,33) = 3.489	3 Pgi-1:6	-0.873	0.362	0.072	3.400	0.074
p < 0.012	4 Pgm-1:1	-1.454	0.771	0.063	3.182	0.084
	5 Pgi-1:2	0.684	0.674	0.020	1.029	0.318
	Interc.	4.296	0.830			

La figura 3.65 muestra los valores observados frente a los esperados. Se puede observar que determinados valores teóricos (1.4) presentan un amplio abanico de valores empíricos. Esta variación se cuantifica mediante el cálculo del error entre la predicción y el valor real. En la parcela 29 este error es del 33.6% y en la parcela el Llano del 61.7%, lo que implica la ineficacia de emplear la recta de regresión como un instrumento predictivo.

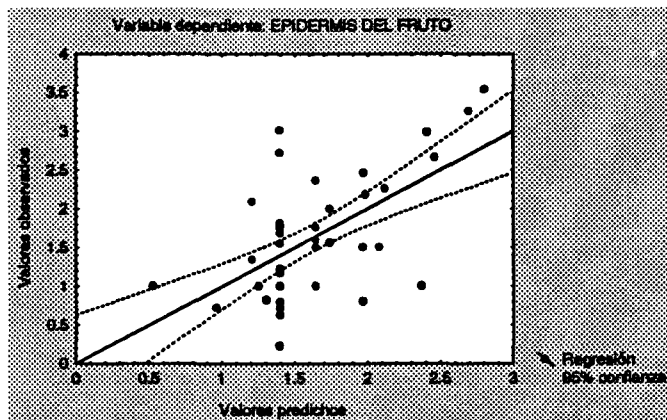


FIGURA 3.65
Epidermis. Valores observados frente a esperados.

Relación longitud:anchura en la hoja (HLA)

La longitud de la lámina dividida por su anchura a $\frac{1}{2}$ de su longitud (HLA) se cree que es constante para cada cultivar, al contrario que el tamaño de la hoja que puede variar ampliamente dependiendo del vigor del árbol (Bueno Sánchez, 1992). Valores altos de este parámetro significan hojas de forma lanceolada y valores bajos indican hojas orbiculares.

La media de este parámetro en la parcela 29 es 1.68 y ofrece un rango que se extiende desde 1.30 a 2.04.

EL análisis de regresión consigue explicar el 48.8% de la varianza a partir de 9 alelos de 7 genes (tabla III.41). Entre estos genes, se encuentra Skd-1 que consigue explicar por si solo casi el 18% de la varianza.

Siguiendo con el esquema empleado, se ha estudiado el grado de desviación de los valores observados y esperados. En la parcela 29, el porcentaje de error se sitúa en el 6.3% y en *El Llano* se eleva ligeramente hasta el 8.1%, valores que producen confianza en el carácter predictivo de la regresión.

Relación anchura de la hoja a $\frac{3}{4}$ de su longitud:anchura a $\frac{1}{4}$ de su longitud (HAL)

La anchura de la lámina de la hoja a $\frac{3}{4}$ de su longitud dividida por la anchura a $\frac{1}{4}$ de su longitud es un parámetro que como el anterior mide la forma de la hoja, estableciendo tres categorías: lanceolada, elíptica y obovada

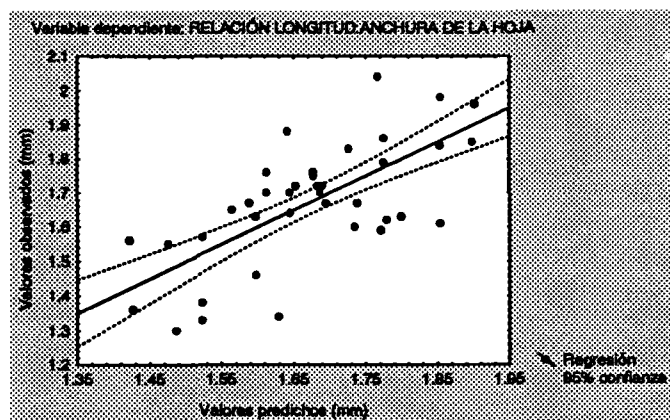


FIGURA 3.66

HLA. Valores observados frente a esperados.

TABLA III.41

Regresión múltiple para la variable HLA. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R² = 0.488 R²ajust = 0.330 F(9,29) = 3.075 p < 0.010	1 Skd-1:2	-0.082	0.160	0.176	7.891	0.009
	2 Idh-2:2	0.284	0.253	0.068	3.244	0.082
	3 Idh-2:4	0.285	0.249	0.039	1.904	0.178
	4 Adh-1:2	-0.179	0.092	0.055	2.830	0.103
	5 Got-1:4	0.341	0.131	0.038	1.999	0.168
	6 Pgl-1:2	-0.251	0.170	0.026	1.409	0.245
	7 Pgm-2:1	-0.253	0.126	0.047	2.658	0.114
	8 Sod-5:2	-0.130	0.118	0.021	1.201	0.282
	9 Got-1:3	0.096	0.096	0.018	1.006	0.324
	Interc.	1.787	0.312			

(Bueno Sánchez, 1992).

La tabla III.29 nos ofrece las medias de este parámetro en la parcela 29. La media se sitúa en 0.91 (hojas ligeramente lanceoladas) y con un rango de valores medios que va desde 0.73 a 1.09.

HAL no sigue en esta parcela una distribución normal por lo que se ha ajustado a la curva gaussiana mediante la función logaritmo neperiano.

EL análisis de regresión por pasos encuentra una recta que explica el 26.6% de la varianza pero que, desafortunadamente, no es estadísticamente significativa ($p < 0.106$).

Espesor de la lámina folial en hojas orientadas al sur (HES)

La media de los valores medios de esta variable en los cultivares de chirimoyo en la parcela 29 se sitúa en 0.159 mm, con un intervalo que arranca en 0.11 mm y acaba en 0.23 mm.

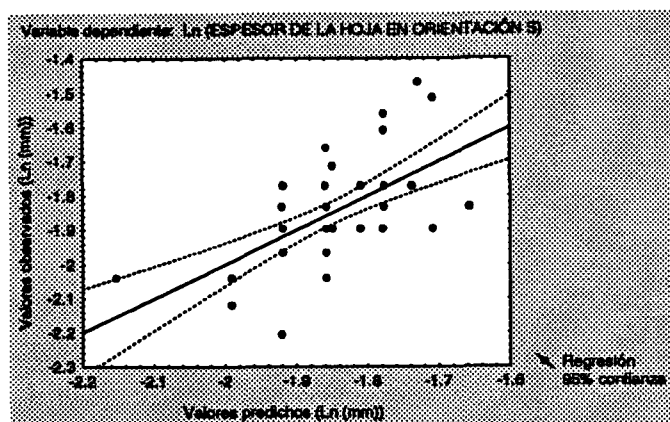


FIGURA 3.67

Espesor de la hoja en orientaciones sur. Valores observados frente a esperados.

Para realizar el estudio de regresión ha sido necesario normalizar la distribución de valores mediante la común función logaritmo neperiano.

El análisis de regresión encuentra que 5 alelos (tabla III.42) pueden explicar el 37.2% de la varianza que presenta HES.

La desviación de los valores observados frente a los esperados en porcentaje respecto a los valores esperados (que se ha venido definiendo como el error de la estimación) para la parcela 29 alcanza el 9.9% y para la parcela *El Llano* (en tan solo 22 cultivares) llega hasta el 21.4.

Parece ser que en árboles jóvenes este parámetro suele presentar valores menores que en árboles de más edad (Bueno Sánchez, 1992) lo que resta valor predictivo (a una función que no tiene en cuenta este hecho) y hace comprensible el alto valor del error de la estima de este parámetro en la parcela *El Llano* (con árboles más jóvenes) a partir de los datos obtenidos en la parcela 29.

Grosor de la capa de pelos de las hojas orientadas al sur (GES)

El grosor de la capa de pelos del envés y en general las pilosidades parecen estar relacionadas con adaptaciones a ambientes xerófiticos.

Este parámetro presenta en los cultivares de la parcela 29 una media de 0.31 mm, con un rango que comienza en 0.21 mm y acaba en 0.40 mm.

TABLA III.42

Regresión múltiple para el espesor de la hojas orientadas al sur. Cuadro resumen

	VAR.	b	Err. St. de b	R ²	F	p
R² = 0.373 R²ajust = 0.275 F_(5,32) = 3.804 p < 0.008	1 Pgl-1:5	-0.141	0.117	0.113	4.584	0.040
	2 Pgl-1:2	0.424	0.146	0.082	3.576	0.067
	3 Pgm-1:1	-0.383	0.150	0.045	2.024	0.164
	4 Pgl-1:4	0.143	0.064	0.062	2.940	0.096
	5 Pgm-2:1	0.162	0.086	0.070	3.587	0.067
	Interc.	-1.699	0.130			

El análisis de regresión produce una recta que no es significativa (p = 0.135).

Heterocigosidad

La heterocigosidad observada no ha presentado correlaciones significativas con ninguna de las variables agronómicas estudiadas.

3.9 LOS CULTIVARES DE ECUADOR Y PERÚ

Los cultivares de Ecuador y Perú representan un eslabón intermedio en el proceso de domesticación de la especie, puesto que en muchas zonas de estos países aparecen como silvestres. De ahí la importancia de su estudio.

Durante las expediciones realizadas a Ecuador y Perú por Farre & Hermoso (1985; 1987) se recolectaron la mayor parte de los cultivares que actualmente forman el banco de germoplasma. Este muestreo se realizó en dos provincias de Ecuador (Loja y Pichincha) y cinco de Perú (Piura, Cajamarca, Ancash, Huánuco, Lima) (mapa en la figura II.2) y en cada uno de esos departamentos en múltiples localidades y haciendas.

Se utilizó como criterio de selección una epidermis lisa (morfología *Impressa* o *Lisa*) y un bajo índice de semillas, así como otros criterios agronómicos (Farré & Hermoso, 1985;87). Como se ha comprobado anteriormente (apartado 3.8) hay una evidente relación entre los caracteres agronómicos y los alelos de los loci isoenzimáticos, lo que implica que el muestreo no ha sido al azar y puede plantear varios problemas metodológicos. Sin embargo, se ha considerado que pueden ser objeto de análisis y proporcionar una valiosa información acerca de los chirimoyos cultivados (aunque algunos puedan ser considerados como silvestres) de la región de origen de la especie.

De las siete provincias, que también se pueden denominar como *poblaciones*, objeto de muestreo, una (Loja) no se ha considerado, pues contabiliza únicamente dos cultivares, un número demasiado pequeño como para dar estimas significativas. Esta región presenta cultivares en estado silvestre, "cultivándose" sin apoyo de riego ni cuidados por parte de los propietarios (Farré & Hermoso, 1987), lo que la hacía muy interesante como objeto de estudio, pero desgraciadamente no tiene una representación aceptable en el banco de germoplasma.

La tabla III.43 presenta las frecuencias alélicas para los cultivares recolectados en la otra provincia de Ecuador y en las cinco de Perú. Los tests de contingencia revelan que las frecuencias alélicas de la mayoría de los genes son diferentes estadísticamente en las diferentes provincias y que estas presentan patrones alélicos propios, excepto en los casos de Piura y Cajamarca ($\chi^2 = 17.603$, 17 g.l., $p = 0.414$) y de Ancash y Lima ($\chi^2 = 21.768$, 16 g.l., $p = 0.151$) que muestran frecuencias alélicas homogéneas.

Estas provincias se sitúan próximas entre sí (figura II.2) y es posible que exista un elevado flujo de frutos y semillas entre ellas, lo que explicaría la similitud en frecuencias alélicas. La tabla III.44 muestra algunos parámetros de diversidad de los cultivares de estas provincias. A pesar del pequeño tamaño de la muestra representativa de algunas provincias se puede apreciar una gran diversidad genética, con valores próximos a los que presenta la colección (tabla III.22) y no siendo significativamente diferentes salvo en el caso de las provincias con menor número de cultivares, donde se hacen patentes los problemas de las estimas de diversidad realizadas con muestras demasiado pequeñas.

La tabla III.45 muestra el análisis de la diversidad total en los loci polimórficos y su partición en componentes intra e interprovinciales (tal y como se hacía en la tabla III.24 para los diferentes países de procedencia). La varianza límite de dicha tabla equivale a H_T y muestra el valor 0.312 ligeramente menor al que presenta dicho parámetro para toda la colección (0.379). Bajo el epígrafe *varianza actual* aparece el valor de D_{ST} la diversidad

TABLA III.44

Algunos parámetros de diversidad para los cv. de Perú y Ecuador

	n	A	P	He	Ho
<i>Pichincha</i>	35	1.8 (.2)	50.0	0.165 (.052)	0.159 (.045)
<i>Piura</i>	5	1.4 (.1)	36.4	0.100 (.043)	0.144 (.045)
<i>Cajamarca</i>	59	1.8 (.2)	54.5	0.175 (.048)	0.182 (.046)
<i>Ancash</i>	6	1.6 (.2)	45.5	0.121 (.040)	0.185 (.051)
<i>Huánuco</i>	14	1.6 (.1)	50.0	0.169 (.044)	0.193 (.050)
<i>Lima</i>	28	1.7 (.2)	50.0	0.141 (.042)	0.159 (.044)

A = nº medio de alelos por locus

He = heterocigosidad esperada

n = número de cultivares

Entre paréntesis figura el error estándar

P = Polimorfismo

Ho = Heterocigosidad observada

genética que se reparte entre poblaciones, que expresado como proporción de H_T aparece en la tabla como F_{DT} (= G_{ST}).

TABLA III.45

Estructuración de la diversidad en las provincias de Ecuador y Perú

LOCUS	Alelo	Frecuencia media	Varianza muestral	Varianza actual	Varianza límite	F ₉₂
Got-1	2	.08959	.00488	.00077	.08157	.009
	3	.76040	.00734	.00136	.18219	.007
	4	.15001	.00299	.00784	.12750	.061
	Total	---	.01521	.00997	.39126	.025
Got-2	1	.11052	.00362	.01588	.09830	.162
	2	.78404	.00856	.00868	.16932	.051
	4	.07290	.00373	.00789	.06759	.117
	5	.03254	.00200	.00171	.03148	.054
	Total	---	.01791	.03416	.36669	.093
Idh-2	2	.47715	.01049	.00000	.24948	.000
	4	.52285	.01049	.00000	.24948	.000
	Total	---	.02099	.00000	.49896	.000
Mdh-1	1	.73743	.00580	.05095	.19363	.263
	2	.14767	.00483	.01085	.12586	.086
	3	.11490	.00368	.01543	.10170	.152
	Total	---	.01430	.07724	.42119	.183
Men-1	1	.66616	.00735	.03445	.22239	.155
	2	.33384	.00735	.03445	.22239	.155
	Total	---	.01469	.06890	.44478	.155
Pgi-1	2	.04068	.00039	.00308	.03902	.079
	4	.66200	.00467	.05900	.22376	.264
	5	.04456	.00082	.00049	.04258	.012
	6	.25276	.00459	.03488	.18887	.185
	Total	---	.01047	.09745	.49423	.197
Pgm-1	1	.95889	.00137	.00000	.03942	.000
	2	.04111	.00137	.00000	.03942	.000
	Total	---	.00274	.00000	.07884	.000
Pgm-2	1	.99859	.00001	.00000	.00141	.000
	2	.00141	.00001	.00000	.00141	.000
	Total	---	.00002	.00000	.00282	.000
Skd-1	1	.00595	.00020	.00000	.00592	.000
	2	.99405	.00020	.00000	.00592	.000
	Total	---	.00041	.00000	.01183	.000
Sod-6	1	.25990	.00722	.00624	.19235	.032
	2	.74010	.00722	.00624	.19235	.032
	Total	---	.01444	.01248	.38471	.032
Tpi-1	1	.88180	.00326	.00577	.10423	.055
	2	.10214	.00313	.00538	.09171	.059
	3	.01606	.00016	.00049	.01580	.031
	Total	---	.00655	.01164	.21174	.055
Tpi-2	1	.50555	.01028	.00102	.24997	.004
	2	.49445	.01028	.00102	.24997	.004
	Total	---	.02055	.00205	.49994	.004
Tpi-3	1	.14152	.00472	.00418	.12149	.034
	2	.85848	.00472	.00418	.12149	.034
	Total	---	.00944	.00835	.24299	.034
Media	-----	-----	.01136	.02479	.31154	.080

Este parámetro presenta un valor de $G_{ST} = 0.080$, prácticamente casi tres veces inferior al que aparece entre los diferentes países de procedencia (tabla III.24), lo que implica una menor diferenciación entre las provincias de Ecuador y Perú que entre los diferentes países de procedencia, que podría deberse a un mayor flujo genético entre los cultivares de las región de origen.

Se ha calculado una matriz de distancias (Nei, 1978) a partir de las frecuencias alélicas en cada provincia para estimar las relaciones existentes entre estas poblaciones (provincias) (Tabla III.46). Un análisis de esta matriz revela ligeras diferencias entre la población de Ecuador (Pichincha) y las poblaciones de Perú. Así, la distancia media entre Ecuador y Perú se sitúa en 0.027 (rango 0.013 - 0.049) y la distancia media entre poblaciones peruanas es de 0.020 (rango 0.000 - 0.060).

A pesar de lo anteriormente expuesto, no se aprecia un patrón geográfico claro en la distribución de los alelos isoenzimáticos. Así no existe una correlación significativa ($r = 0.34$, $p > 0.05$) entre las distancias genéticas y las distancias geográficas.

Con la matriz de distancias se ha construido un dendrograma UPGMA que muestra visualmente las relaciones de semejanza entre las diferentes provincias (figura 3.68). En este dendrograma puede observarse como Piura y Cajamarca, así como Ancash y Lima, son las provincias que muestran los cultivares con una constitución isoenzimática más semejante (tal y como era previsible, pues como se comentó anteriormente sus frecuencias alélicas no son significativamente diferentes).

TABLA III.46

Matriz de distancias de Nei para las poblaciones de Ecuador y Perú

Pichincha	--					
Piura	0.026	--				
Cajamarca	0.013	0.005	--			
Ancash	0.027	0.011	0.014	--		
Huánuco	0.049	0.060	0.049	0.015	--	
Lima	0.021	0.009	0.014	0.000	0.021	--
	Pichincha	Piura	Cajamarca	Ancash	Huánuco	Lima

La provincia de Ecuador (Pichincha) aparece separada del resto, pero es Huánuco la que queda más alejada de las demás provincias, indicando una constitución genética ligeramente diferente. Por último cabe recordar que Hipólito Ruíz, gran estudioso botánico del Perú cita a Huánuco como el único lugar donde estaba en estado cultivado en 1952 (Farré & Hermoso, 1975).

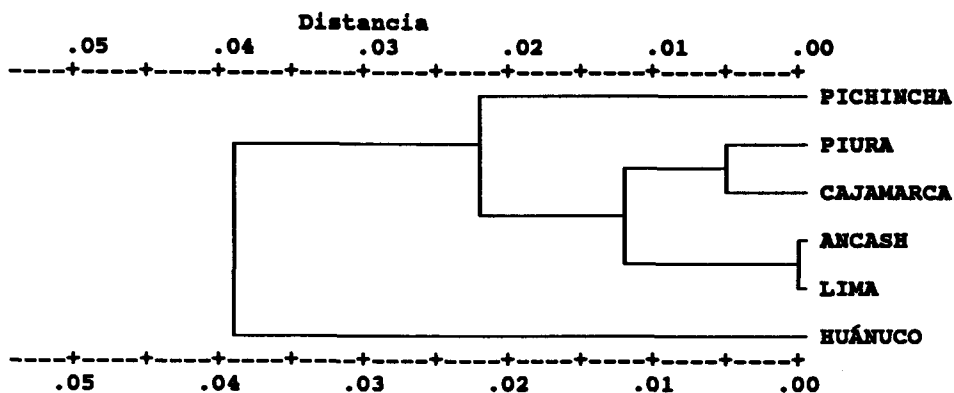


FIGURA 3.68

Dendrograma mostrando las relaciones entre los cv. de las provincias de Ecuador y Perú



Capítulo 4
Discusión

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

□ CAPÍTULO CUARTO □

4. DISCUSIÓN

Esta sección comienza con la discusión de los sistemas isoenzimáticos y de las frecuencias alélicas en la colección de cultivares, así como sobre la capacidad de las isoenzimas para caracterizar los cultivares de chirimoyo. A continuación se comentan las distorsiones en la segregación que se han observado en las progenies de varias autofecundaciones para algunos loci y las relaciones de ligamiento entre varios genes. El tercer apartado analiza las relaciones entre cultivares, con especial atención a los países de procedencia y a las zonas de origen del cultivo. Como cuarto punto se comenta la diversidad que presenta el banco de germoplasma. Y por último se comentan las relaciones observadas entre los datos agronómicos y los isoenzimáticos.

4.1 SISTEMAS ISOENZIMÁTICOS E IDENTIFICACIÓN VARIETAL

Se han estudiado 14 sistemas isoenzimáticos consiguiendo establecer el control genético todos a excepción de GDH, puesto que ésta no muestra suficiente actividad en el material vegetal analizado y, al mismo tiempo, sufre variaciones de origen ambiental en su zimograma (Ratajczak et al., 1989) que dificultan su utilización como marcador.

De los restantes 13 sistemas enzimáticos tres (ACPH, DIA, 6-PGDH) aparecen codificados por genes monomórficos, y por tanto no son útiles en la identificación varietal, al menos en los 210 cultivares analizados.

Tras el genotipado de los cultivares para 23 loci, han apareciendo 8 como monomórficos, lo que supone el 34.8% de los genes estudiados, y el resto, 15 loci, como polimórficos ($P = 65.2\%$). Los genes polimórficos muestran de 2 a 7 alelos en los cultivares estudiados con una media de 3 alelos/locus. Si estos datos se comparan con los valores $P = 57.69\%$ y 2.47 alelos/locus de estimas anteriores (Perfectti, 1992; Pascual et al., 1993) se observa un incremento del 13% para el valor del número de loci polimórficos y del 21% para el número de alelos que presentan estos loci con variabilidad. Este aumento puede explicarse en base a dos factores. El primero es el mayor tamaño de la muestra estudiada que hace que alelos con baja frecuencia sean muestreados y el segundo de estos factores es el estudio de los cultivares de atemoya, que presentan alelos característicos que no aparecen en los cultivares de chirimoya.

Además otros alelos, que no eran recogidos en anteriores trabajos sobre isoenzimas en chirimoya (Ellstrand & Lee, 1987a; Perfectti, 1992; Pascual et al., 1993), han sido identificados por primera vez. Se trata de Got-2: 4, Got-2: n, Pgm-1: 2, Tpi-1: n y Tpi-3: 1', alelos que aparecen con muy baja frecuencia, menor del 0.05 y que por lo tanto no se espera que sean detectados en estudios realizados con un número de cultivares pequeño.

Los cultivares de atemoya presentan en su conjunto una serie de características isoenzimáticas particulares que los diferencian de los chirimoyos y que los definen como un grupo de cv. con entidad propia, tal y como no podía dejar de ser al tener un origen híbrido.

Una de estas características es la presencia de alelos particulares. Es el caso de los alelos Got-2: 3, Idh-1: 1, Idh-2: 3, Pgi-1: 3, Pgm-2: 2' y Tpi-3: 1' que únicamente aparecen en los atemoyos y algunos de ellos (Idh-1: 1, Idh-2: 3, Pgi-1: 3, Pgm-2: 2') aparecen en todos estos cultivares.

Otra de estas características es la ausencia de heterodímero en los electromorfos codificados por Got-2, Got-1 y Pgi-1 (figuras 3.6 y 3.17) y que puede explicarse por la divergencia en propiedades entre las proteínas codificadas por los genes de *A. cherimola* y los de *A. squamosa*.

En general los alelos que aparecen en la colección de cultivares presentan bajas frecuencias. Si no se consideran los dos alelos de Adh-1 (que no ha sido estudiado en todos los cultivares) se observa que 22 alelos presentan frecuencias menores de 0.2 (figura 4.1), lo que supone el 43% de los alelos. Esto implica que unos pocos alelos, que aparecen en alta frecuencia, se encuentren

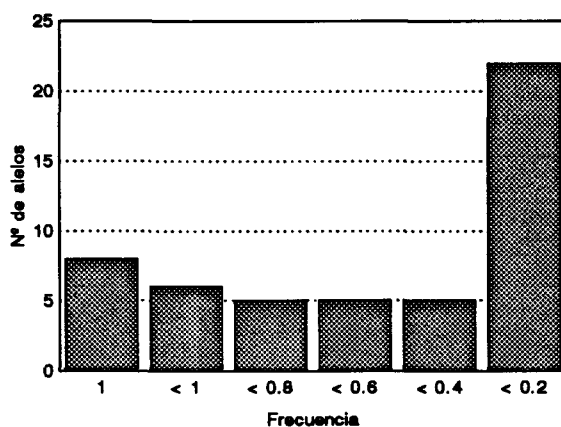


FIGURA 4.1
Alelos de la colección clasificados según la frecuencia con la que aparecen

en la mayoría de los cultivares, haciendo que no existan grandes diferencias entre ellos.

Estos alelos que aparecen en alta frecuencia son los que determinan las frecuencias genotípicas que se observan en la colección. Si se contemplan las distribuciones de genotipos (figuras 3.3, 3.7, 3.8, etc) se evidencia que algunos genotipos, principalmente homocigotos, son los que aparecen con mayor frecuencia en estas distribuciones. Es el caso de Got-1, Got-2, Idh-1, Mdh-1, Me-1, Pgi-1, Pgm-1, Pgm-2, Skd-1, Sod-5, Tpi-1 y Tpi-3. Únicamente en Adh-1, Idh-2 y Tpi-2 los genotipos más frecuentes son heterocigotos.

En general se aprecia que uno o dos genotipos en cada gen aparecen en la mayoría de los cultivares de la colección, haciendo que los demás alelos aparezcan en baja frecuencia. Si se consideran únicamente los cv. de chirimoyo se aprecia el mismo patrón y si se estudia la distribución de los alelos por países de procedencia se observa que la mayoría de los alelos (que están en baja frecuencia) no aparecen en todos los países, pero sí en la mayoría, no observándose un patrón claro de distribución.

A pesar de que ciertos genotipos aparecen en gran número de cultivares, el elevado número de genes polimórficos y el número de alelos que presentan, permiten caracterizar completamente a la gran mayoría de los cultivares. Únicamente aparecen 10 cultivares con genotipos idénticos a los de otros cv. Algunas de estas duplicaciones pueden explicarse como producto de la confusión en la denominación y "pedigri" de ciertos cultivares, un problema que se plantea al utilizar caracteres morfológicos, muy influenciados por el ambiente, en la caracterización varietal (Ellstrand & Lee, 1984; 1986a; 1986b; 1987b; 1990a; 1990b; 1991; Ellstrand, 1991) . Sería el caso de los cultivares españoles Campas y Campas Mejorada, Concha, Concha Lisa y Azapa-II procedentes de Chile, Madeira 5 y Madeira 23, S. Perú 67 y S. Perú 68. Otras duplicaciones no pueden explicarse por la confusión en la denominación del cultivar, por ejemplo S. Ecuador 10 y Chilena, S. Perú 75 y S. Ecuador 37, S. Perú 39 y S. Perú 60, que proceden de lugares muy diferentes. En estos últimos casos cabe suponer que se tratan de cultivares diferentes que comparte igual genotipo para todos los loci isoenzimáticos analizados.

Por último hay que destacar el pequeño número de duplicaciones presentes en el banco de germoplasma, que no llega a suponer el 5% de los cultivares y la potencia discriminante del análisis isoenzimático para genotipar e identificar los cultivares de chirimoyo.

4.2 ANÁLISIS DE PROGENIES

Segregaciones no mendelianas

La distorsión en la segregación de genes individuales es bastante común en árboles frutales y en general en plantas leñosas (Torres, 1990), tal y como se ha apreciado en manzano (Weeden & Lamb, 1987), cítricos (Torres et al., 1985), aguacate (Torres et al., 1986; Vrecenar-Gadur & Ellstrand, 1984), pero también en otras plantas cultivadas como en garbanzo (Gaur & Slinkar, 1990; Kazan et al., 1993; Tanksley & Iglesias-Olivas, 1984), lenteja (Muehlbauer et al., 1989; Tadmor et al., 1987, Zamir & Tadmor, 1986), guisante (Weeden & Marx, 1984), haba (Koenig & Gepts, 1989), girasol (Kahler & Lay, 1985), camelia (Wendel & Parks, 1982), vid (Weeden et al., 1988), etc.

En chirimoyo, Lee & Ellstrand (1987) muestran, tras analizar las progenies producidas por autofecundación, que los cultivares Ott y Spain presentan una distorsión en la segregación respectivamente para los genes Pgi-1 y Mpi.

Los datos expuestos en el presente trabajo (tablas III.1 a III.13) muestran que los trece genes estudiados presentan segregación mendeliana, pero en determinados cultivares y para algunos genes se producen distorsiones en la segregación. Es el caso de Adh-1 en el cultivar Selección Perú 78 (parcela 29), Mdh-1 en Chaffey, Me-1 en Perú seed 24, Pgm-1 en White, Pgm-2 en Pinchudo y Serena y Tpi-2 en Chaffey¹, lo que supone un 11 % de los genes x progenies estudiados, muy por encima del 5 % que podría esperarse al tomar el nivel de significación $\alpha = 0.05$.

Van Heemstra et al. (1991) encuentran que las segregaciones aberrantes en arándano suponen el 6%, lo que consideran fruto del azar al establecer el nivel de significación 0.05. En *Cuphea* sp., Krueger & Knapp (1990) hayan distorsión en las segregaciones en 8 de 58 casos. En cítricos entre el 29 y el 37% de los marcadores muestra algún tipo de distorsión en su segregación (Durham et al., 1992) y en avellano, Rovira et al. (1993) encuentran que en 10 de 46 casos (22%) no se produce segregación mendeliana. Zamir & Tadmor (1986) muestran que el 13% de los genes de *Lens*, *Capsicum* y *Lycopersicum* no segregan mendelianamente en cruces intraespecíficos y el 54% en el caso de los

¹ En algunas otras combinaciones de gen x cultivar, las segregaciones han mostrado una desviación significativa en únicamente uno de los test realizados. Es el caso de Adh-1 en White, Got-1 en Perú seed 24, Pgm-2 en Salmon y Tpi-2 en Perú seed 24.

cruzamientos interespecíficos.

Este fenómeno se cita ampliamente en la literatura científica, pero sus causas siguen estando oscuras. Grant (1975) sugiere que, como comentan Torres et al. (1986), la deficiencia en algún genotipo no significa que ese genotipo cause letalidad, sino más bien que está ligado a otros factores que producen letalidad en alguna etapa del desarrollo. Zamir & Tadmor (1986) indican que estos factores pueden estar sometidos a selección en las fases pre y postzigótica de la reproducción. Otras explicaciones alternativas han sido propuestas. Así, Tanksley (1984), Tanksley & Iglesias-Olivas (1984) y Tadmor et al. (1987) sugieren que el ligamiento con puntos de rotura y translocación de determinados cromosomas puede explicar la distorsión en la segregación. Koenig & Gepts (1989) a su vez proponen la fertilización preferencial y la eliminación de ciertos cigotos como mecanismo explicativo. Vaillancourt & Slinkard (1992) explican que la disjunción anómala seguida de la eliminación preferencial de ciertos cromosomas produce distorsión en la segregación de ciertos loci que están situados en estos cromosomas. El ligamiento a loci de autocompatibilidad también puede provocar distorsiones (Abe et al., 1993). La selección gamética (polen) también ha sido implicada como fenómeno inductor de estas segregaciones anómalas (Hornaza & Herrero, 1992).

La posibilidad de selección gamética o cigótica puede estudiarse si se analizan detalladamente las segregaciones. Si existe desviación en la proporción esperada de los gametos ($p = q = 0.5$) se sospecharía selección gamética (Westphal & Wricke, 1991). Por el contrario si los datos no se ajustan a las proporciones genotípicas $p^2 : 2pq : q^2$ puede pensarse en selección cigótica (Pham et al., 1990).

Los datos aquí presentados sugieren la posibilidad de selección gamética. En todos los casos excepto uno (Me-1 en Peru seed 24) los test de χ^2 indican que no hay igual proporción (p, q) de gametos de ambos alelos, pero sí se distribuyen siguiendo la proporciones $p^2 : 2pq : q^2$ (excepto en Me-1 en Perú seed 24 y en Pgm-1 en el cultivar White) mostrando que no parece haber selección cigótica. Igual sucede en un estudio de 30 loci en arroz, donde Pham et al. (1990) encuentran que 18 genes presentan segregaciones no mendelianas en 12 progenies y casi en ninguna se producen los dos tipos de gametos con igual frecuencia, pero si se ajustan las frecuencias genotípicas a las esperadas.

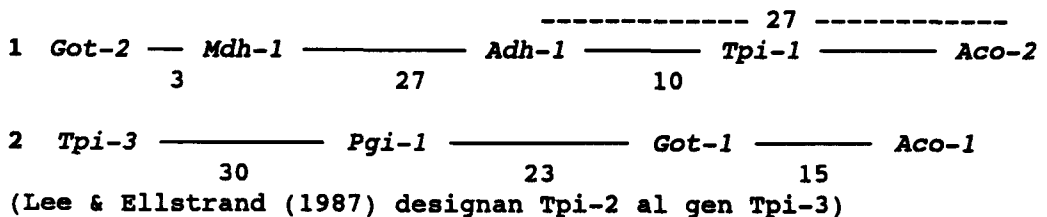
Por lo tanto cabe pensar que posiblemente sean fenómenos como el ligamiento a factores deletéreos que impidan la formación de ciertos gametos

o la competición de polen, los que puedan explicar las segregaciones anómalas de determinados loci en ciertos cultivares de chirimoyo.

Ligamiento

La obtención de mapas de ligamiento es sumamente útil para localizar genes que puedan ser susceptibles de emplearse en la mejora genética (Kazan et al., 1993), tanto para aquellos caracteres monogénicos (como ciertos tipos de resistencia a plagas y enfermedades) como para los loci que codifican para caracteres cuantitativos.

Lee & Ellstrand (1987) realizaron un primer análisis de ligamiento en chirimoyo, encontrando dos grupos de ligamiento:



Los resultados obtenidos presentan, en general, una buena concordancia con los datos de Lee & Ellstrand (1987), pero con ciertas diferencias que se comentan a continuación. En el presente trabajo se han encontrado tres grupos de ligamiento con varios genes (figura 4.2), el primero con los loci Tpi-1, Adh-1, Mdh-1 y Got-2, el segundo con Me-1, Idh-2 y Tpi-2 y el tercero Got-1, Pgi-1 y Pgm2. Además Skd-1, Tpi-3 y Pgm-1 no aparecen ligados con otros marcadores, al menos al nivel de $\alpha = 0.01$.

El primero de estos grupos de ligamiento se corresponde bastante bien con el de Lee & Ellstrand (1987), el orden de los marcadores es el mismo y únicamente hay algunas diferencias en los valores de distancias entre los marcadores: Adh-1 y Tpi-1 aparecen en el artículo de Lee & Ellstrand a una distancia $r = 10$ y en este trabajo se determina una $r = 9$; Mdh-1 - Adh-1 ($r = 27$ y 38.7) y Got-2 - Mdh-1 ($r = 3$ y 12.9) varían en el valor de distancia calculado por Lee & Ellstrand (1987) y los presentados aquí.

En el segundo grupo de ligamiento, Got-1 y Pgi-1 aparecen ligados a una

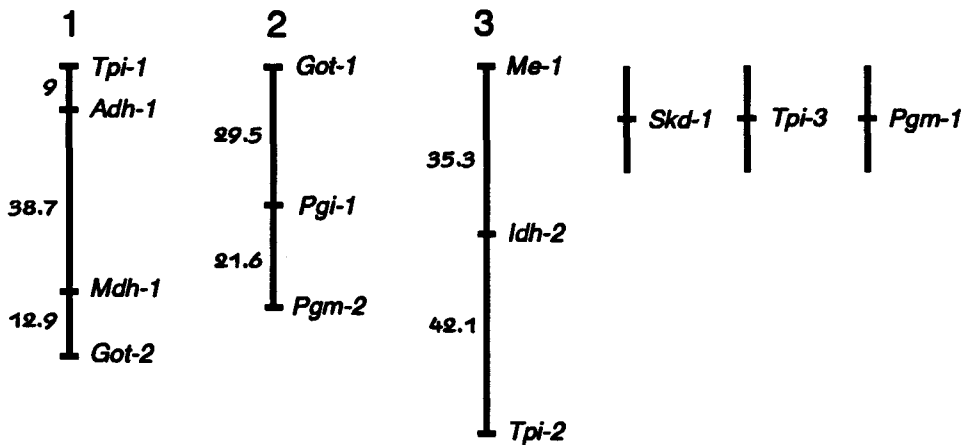


FIGURA 4.2

Mapa de ligamiento obtenido con el criterio $p < 0.01$

distancia de 29.5 u.m., similar a la presentada por Lee & Ellstrand. Sin embargo, no se detecta ligamiento entre Pgi-1 y Tpi-3 y si entre Pgi-1 y Pgm-2 (figura 4.2). Lee & Ellstrand encuentran ligamiento entre Pgi-1 y Tpi-3, obteniendo una $r = 0.30$ y con $p = 0.03$ al analizar únicamente 30 semillas del cultivar White. Si aplicamos el criterio más restrictivo de $\alpha = 0.01$, no se considerarían ligados estos dos loci. En el presente trabajo se estudian (Tabla III.16) 54 semillas del mismo cultivar (White) no apareciendo desviaciones significativas que impliquen ligamiento. Como Lee & Ellstrand (1987) realizan una interpretación de la variabilidad de PGM diferente de la presentada aquí, no se puede comentar comparativamente sus datos para el locus Pgm-2.

En el tercer grupo de ligamiento (figura 4.2) se sitúan los loci Me-1, Idh-2 y Tpi-2 separados por 35.2 y 42.1 u.m. El primer locus (Me-1) no es estudiado por los investigadores americanos y por lo tanto no se pueden establecer comparaciones. Las relaciones de ligamiento entre Tpi-2 e Idh-2 tampoco son analizadas por estos autores.

Hay que comentar que si se considera un nivel de significación menos restrictivo ($\alpha = 0.05$) puede obtenerse un mapa de ligamiento diferente al aparecer unidos los grupos 2 y 3 (figura 4.3), pues se considerarían ligados Tpi-2 y Got-1 ($r = 0.366$ y $p = 0.012$). Así mismo Pgm-1 y Pgm-2 también aparecerían ligados ($r = 0.425$ y $p = 0.038$).

Sin embargo, consideramos que el criterio del 0.05 es muy laxo para aplicarlo al caso de progenies no muy numerosas y con gran variabilidad entre

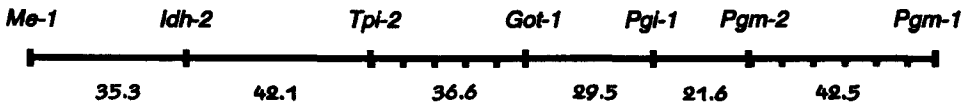


FIGURA 4.3
Grupo de ligamiento 2 con el criterio $p < 0.05$

los cultivares. Por tanto el siguiente mapa de ligamiento (figura 4.4), que recoge los loci Aco-1 y Aco-2 estudiados por Lee & Ellstrand (1987), podría ser el más plausible con los conocimientos actuales.

En definitiva se encuentran tres grupos de ligamiento y 3 genes independientes que pueden suponer el tener marcadores isoenzimáticos para 6 de las 7 parejas cromosómicas que presenta la especie.

El hecho de encontrar diferencias en la frecuencia de recombinación entre dos marcadores en diferentes progenies refleja un hecho recogido ampliamente

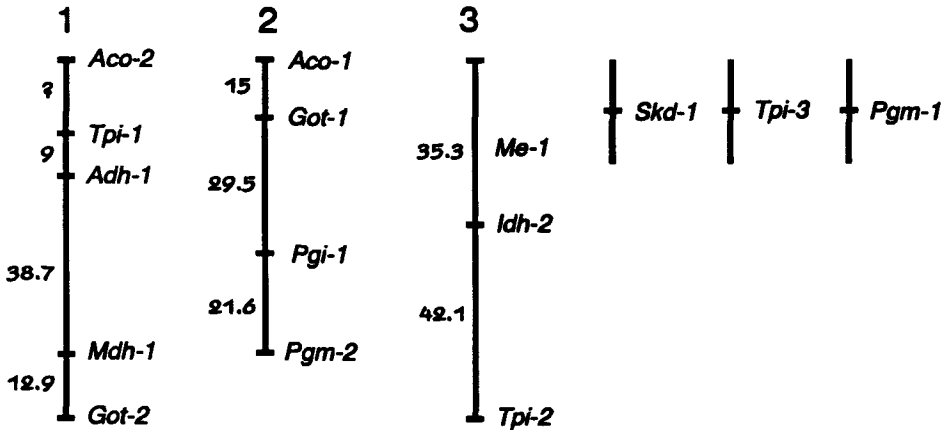


FIGURA 4.4
Mapa genético de varios loci teniendo en cuenta los genes Aco estudiados por Lee & Ellstrand (1987)

en la bibliografía pero no suficientemente bien aclarado. Por ejemplo Pham et al. (1990) encuentran resultados contradictorios (ligamiento o independenciam) dependiendo de la progenie en cruces en arroz; van Heemstra et al. (1991) comentan resultados similares en arándano al analizar varias progenies; igual

les sucede a Westphal & Wricke (1991) en zanahoria; Krueger & Knapp (1990) hallan valores dispares de p en *Cuphea*; este fenómeno es referido en lentejas por Vaillancourt & Slinkard (1993) o en *Allium* por Eickmeyer et al. (1990); y en numerosas coníferas (Barret et al., 1987; Szmidt & Muona, 1989) como *Larix decidua* (Lewandowski & Mejnartowicz, 1991) donde las diferencias se producen entre árboles; Rudin & Ekberg (1978) encuentran este tipo de diferencias entre árboles del norte y del sur de Suecia).

Saylor & Smith (1966) han sugerido que estas variaciones en el ligamiento pueden deberse a irregularidades meióticas. Algunos factores como las diferencias en la intensidad de entrecruzamientos entre diferentes árboles o variaciones ambientales durante los períodos de formación de los gametos pueden ser responsables de estos fenómenos que pueden producir estimas inconsistentes del ligamiento (Andersson et al., 1969; Niebling et al., 1987).

4.3 RELACIONES ENTRE CULTIVARES. PROCEDENCIAS Y PAÍSES DE ORIGEN

Los diferentes análisis realizados presentan la imagen de unos cultivares de chirimoyo bastante homogéneos, sin grandes diferencias entre ellos. Sin embargo, pueden establecerse ciertos patrones de diferenciación.

Las distancias de χ^2 calculadas proporcionan de forma numérica la relación de similitud entre los cultivares. Puesto que la matriz de distancias es demasiado grande como para poder observar las relaciones entre cv. de forma directa se realizó un tratamiento gráfico de la matriz de distancias (figura 3.38). En esta figura se aprecian general un tono gris que pone de manifiesto el predominio de distancias con valores intermedios, lo que implica la homogeneidad de las características isoenzimáticas estudiadas, no apareciendo grandes diferencias entre cultivares de chirimoyo.

Cuando se consideran las atemoyas si aparecen estas diferencias. Éstas, al ser híbridos, se desmarcan claramente de los chirimoyos, mostrando las distancias más elevadas.

Al analizar más detalladamente esta matriz de distancias se pueden observar ciertos patrones de variación:

- poca diferenciación entre los cv. de Ecuador y Perú

- los cultivares de Madeira aparecen lo suficientemente diferentes del resto como para formar una "banda" oscura de distancias con valores elevados
- Los cultivares de Bolivia repiten el mismo patrón que los de Madeira
- en menor medida sucede lo mismo con España
- Ecuador muestra una gran homogeneidad, pues la zona de distancias Ecuador-Ecuador aparece con tonos de gris más claro
- USA muestra una gran heterogeneidad entre sus cv., algunos presentan valores de distancias altas con los demás cv. y otros muestran un patrón inverso.

En general se aprecia un patrón geográfico que justifica el estudio de los cv. agrupados por países de procedencia, como ya anteriormente se había puesto de manifiesto (Perfectti, 1992; Perfectti et al., 1993).

El estudio del dendrograma (lámina I) manifiesta el mismo patrón, al menos para España, Bolivia, Madeira y, por supuesto, para las atemoyas, apareciendo clusters particulares donde se agrupan estos cultivares. Por el contrario, los cv. de Perú, Ecuador, USA y Chile aparecen dispersos por la mayoría de los clusters, indicando la mayor heterogeneidad del material vegetal que procede de estos países.

La tabla III.26 recoge las medias de las distancias de χ^2 intra e inter-procedencias (incluyendo a las atemoyas). Como se puede apreciar en dicha tabla y en las figuras 3.39 a 3.47, hay procedencias muy homogéneas (valores de distancias intra-procedencia significativamente menores que los valores de distancias inter-procedencias) y claramente diferentes del resto de los cultivares. Es el caso de las atemoyas, Bolivia, Madeira y España, que muestran características particulares en su acervo génico. Ecuador y Perú manifiestan también un patrón similar, pero menos marcado, pues presentan una gran similitud entre ellos y cultivares con pequeñas (y otros con grandes) diferencias isoenzimáticas con los cv. de otras procedencias. Por último, los países con cultivares más heterogéneos, lo que puede indicar diferentes orígenes de los cv., son USA, Chile y, evidentemente, los recogidos bajo el epígrafe Otros.

Si se realiza un análisis cluster UPGMA a partir de la matriz de distancias medias se obtiene el dendrograma de la figura 4.5. En esta figura puede apreciarse como las atemoyas son claramente diferentes, y como Madeira y Bolivia presentan diferentes grados de diferenciación con respecto al resto de

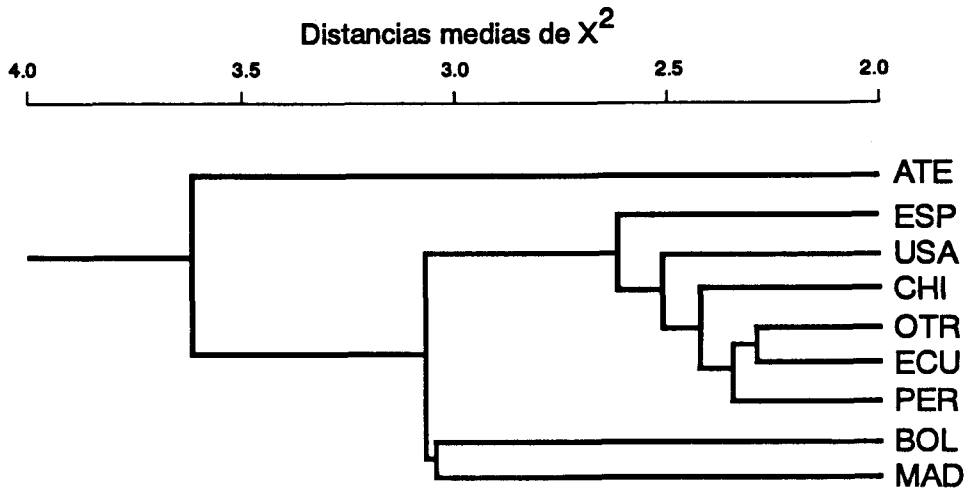


FIGURA 4.5
Dendrograma mostrando las relaciones entre procedencias

las procedencias y aparecen en un cluster separado.

Este patrón es revelado también por el análisis factorial de correspondencias (AFC), sobre todo cuando se realiza a partir de la tabla de frecuencias alélicas de las procedencias. En las figuras 3.50 y 3.51 se puede observar como las únicas procedencias claramente separadas son Madeira, Bolivia y España, cada una en diferente forma.

Por su parte el análisis discriminante (recuadro III.2) consigue, en base a diez alelos de 8 genes, clasificar a los cultivares en sus respectivas procedencias con un éxito del 71.8%. De nuevo se aprecia que los grupos más homogéneos, y por tanto con un mayor porcentaje de acierto en la clasificación, son Madeira, Bolivia, España y Ecuador (con valores de éxito por encima de la media). Lo contrario les sucede a los cultivares de USA, Chile y Perú, poniendo de manifiesto su heterogeneidad.

Por lo tanto se puede concluir que los isoenzimas separan perfectamente a los cultivares de atemoya de los de chirimoya, y que en base a estos marcadores, se aprecia una distribución particular de las diferencias genéticas entre los diferentes países de procedencia.

4.4 DIVERSIDAD

Para mantener y explotar eficientemente los recursos de un banco de germoplasma es necesario el estudio de la variación (diversidad) que presenta, de como está repartida entre las diferentes entradas o grupos de entradas, así como conocer la *estructura de poblaciones* de la colección (Erkine & Muehlbauer, 1991). En el mismo sentido se expresan Asins & Carbonell (1987) cuando comentan que el estudio de la distribución de la variabilidad genética en un cultivo es un primer paso hacia la conservación de los recursos genéticos y la caracterización del germoplasma, los cuales pueden ser de utilidad en los procesos de mejora. Sin embargo, y a pesar de la gran importancia de los estudios de la variabilidad genética, muy pocos autores han estudiado la variabilidad intraespecífica de especies cultivadas (Bretó et al., 1993).

El banco de germoplasma de la E.E. *La Mayora* recoge cultivares de la mayoría de los países con producción de chirimoyas y por lo tanto puede proporcionar estimas fiables de la diversidad presente en el cultivo y, posiblemente, en la especie.

La tabla III.22 muestra los parámetros de diversidad calculados, que serán comentados a continuación.

Polimorfismo (P)

La proporción de loci polimórficos (P) o polimorfismo ha sido usada ampliamente como una medida de la diversidad presente en una población o especie (Gottlieb, 1981). Un locus se define como polimórfico cuando la frecuencia de su alelo más común es igual o menor a 0.99. Esta arbitraria definición es la más empleada, aunque también han sido utilizados otros criterios (Nei, 1987). Un problema de esta medida es que está muy condicionada por el número de individuos y de loci estudiados. Es necesario un número alto de ambos parámetros para tener una buena estima de P.

El valor de P en los chirimoyos es del 54.55 %, que aumenta hasta 63.64 en la colección al considerar a las atemoyas, gracias a que estos cv. presentan variabilidad en el locus *Idh-1*.

Sin embargo, para tener una visión más precisa del polimorfismo que presenta la especie se pueden considerar una serie de loci que no se han contabilizado para calcular los valores anteriores. Es el caso de *Adh-1*, *Lap-1*,

Lap-2 y Lap-3 (Perfectti, 1992; Pascual et al., 1993) y de Aco-1, Aco-2, Aco-3, 6Pgd-1 y Mpi (Ellstrand & Lee, 1987a), loci estudiados en otros trabajos. Al considerar estos genes (un total de 31 loci) el valor de P en chirimoyo se eleva hasta el 64.51% (llegando a 67.7% en la colección).

Este valor de la proporción de loci polimórficos es, claramente, un valor alto si se compara con la media para las plantas cultivadas (49%) proporcionada por Doebley (1990), y se acerca al valor medio de plantas tan polimórficas como las gimnospermas (coníferas principalmente), se sitúa ligeramente por encima del valor medio en los árboles y por encima de los valores medios de plantas con similares características biológicas (datos de Hamrick & Godt (1990) en la tabla IV.1).

El valor que presentan las atemoyas está influenciado por el pequeño tamaño muestral (4 cv.). Sin embargo, y debido a su origen híbrido, presentan un alto nivel de polimorfismo, que muy posiblemente se incremente si se consideraran más cultivares de atemoya.

Riqueza alélica (A)

Una medida de diversidad muy empleada es el número medio de alelos por locus (A), que mide la riqueza alélica de una población (o especie) (Brown & Weir, 1983; Gottlieb, 1981; Nevo, 1978). Sin embargo, esta medida tiene un serio defecto, es altamente dependiente del número de individuos analizados (Nei, 1978). La muestra estudiada es suficientemente extensa para proporcionar estimas fiables en el caso de los chirimoyos (206 cv. de chirimoyo), pero no en el de las atemoyas (4 cv.).

Los 210 cv. analizados muestran como media un valor de $A = 2.32$ alelos/locus (considerando 22 loci, todos los estudiados excepto Adh-1 que no se ha determinado en todos los cultivares). Este valor es alto si se compara (tabla IV.1) con la media de todas las plantas (1.96 alelos/locus), con el de las dicotiledóneas (1.79 alelos/locus) o con el que presentan las plantas cultivadas (media de 1.96 alelos/locus) (Hamrick & Godt, 1990; Doebley, 1990).

Los valores de la riqueza alélica para las atemoyas son elevados si consideramos el pequeño tamaño muestral (4 cv.). De todas formas es arriesgado hacer un análisis de este valor conociendo la alta dependencia de esta medida con respecto al número de individuos estudiados (Nei, 1978).

TABLA IV.1

Riqueza alélica, polimorfismo y diversidad genética en varios grupos de plantas

	nº medio de loci estudiado	Riqueza alélica A	Polimorfismo P	Diversidad Genética He
Todas las plantas	16.5 ± 0.4	1.96 ± 0.05	50.5 ± 1.4	0.149 ± 0.006
Gimnospermas	16.1 ± 1.3	2.35 ± 0.12	70.9 ± 3.6	0.173 ± 0.011
Dicotiledoneas	16.8 ± 0.4	1.79 ± 0.04	44.8 ± 1.5	0.136 ± 0.007
Monocotiledoneas	15.5 ± 0.9	2.38 ± 0.17	59.2 ± 3.4	0.181 ± 0.015
Plantas cultivadas	-	2.15	49	0.093
Anuales	14.9 ± 0.5	2.07 ± 0.09	50.7 ± 2.2	0.161 ± 0.009
Árboles	17.0 ± 0.9	2.19 ± 0.09	64.7 ± 2.7	0.177 ± 0.010
local	16.9 ± 0.8	1.83 ± 0.08	45.1 ± 2.8	0.137 ± 0.011
Regional	16.7 ± 0.7	1.94 ± 0.06	52.9 ± 2.1	0.150 ± 0.008
Amplia	14.6 ± 0.9	2.29 ± 0.16	58.9 ± 3.1	0.202 ± 0.015
Templada	15.6 ± 0.4	1.91 ± 0.05	48.5 ± 1.5	0.146 ± 0.006
Templada-tropical	15.1 ± 1.3	2.53 ± 0.39	58.8 ± 6.4	0.170 ± 0.026
tropical	21.3 ± 1.0	1.81 ± 0.10	49.2 ± 3.6	0.148 ± 0.015
Autógamas	16.2 ± 0.7	1.69 ± 0.06	41.8 ± 2.9	0.124 ± 0.011
Mixta-animal	14.4 ± 0.8	1.68 ± 0.08	40.0 ± 3.5	0.120 ± 0.015
Mixta-viento	12.5 ± 3.6	2.18 ± 0.21	73.5 ± 9.3	0.194 ± 0.038
Alógamas-animal	17.7 ± 0.7	1.99 ± 0.07	50.1 ± 2.0	0.167 ± 0.010
Alógamas-viento	16.7 ± 0.9	2.40 ± 0.13	66.1 ± 2.7	0.162 ± 0.009
Colección	22	2.32 ± 0.30	63.64	0.206 ± 0.047
Chirimoyo	22	2.05 ± 0.25	59.09	0.199 ± 0.046
Atemoyo	22	1.75 ± 0.18	54.55	0.292 ± 0.063

Las entradas están divididas en varias categorías grupos taxonómicos y cultivadas, hábito de vida, rango de distribución, distribución geográfica y sistema de cruzamiento.

Los datos han sido tomados de Hamrick & Godt (1990) y Doherty (1990), excepto los que hacen referencia a la colección, chirimoyos y atemoyos presentados en esta tesis.

Si se consideran por separado a los chirimoyos se puede observar que el valor de A desciende, aunque no de forma significativa (figura 3.31), hasta los 2.05 alelos por locus. Este valor es similar a la media de todas las plantas y a

los valores de especies de características similares (tabla IV.1), situándose en el intervalo de las plantas de hábito de vida arbóreo, de las especies de distribución regional y presentando valores no significativamente diferentes de la media para las especies de la zona templada-tropical.

El chirimoyo presenta un ciclo floral que lo predispone a la alogamia (Thompson, 1970), aunque en las zonas productoras de España se ha encontrado un sistema de cruzamiento mixto, con tasas de alogamia desde 0 al 31% (Manzano, 1994; Manzano et al., 1994) y como vector de polinización insectos del género *Orius* (Hermoso et al., 1990). Sin embargo, la riqueza alélica que presenta el chirimoyo es netamente superior a la que muestran las especies con sistemas de cruzamiento mixto con vectores animales (1.68 alelos/locus) y es similar a la encontrada en las especies alógamas y con vectores animales, característica que pueden presentar las poblaciones naturales de chirimoyo.

En general el chirimoyo aparece como una especie que presenta un valor de A que se sitúa dentro de la orquilla de valores esperados dadas sus características biológicas.

Si se estudia este parámetro considerando las diferentes procedencias (figura 3.31) pueden extraerse algunas ideas interesantes. Lo más destacable es que aparecen dos grupos de procedencias: Perú, Ecuador y USA que presentan valores altos, y similares a los calculados para toda la especie, y otro grupo formado por las demás procedencias (España, Bolivia, Chile, Otros y Madeira) que muestran valores menores (aunque no siempre significativamente menores).

Las procedencias Perú y Ecuador presentan la mayoría de los alelos (figura 3.30), hecho que puede explicarse gracias al mayor número de cultivares estudiados o bien a que representan las zonas de origen de la especie (Popenoe, 1921; Guzmán, 1951) y bien pueden considerarse como un *centro primario de diversidad*.

Estados Unidos, con únicamente diez cultivares estudiados, presenta alelos como Idh-2:1, Pgi-1: n y Pgi-1: 1 (descrito por Ellstrand & Lee (1987a) en cultivares de California) que únicamente han sido encontrados en cv. de este país. Estos alelos no aparecen en ninguno de los más de 100 cv. de Perú y Ecuador y podría suponerse proceden de poblaciones de chirimoyos situados en Centro América (hay que recordar que el chirimoyo llegó a Estados Unidos desde México (Schroeder, 1945)). Los chirimoyos de Centro América no han sido muestreados (aunque el cultivar Zarcero es posible que provenga de Costa

Rica) y por tanto no conocemos la composición alélica de esas poblaciones. Por tanto, la posible múltiple procedencia de los cv. de USA podría explicar el alto valor de A. Otra posible explicación podría ser la sugerente hipótesis de la introgresión de variantes alélicas de otras anonáceas de las zonas tropicales. Esta idea está basada en la manifiesta facilidad para hibridar con otras especies del género que presentan los chirimoyos (Wester, 1915). Estas otras anonáceas se presentan en las zonas tropicales de Centro América, zona de migración del chirimoyo desde su centro de origen hasta California. Una situación parecida se da en el algodón, donde el cultivo presenta mayor diversidad que la especie silvestre gracias a la introgresión (Percy & Wendel, 1990).

Los bajos valores presentados por las demás procedencias pueden explicarse por el efecto fundador que supone la exportación a otras zonas (Madeira, España, Bolivia, Chile) de una *muestra* de cultivares, que no siempre recoge todas las variantes alélicas presentes en las poblaciones originales. Sin embargo el hecho de que estos valores no sean significativamente diferentes de los que presentan las procedencias Perú y Ecuador puede deberse al hecho de que los cuellos de botella deben ser muy intensos (en torno a menos de diez individuos), o producirse varios de forma consecutiva, para reducir significativamente el número de alelos por locus e incluso extremos para afectar grandemente a la diversidad genética (H_e) (Coates, 1992).

De todas formas hay que precisar que el grupo boliviano es tan pequeño (únicamente 3 cv) que es muy arriesgado hacer cualquier extrapolación sobre los valores de riqueza alélica de los cultivares bolivianos en su conjunto.

Diversidad genética (H_e , heterocigosidad esperada)

La diversidad genética media (H o H_e) (Nei, 1973b) es sin duda el parámetro más usado para medir la diversidad. También es llamado heterocigosidad panmíctica media o heterocigosidad media esperada bajo equilibrio Hardy-Weinberg. En poblaciones que no están en este equilibrio, en especies autógamias o en especies no diploides este valor no nos da la proporción de heterocigotos, pero, sin embargo, sigue manteniendo otro significado: la probabilidad de que dos alelos tomados al azar sean diferentes (Nei, 1978).

H_e no depende tanto del número de individuos analizados como del

número de loci. Como esta medida es $H = \sum_{j=1}^r \frac{h_j}{r}$ donde $h_j = 1 - \sum x_i^2$, r el

número de genes y x_i la frecuencia del alelo i , se puede apreciar que aumentando mucho el tamaño de muestra (el número de individuos analizados) únicamente se conseguirá tener más alelos, pero posiblemente con frecuencias pequeñas que no contribuirán apenas al valor h_j y por tanto a la diversidad genética. Sin embargo r , el número de genes, si es importante y debe ser alto. Así, Nei (1987) que reconoce que rara vez se emplean más de treinta loci en estudios electroforéticos, recomienda que si r se sitúa en torno a 25 loci que se empleen al menos 20 ó 30 individuos. Como puede verse, la estima de H_e aquí presentada debe considerarse satisfactoria pues se ha obtenido a partir de 22 loci y más de 200 individuos.

Las atemoyas (tabla IV.1) presentan unos valores muy altos de H_e (0.292) debido a su origen híbrido, que implica un alto número de loci heterocigotos y alelos con frecuencias similares. Sin embargo, no contribuyen de forma significativa, a elevar el valor de H_e en la colección (figura 3.32).

Los chirimoyos presentan un valor de $H_e = 0.199$ muy superior a la media de las plantas cultivadas (0.093), ya que esta última estima está basada sobre todo en plantas herbáceas, que de por sí presentan valores más bajos de diversidad genética (tabla IV.1).

El valor en chirimoyos se sitúa por encima de la media para los árboles (0.177) y plantas de la zona templada-tropical (0.170), mostrando valores similares a la media que presentan las plantas alógamas con polinización eólica (0.194) y superior a la media (0.167) de las plantas con sistema de cruzamiento mixto (polinización animal) que suponemos tiene el chirimoyo en los cultivos españoles.

Si se observa la figura 3.32 puede apreciarse que no hay diferencias significativas de H_e entre ninguna de las procedencias (países) estudiadas, y que, además, tampoco muestran diferencias significativas con el valor para toda la colección o para los chirimoyos.

España, Bolivia y Madeira presentan los valores más bajos, lo que puede ser una pista del posible efecto fundador en estas procedencias. Una reducción en la variabilidad genética, que se puede predecir por estimadores como H_e , puede ser debida a la migración y a la domesticación (Nei & Chakraborty,

1975; Doebley, 1990; Huang et al., 1994). Estos procesos de cuello de botella afectan a la riqueza alélica más que a la heterocigosidad esperada (McCommas & Bryant, 1990), con lo que los efectos en esta última no serán tan notables como en el número de alelos por locus, e incluso puede haber casos de aumento de H_e debidos al efecto fundador (Leberg, 1992).

Los valores más altos los presentan las procedencias USA y Otros, muy posiblemente debido a la mezcla de cultivars de diversos orígenes en ambos grupos.

Tras analizar estos parámetros (A , P , H_e) de diversidad en las diferentes procedencias (países) estudiadas de chirimoyo se observa un patrón que se repite (con pequeñas diferencias) en las tres medidas. Esto es, España, Madeira y Bolivia son las procedencias que presentan menores valores de los estimadores de la diversidad. Además, hay que hacer notar que estas mismas procedencias muestran también una mayor diferenciación del resto de cv., tal y como se ha puesto de manifiesto con el análisis factorial de correspondencias (figuras 3.49, 3.50 y 3.51), análisis discriminante (clasificaciones correctas por encima de la media, tabla III.27) dendrograma y análisis de distancias de χ^2 , donde aparecen como grupos homogéneos con valores de distancias intra-grupales bajas (tabla III.26 y figuras 3.40, 3.42 y 3.45). Esto es, al no mostrar todos los alelos, sino más bien una *muestra* sesgada presentan menores índices de diversidad y características combinaciones de alelos que los diferencian del resto, y que pueden ser explicados quizás como los resultados de varios episodios de *efecto fundador*.

Distribución de la diversidad

Un importante punto a estudiar es la distribución de la diversidad genética intra e inter-grupos. Para comprender la estructura genética de un cultivo es necesario conocer los parámetros que miden como esta particionada la diversidad (Ibáñez et al., 1993).

En chirimoyo se puede realizar este análisis de forma comparativa, enfrentando los valores de H_T , H_S y G_{ST} de los cultivares agrupados en las diferentes procedencias (tabla III.24) y los de los cultivares de Ecuador y Perú recolectados durante las expediciones a estos países (tabla III.45), así como comparándolos con los de otros grupos de plantas.

TABLA IV.2

Distribución de la diversidad en componentes Intra e Inter poblacionales entre varios grupos de plantas

	nº medio de poblaciones	H _T	H _S	G _{ST}
<i>Todas las plantas</i>	12.7 ± 1.3	0.310 ± 0.007	0.230 ± 0.007	0.224 ± 0.012
<i>Gimnospermas</i>	8.5 ± 0.9	0.297 ± 0.013	0.271 ± 0.013	0.068 ± 0.013
<i>Dicotiledoneas</i>	11.9 ± 1.7	0.311 ± 0.009	0.214 ± 0.008	0.273 ± 0.017
<i>Monocotiledoneas</i>	18.7 ± 3.1	0.320 ± 0.019	0.238 ± 0.017	0.231 ± 0.023
<i>anuales</i>	18.5 ± 3.0	0.330 ± 0.012	0.200 ± 0.012	0.357 ± 0.024
<i>Árboles</i>	9.3 ± 1.4	0.298 ± 0.012	0.269 ± 0.011	0.076 ± 0.010
<i>local</i>	8.8 ± 1.0	0.300 ± 0.015	0.215 ± 0.013	0.242 ± 0.024
<i>Regional</i>	10.4 ± 1.1	0.308 ± 0.010	0.236 ± 0.010	0.216 ± 0.019
<i>Amplia</i>	25.5 ± 5.2	0.347 ± 0.013	0.267 ± 0.014	0.210 ± 0.025
<i>Templada</i>	11.6 ± 1.3	0.318 ± 0.008	0.228 ± 0.008	0.246 ± 0.015
<i>Templada-tropical</i>	37.3 ± 12.1	0.301 ± 0.045	0.219 ± 0.039	0.233 ± 0.049
<i>tropical</i>	10.6 ± 2.8	0.278 ± 0.023	0.228 ± 0.017	0.173 ± 0.021
<i>Autógamas</i>	20.3 ± 3.8	0.334 ± 0.017	0.149 ± 0.016	0.510 ± 0.035
<i>Mixta-animal</i>	8.9 ± 2.1	0.304 ± 0.022	0.221 ± 0.017	0.216 ± 0.024
<i>Mixta-viento</i>	10.0 ± 3.1	0.378 ± 0.057	0.342 ± 0.054	0.100 ± 0.022
<i>Alógamas-animal</i>	10.7 ± 2.1	0.310 ± 0.010	0.243 ± 0.010	0.197 ± 0.017
<i>Alógamas-viento</i>	10.7 ± 1.6	0.293 ± 0.011	0.259 ± 0.011	0.099 ± 0.012
<i>Chirimoyos</i>	8	0.379	0.295	0.223
<i>Expediciones</i>	6	0.312	0.287	0.080

Datos tomados de Hamrick & Godt (1990) excepto los que hacen referencia a chirimoyos.

Chirimoyos = datos para los cv. de chirimoyo agrupados por procedencias.

Expediciones = datos para los cultivares de las expediciones a Perú y Ecuador, agrupados por localidades.

Si consideramos el valor de la diversidad total H_T (tabla IV.2), puede apreciarse un aumento desde el valor 0.312 que presentan los cv. en las zonas de cultivo en Perú y Ecuador hasta 0.379 en toda la colección (sin incluir las atemoyas). El valor en los cv. de las expediciones se sitúa próximo a la media que presentan las especies de dicotiledoneas (0.311), ligeramente superior al

que presentan las especies de hábito de vida arbóreo (0.298) y con polinización alógama con vector animal (0.310). Sin embargo el valor de este parámetro para los chirimoyos agrupados por procedencias es muy alto, y únicamente comparable al que presentan especies con polinización alógama y anemófila. En las especies cultivadas H_T toma el valor medio de 0.19 (Doebley, 1990), muy por debajo del valor 0.379 que presenta la colección.

Los valores de diversidad intra-grupos (H_i) siguen un patrón similar mostrando valores absolutos altos tanto en los cv. de las expediciones como en los cv. de toda la colección agrupados por procedencias. Al igual que para H_T el valor máximo se produce en el agrupamiento por procedencias, pero la diferencia con los cv. de las expediciones es ya muy pequeña (tabla IV.2).

Pero para comparar la organización de la diversidad el parámetro más interesante es G_{ST} o proporción de la diversidad total que se reparte entre grupos (ya sean poblaciones, procedencias o localidades).

Los valores de G_{ST} en los cv. de las expediciones concuerdan aceptablemente bien (tabla IV.2) con los que se esperan en las especies arbóreas (0.076), y son parecidos a los que presentan las especies con un marcado flujo genético, como las especies alógamas, puesto que altas tasas de alogamia y flujo genético reducen el valor de este parámetro (Yang & Yeh, 1993). Con bajas presiones selectivas, la dispersión de las semillas es muy efectiva en la reducción de las diferencias entre poblaciones (Antonovics, 1968), y como es muy posible que exista un flujo de semillas entre las diferentes localidades gracias a la acción humana, no siendo ajeno a este hecho el que los chirimoyos crezcan de forma *natural* en los bordes de los caminos (Guzmán, 1951), los valores de G_{ST} podrían ser explicados.

El valor de G_{ST} en los chirimoyos agrupados por procedencias es de 0.223, más del doble del encontrado en los cultivares de las expediciones, y similar al de bastantes categorías de especies (tabla IV.2). En las plantas cultivadas se ha puesto de manifiesto que este parámetro aumenta con respecto al que poseen las especies silvestres progenitoras del cultivo (Doebley, 1990), en otras especies del género *Rhus* también se ha evidenciado que la combinación de efecto fundador, aislamiento y hábito clonal explican valores relativamente altos de G_{ST} (Sherman-Broyles et al., 1992).

En general cabe pensar que la distribución de ciertos cultivares a otras

regiones (fuera de la región de origen de la especie) ha supuesto un cambio en la estructuración de la diversidad, aumentando los componentes inter-grupales (las diferencias entre países de procedencia), pero sin haberse producido una erosión manifiesta de los recursos genéticos de la especie.

Heterocigosidad observada (Ho)

Otra medida interesante es la heterocigosidad observada (valor que se obtiene a partir del número de loci heterocigotos por cultivar). La H_o no presenta grandes diferencias entre procedencias (figura 3.32), con una media para los cv. de chirimoyo de 3.53 loci heterocigotos en los 22 genes contabilizados.

Únicamente cabe destacar a la procedencia USA que presenta un número de loci heterocigotos por encima de la media, aunque no de forma significativa, cosa lógica pues esta procedencia es junto con Perú la que más variantes alélicas presenta y en tan sólo 10 cv. analizados.

Chile, por el contrario, es la procedencia que presenta unos cultivares con menor número de loci heterocigotos ($H_o = 0.105$), esto es, únicamente casi el 11% de los loci isoenzimáticos aparecen como heterocigotos. Este mínimo es fácilmente explicable debido a la presencia de cv. con todos sus loci homocigotos (al menos los analizados). Es el caso de Concha, Concha Lisa y Azapa-II que presentan idéntico genotipo y $H_o = 0$, lo que implica una subestima de la heterocigosidad en esta procedencia. Si no se consideran los cultivares *repetidos* el valor de estos parámetros sería similar al del resto de la colección.

El cultivar *típico o medio* de chirimoyo presenta (figura 3.37) el 17% de sus genes en forma heterocigota, esto es, entre tres y cuatro loci isoenzimáticos heterocigotos en los 22 estudiados. El intervalo de variación va desde 0 loci heterocigotos a los 8 que presenta el cultivar español Pinchudo.

Esta media de 3-4 loci heterocigotos contrasta con la media de 9 loci heterocigotos que presentan las atemoyas ($H_o = 0.409$), prueba del origen híbrido de estos cultivares.

Aunque, a priori, las isoenzimas no pueden ser usadas para prever el vigor híbrido (Brunel, 1985) podría ser interesante realizar estudios futuros acerca de la relación entre diversos parámetros de variabilidad (como H_o) y

determinadas características agronómicas como el vigor. Quizás sea interesante y revelador el hecho de que los frutos de las atemoyas sean significativamente mayores que los de chirimoya o los de *A. squamosa*. Aunque hay una gran variabilidad en el peso del fruto, habitualmente el fruto del chirimoyo pesa una media de 275 g. (Calzada et al., 1973), la atemoya entre 300 y 500 g. (George & Nissen, 1985) y siendo el fruto de la *A. squamosa* de mucho menor tamaño (Fairchild, 1990).

4.5 RELACIÓN ENTRE DATOS ISOENZIMÁTICOS Y AGRONÓMICOS

La evaluación de características agronómicas suele ser costosa tanto en recursos económicos como en tiempo, por ello la existencia de relaciones entre marcadores moleculares y caracteres de interés agronómico tienen un claro interés en la mejora (Tersac et al., 1994).

En chirimoyos y atemoyos los dos tipos de datos aparecen correlacionados con una $r = 0.460$, con valor que puede considerarse bastante elevado, puesto como reconocen Heun et al. (1994) los valores de correlación entre marcadores moleculares (como isoenzimas y RFLPs) presentan valores bajos o moderados. Además el tipo de datos morfológicos (continuos o en "estados" ordenados), así como su transformación y elección tan solo muestran un débil efecto en el valor de la correlación (Beer et al., 1993).

En avena, Beer et al. (1993) encuentran que el estadístico de Mantel calculado para las isoenzimas y RFLPs con los caracteres morfológicos presenta un valor menor de 0.35, lo que induce a pensar en unas relaciones débiles o no lineales. Otros autores han encontrado también asociaciones entre determinados alelos y ciertas características morfológicas, asociación que se produce más intensamente en las especies endogámicas (Price et al., 1984).

Sin embargo esta relación no se ha encontrado en múltiples ocasiones como en el caso del maíz (Lefort-Busson et al., 1991), *Stephanomeria* (Gottlieb, 1975), *Thypha latifolia* (Mashburn et al., 1978), *Capsicum* (Jensen et al., 1979), *Hordeum* (Giles, 1984), *Amarathus* (Jain et al., 1980), soja (Perry et al., 1991), etc.

Conociendo la relación existente entre los datos isoenzimáticos y los agronómicos se ha llevado a cabo un análisis de regresión múltiple para determinar, en un sentido amplio, los marcadores que explican la variabilidad

fenotípica encontrada en los caracteres cuantitativos. Este tipo de análisis es en cierto sentido parecido al utilizado para mapear QTL (loci para caracteres cuantitativos). Aunque mediante isoenzimas (y RFLPs) se han mapeado QTLs en tomate, avena, soja, maíz, etc. (Nienhuis et al., 1987; Osborn et al., 1987; Paterson et al., 1991; Stuber, 1992), es necesario un mapa de ligamiento muy completo, que no siempre proporcionan los isoenzimas (Dudley, 1993).

Se han desarrollado varios métodos para identificar QTLs que están basados en el estudio de progenies de cruzamientos dirigidos (Dudley, 1993), mediante:

- estudios de regresión para cada alelo (Zehr et al., 1992)
- análisis de máxima verosimilitud (Lander & Botstein, 1989)
- ANOVAs (Stuber et al., 1992)
- estimación simultánea de la asociación a varios marcadores moleculares mediante un análisis de correlación múltiple por pasos (Cowen, 1989).

Cuando se realizan estos estudios en varios cruces hay que tener en cuenta diferentes problemas que pueden ocultar los resultados, como la segregación del QTL y el marcador, diferente fase de ligamiento, diferentes genotipos tanto en el QTL como en el marcador, epistasis en los QTL, etc.

Toda esta problemática es aplicable al caso de las regresiones realizadas en chirimoyo, siendo la consideración más importante el que la "población" de cultivares no es una progenie de un cruzamiento dirigido. Esto implica que no se puedan detectar QTL de forma significativa, que varios alelos de un mismo gen expliquen diferentes porcentajes de la varianza fenotípica. Sin embargo estos resultados pueden proporcionar indicaciones acerca de los marcadores a utilizar en un cruzamiento para mapear QTL. Además, por todo ello se debería esperar que las correlaciones no fuesen significativas o que produjeran bajos porcentajes de varianza explicada.

Sin embargo, de los 16 caracteres agronómicos que han podido ser estudiados, 12 (el 75%) muestran rectas de regresión significativas. El rango de R^2 va desde 0.755 en el porcentaje de piel en el fruto a 0.281 en la variable resistencia al penetrómetro. Estos datos son sorprendentes a todas luces y aunque algunos puedan ponerse en duda debido a probabilidades cercanas a 0.05, la mayoría de las rectas de regresión son muy significativas y altamente significativas (valores de $p < 0.01$ y $p < 0.001$).

Edwards et al. (1987) estudian QTLs en maíz mediante 17 a 20 marcadores isoenzimáticos en poblaciones F_2 compuestas por más de 1800 plantas, encontrado asociaciones altamente significativas y con R^2 en el intervalo 0.08 a 0.40, y el marcador que más varianza explica muestra un valor de $R^2 = 0.163$, mientras que en chirimoyo la variabilidad fenotípica en el porcentaje de piel en el fruto, por ejemplo, es explicada en más un 26% por Idh-2. En Brassica, por ejemplo, Kennard et al. (1994) estudiando QTLs mediante RFLPs encuentran regresiones con R^2 de hasta el 60.1% y marcadores individuales que explican por si mismos el 42.7% de la varianza.

Estas altas varianzas explicadas pueden ser entendidas suponiendo que los caracteres morfológicos en chirimoyo presentan un alto desequilibrio de ligamiento con determinados marcadores isoenzimáticos.

Por el contrario no se han encontrado relaciones significativas entre la heterocigosidad observada y estos mismos caracteres cuantitativos, mediante test de regresión lineal simple. Este hecho contrasta con el caso, por ejemplo, del maíz, donde aparecen relaciones de la heterocigosidad con diferentes variables agronómicas (Stuber, 1990), o en *Dactylis glomerata* donde Tomekpe & Lumaret (1991) encuentran asociación entre Ho y el vigor.

Capítulo 5
Conclusiones

□ **CAPÍTULO QUINTO** □

5. CONCLUSIONES

1. Se ha determinado el control genético para trece sistemas isoenzimáticos, de los que diez muestran variabilidad y pueden ser utilizados en identificación varietal.
2. Se han caracterizado 206 cultivares de chirimoyo y cuatro de atemoyo mediante el genotipado para 22 loci isoenzimáticos. Del total de cultivares 10 presentan genotipos idénticos a los de otros cultivares.
3. Se ha construido un mapa de ligamiento en chirimoyo que presenta 6 grupos de ligamientos que incluyen 15 loci, determinando las distancias entre ellos.
4. Las técnicas isoenzimáticas permiten discriminar los cultivares de chirimoya de las atemoyas.
5. Los procedimientos de agrupación empleados (análisis de cluster, análisis factorial de correspondencias y análisis discriminante) ponen de manifiesto una distribución particular de las diferencias genéticas, revelando que el país de procedencia es el principal factor implicado.
6. La colección de cultivares presenta un alto grado de diversidad genética. Ésta no parece haber disminuido por el proceso de domesticación y la expansión del cultivo.
7. Las zonas de origen, Ecuador y Perú, presentan altos valores de diversidad,

justificando su calificación de centros primarios de diversidad.

8. La distribución de ciertos cultivares a otras regiones (fuera del área de origen de la especie) ha supuesto un cambio en la estructuración de la diversidad, aumentando los componentes intergrupales, pero sin haberse producido una erosión manifiesta de los recursos genéticos de la especie.

9. Se ha puesto de manifiesto una alta asociación entre los genotipos para los loci isoenzimáticos y ciertas características agronómicas, lo que puede utilizarse en la mejora de este cultivo.

Capítulo 6
Referencias Bibliográficas



□ Capítulo sexto □

6. REFERENCIAS

- ABE, J., GUAN, G.P. & SHIMAMOTO, Y. (1993). Linkage maps for nine isozyme and four marker loci in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Euphytica* 66: 117-126
- ACEVEDO, A. & SCANDALIOS, J.G. (1990). Expression of the catalase and superoxide dismutase genes in mature pollen in maize. *Theor. Appl. Genet.* 80: 705-711
- ALONSO-BLANCO, C., GOICOECHEA, P.G., ROCA, A., ÁLVAREZ, E. & GIRALDEZ, R. (1994). Genetic mapping of citological and isozyme markers on chromosomes 1R, 3R, 4R and 6R of rye. *Theor. Appl. Genet.* 88: 208-214
- ANDERSSON, E., EKBERG, I. & ERIKSSON, G. (1969). A summary of meiotic investigations in conifers. *Studia Forestalia Suecica* 70: 1-19
- ANDREWS, A.T. (1989). *Electrophoresis. Theory, Techniques, and biochemical and clinical applications*. Oxford University Press. New York
- ANTONOVICS, J. (1968). Evolution in closely adjacent plant populations VI. Manifold effects of gene flow. *Heredity* 23: 507-524
- ARULSEKAR, S. & PARFITT, D.E. (1986). Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio, and fig. *HortScience* 21: 928-933
- ASINS, M.J. & CARBONELL, E.A. (1989). Distribution of genetic variability in a durum wheat world collection. *Theor. Appl. Genet.* 77: 287-294
- BAILEY, N.J.T. (1961). *Introduction to mathematical theory of linkage*. Oxford University Press. London
- BAKKER, M.E. & GERRITSEN, A.F. (1992). Oil and mucilage cells in *Annona* (Annonaceae) and their systematic significance. *Blumea* 36: 411-438
- BALAKRISHNAN, V. & SANGHVI, L.D. (1968). Distance between populations on the basis of attribute data. *Biometrics* 24: 859-865
- BARRET, J.W., CHELIAK, W.M. & KNOWLES, P.H. (1987). Variation in the PGI/AAT linkage group between populations of black spruce. *Can J. For. Res.* 17: 756-758
- BAYLEY, L.H. (1914). *The standard cyclopedia of horticulture*. Vol II. Macmillan Co. New York

- BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. (1971). Localization of superoxide dismutase on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-268
- BECKMAN, J.S. (1973). Population studies in northern Sweden. VI. Polymorphism of superoxide dismutase. *Hereditas* 73: 305-310
- BEER, S.C., GOFFREDA, J., PHILLIPS, T.D., MURPHY, J.P. & SORRELLS, M.E. (1993). Assessment of Genetic Variation in *Avena sterilis* using morphological Traits, Isozymes, and RFLPs. *Crop Science* 33: 1386-1393
- BENNACEUR, M., LANAUD, C., CHEVALIER, M.H. & BOUNAGA, N. (1991). Genetic diversity of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from Algeria revealed by enzyme markers. *Plant Breeding*.107: 56-69
- BENZECRI, J.P. (1979). Distance distributionelle et metrique chi-deux en analyse factorielle des correspondences. *Laboratoire de Statistique Math. Paris.*
- BMDP STATISTICAL SOFTWARE MANUAL. (1990). University of California Press.
- BOWDEN, W.M. (1948). Chromosome numbers in the Annonaceae. *Amer. J. Bot.* 35: 377-381
- BRETÓ, M.P., ASINS, M.J. & CARBONELL, E.A. (1993). Genetic variability in *Lycopersicon* species and their genetic relationships. *Theor. Appl. Genet.* 86: 113-120
- BROWN, A.H.D. & WEIR, B.S. (1983). Measuring genetic variability in plant polulations. En *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A* (Tanksley, S.D. & Orton, T.J. Eds.) :219-239.
- BUENO SÁNCHEZ, M. (1992). *Estudio pomológico de ina colección de cultivares de chirimoya*. Estación Experimental "La Mayora".
- CALZADA, J., BAUTISTA, V., BERMUDEZ, J. & MORAN, M. (1973). Correlaciones y regresiones entre siete características del fruto de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill) en plantaciones comerciales. *Anales Científicos* 11: 27-35
- CAMMAERTS, D. & JACOBS, M. (1983). A study of the polymorphism and the genetic control of the glutamate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci. Lett.* 31: 65-73
- CARDY, B.J., C.W. STUBER & M.M. GOODMAN (1980). Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). *Inst. of Statistics. Mimeograph series* 1317: 1-31
- CAVALLI-SFORZA, L.L. & EDWARDS, A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis models and estimation procedure. *Evolution* 21: 550-570
- CEREZO, M., SOCIAS I COMPANI, R. & ARUS, P. (1989). Identification of almond

- cultivars by pollen isoenzymes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114: 164-169
- CERVANTEZ GOMEZ, M. (1968). El chirimoyo. *Minist. de Agricultura. Public. de Capacitación Agraria*.31: 1-42
- CONCKLE, M.T., HODGSKISS, P.D., NUNNALLY, L.B. & HUNTER, S.C. (1982). *Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual*. General Technical Report PSW-64. USDA. Forest Service Pacific Southwest Forest and Range Experimental Station, Berkeley
- CORPAS, F.J., SANDALIO, L.M., PALMA, J.M., LEIDL, E.O., HERNANDEZ, J.A., SEVILLA, F. & Del RIO, L.A. (1991). Subcellular distribution of superoxide dismutase in leaves of ureide-producing leguminous plants. *Physiol. Plant.*82: 285-291
- COUSINEAU, J.C., ANDERSON, A.K., DAUBENY, H.A. & DONNELLY, D.J. (1993). Characterization of Red Raspberry cultivars and selections using isoenzyme analysis. *HortScience* 28(12): 1185-1186
- COUSINEAU, J.C. & DONNELLY, D.J. (1987). Identification of raspberry cultivars in vivo and in vitro using isoenzyme analysis. *HortScience* 24: 490-492
- COWEN, N.M. (1989). Multiple linear regression analysis of RFLP data sets used in mapping QTLs. En *Development and Application of molecular markers to problems in plant genetics* (Helentjaris, T. & Burr, B. Eds.) Cold Spring Harbor Lab.
- CHANG, T. T. (1985). Principles of genetic conservation. *Iowa States Univ. S. of Research* 59: 325-348
- CHIPPINDALE, P. (1989). A high pH discontinuous buffer system for resolution of isozymes in starch gel electrophoresis. *Stain Technology*.64: 61-64
- De VIENNE, D. & DAMERVAL, C. (1985). Mesures de la divergence génétique. 3. Distances calculées à partir de marqueurs moléculaires. En *Les Distances Génétiques* (Lefort-Buson, M. & De Vienne, D. Eds). INRA. Paris
- De VIENNE, D. (1980). Relation entre la structure et les formes multiples de la glutamate déshydrogénase du pollen de luzerne (*Medicago sativa* L.). *C. R. Acad. Sci. Paris Sér. D* 291: 885-888
- DE CHERISEY, H., BARRENECHE, M.T., JUSUF, M., OUIN, C. & PERNES, J. (1985). Inheritance of some marker genes in *Setaria italica* (L.) P. Beauv. *Theor. Appl. Genet.* 71: 57-60
- DEGANI C. & GOLDRING, A. (1989). Pollen parent effect on outcrossing rate in Hass and Fuerte Avocado plots during fruit development. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 114: 106-111

- DEGANI, CH., GOLDRING, A., GAZIT, S. & LAVI, U. (1986). Genetic selection during the abscission of avocado fruitlets. *HortSci.* 21: 1187-1188
- DEL RIO, L.A. (1986). Superoxido dismutasas: propiedades, localización celular y utilidad en estudios nutricionales de oligoelementos. *Laboratorio* 91: 339-355
- DIEDENHOFEN, U. (1973). *Studies of alcohol dehydrogenase in cultivated sunflowers during morphogenesis.* M.A. thesis, Univ. of Kansas
- DOEBLEY, J.F., GOODMAN, M.M. & STUBER, C.W. (1986). Exceptional genetic divergence of Northern Flint Corn. *Am. J. Bot.* 73: 64-69
- DUDLEY, J.W. (1993). Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Sci.* 33: 660-668
- DOEBLEY, J.F. (1990). Isozyme evidence and the evolution of crop plants. En *Isozymes in Plant Biology* (Soltis, D.E. & Soltis, P.S. Eds.) Chapman & Hall. London
- DURHAM, R.E., LIOU P.C., GMITTER JR., F.G. & MOORE, G.A. (1992). Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in Citrus. *Theor. Appl. Genet.* 86: 417-426
- EDWARDS, M.D., STUBER, C.W. & WENDEL, J.F. (1987). Molecular marker facilitated investigation of quantitative trait loci in maize. I. number, genomic distribution and types of gene action. *Genetics* 116: 113-125
- EICKMEYER, F., PRIMUS-KOPFER, S. & WRICKE, G. (1990). Genetic analysis of isozyme loci in chives (*Allium schoenoprasum* L.). *Plant Breeding* 105: 327-331
- ELLSTRAND, N.C. & LEE, J.M. (1986). Cherimoyas: Past, present...and quite a future in southern California. *California Garden* 77: 12-13
- ELLSTRAND, N.C. & LEE, J.M. (1987a). Cultivar identification of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) using isozyme markers. *Scientia Hortic.* 32: 25-31
- ELLSTRAND, N.C. & LEE, J.M. (1984). Isozymes for cherimoya cultivar identification: A progress report. *Cal.Rare Fr.Growers Newsletter* 16: 8-9
- ELLSTRAND, N.C. & J.M. LEE (1987b). Cherimoya cultivar identification. Part 1. A tale of two pierces. *The Fruit Gardener* 10: 5-7
- ELLSTRAND, N.C., CLEGG, J.M. & KAHN, T.L. (1991). Causes of natural pollination in California cherimoyas: a preliminary report. *California Cherimoya Assoc. Newsl.* Summer: 3-5
- ELLSTRAND, N.C. & CLEGG, J.M. (1990a). Cherimoya cultivar identification. Part IV. What happened to the McPherson?. *Fruit Gardener* April: 6-7
- ELLSTRAND, N. (1991). The case of the confusing cultivars. *California Grower* 15:

42-43

- ELLSTRAND, N. & CLEGG, J.M (1991). Report on cherimoya cultivars. *California Cherimoya Assoc. Newsl.* Winter: 6-7
- ELLSTRAND, N.C. & CLEGG, J.M. (1990b). Cherimoya cultivar identification. Part III. Rediscovering Deliciosa. *Fruit Gardener*. Februa: 7-8
- ERKINE, W. & MUEHLBAUER, F.J. (1991). Allozyme and morphological variability, outcrossing rate and core collection formation in lentil germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 83: 119-125
- ERNST, S.G., KEATHLEY, D.E. & HANOVER, J.W. (1985). Inheritance of isozymes in seed and bud tissues of blue and engelmann spruce. *Genome* 29: 239-246
- FAIRCHILD, D. (1990) Who Knows the Annonas? *Tropical Fruit World* 1(4): 99-103
- FARRÉ, J.M., HERMOSO, J.M. & GONZÁLEZ, M.A. (1976). Ensayos sobre polinización, cuajado y crecimiento del fruto en chirimoya. I. AN. INIA/Ser. Prod. Veg. 6: 63-92
- FARRÉ, J.M. & HERMOSO, J.M. (1987). Informe del viaje de exploración sobre la chirimoya realizado a Ecuador y Perú el 1 de Abril y el 15 de Mayo de 1987. Estación Experimental "La Mayora".
- FARRÉ, J.M. & HERMOSO, J.M. (1985). Informe del viaje de exploración sobre la chirimoya realizado al Perú entre el 22 de Abril y el 1 de Junio de 1985. Estación Experimental "La Mayora".
- FELSENSTEIN, J. (1991). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.4. Univ. of Washington
- FIELDES, M.A. (1988). Relative mobility and activity of leaf MDH in flax (*Linum usitissimum*). Genotrophs and genotypes. *Biochem. Genet.* 26: 261-275
- FIELDES, M.A. & DIXON, B. (1988). Malate dehydrogenase isozymes in Flax genotroph leaves: Differences in apparent molecular weight and charge between and within L and S. *Biochem. Genet.* 26: 249-260
- FOUQUE, A. (1972). Espèces fruitières d'Amérique tropicale. *Fruits* 27: 62-72
- FREELING, M. & SCHWARTZ, D. (1973). Genetic relationship between the multiple alcohol dehydrogenases of maize. *Biochem. Genet.* 8: 27-36
- FREELING, M. (1973). Simultaneous induction by anaerobiosis or 2,4-D of multiple enzymes specified by two unlinked genes: differential Adh-2 - Adh-2 expression in maize. *Mol. Gen. Genet.* 127: 215-

- FRIDOVICH, I. (1986). Superoxide dismutases. En *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. Vol 58 (Meister, A. Ed.) : 61-97. John Wiley & Sons. New York
- FURUYA, Y. & IKEHASHI, H. (1991). Identification of acid phosphatase and esterase loci in *Brassica campestris*. *Jpn. J. Breed.*41: 61-71
- GAUR, P.M. & SLINKARD, A.E. (1990). Genetic control and linkage relations of additional isozyme markers in chick-pea. *Theor. Appl. Genet.*80: 648-656
- GAUR, P.M. & SLINKAR, A.E. (1990). Inheritance and linkage of isozyme coding genes in chickpea. *J. Hered.* 81: 455-461
- GEORGE, A.P. & NISSEN, R.J. (1985). The custard apple. Part 1 - Species, varieties and rootstock selection. *Aust. Horticulture* Octub: 100-111
- GEPTS, P. & BLISS, F.A. (1985). F₁ hybrid weakness in the common bean: differential geographic arigin suggests two gene pools in cultivated common bean. *J. Heredity* 76: 447-450
- GEPTS, P. (1990). Biochemical evidence bearing on the domestication of Phaseolus (Fabaceae) beans. *Economic Botany*44: 28-38
- GILES, B.E. (1984). A comparison between quantitative and biochemical variation in the wild barley *Hordeum murinum*. *Evolution* 38: 34-41
- GILLET, E. & HATTEMER, H.H. (1989). Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. *Heredity*63: 135-141
- GLASZMANN, J.C., FAUTRET, A., NOYER, J.L., FELDMANN, P. & LANAUD, C. (1989). Biochemical genetic markers in sugarcane. *Theor. Appl. Genet.*78: 537-543
- GOLDRING, A., GAZIT, S. & DEGANI, C. (1987). Isozyme analysis of mature avocado embryos to determine outcrossing rate in a "Hass" plot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 389-392
- GONZALEZ YUSTE, R. (1991). *Estudio de material vegetal en el banco de germoplasma de chirimoyo de la Estación Experimental "La Mayora"*. E.U.I.T.A. Sevilla
- GONZÁLEZ YUSTE, R. (1991). *Estudio de material vegetal en el banco de germoplasma de chirimoyo de la Estación Experimental "La Mayora"*. EUITA Sevilla
- GONZÁLEZ, R. (1991). *Estudios sobre la polinización natural del chirimoyo*. La Mayora. Trabajo fin de Carrera.
- GOODMAN, M.M. & STUBER, C.W. (1983). Maize. En *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, Part B (Tanksley, S.D. & Orton, T.J. Eds.). Elsevier. Amsterdam
- GOODMAN, M.M., STUBER, C.W., LEE, C.N. & JOHNSON, F.M. (1980). Genetic

- control of MDH isozymes in maize. *Genetics*.94: 153-168
- GOTTLIEB, L.D. (1981). Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog. Phytochem.* 7: 1-46
- GOTTLIEB, L.D. (1975). Allelic diversity in the outcrossing annual plant *Stephanomeria exigua* spp *carotifera* (Compositae). *Evolution* 29: 213-225
- GOTTLIEB, L.D. (1981). Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog. Phytochem.*.7: 1-46
- GRACE, S.C. (1990). Phylogenetic distribution of superoxide dismutase supports an endosymbiotic origin for chloroplasts and mitochondria. *Life Sciences*.47: 1875-1886
- GRANT, V. (1975). *Genetics of flowering plants*. Columbia University Press. New York
- GUIRADO SÁNCHEZ, E. (1992). *Polinización artificial del chirimoyo*. Caja Rural de Granada.
- GUZMAN, V.L. (1951). Informe del viaje de exploración sobre la chirimoya y otros frutos subtropicales. Otras exploraciones sobre la chirimoya. *C.Nac.de Invest.y Exper. Agrícola La Molina. Lima. Perú*.71: 1-25
- HAMRICK, J.L. & MURAWSKI, D.A. (1991). Levels of allozyme diversity in population of uncommon neotropical tree species. *J. Tropical Ecology*.7: 395-399
- HAMRICK, J.L. & GODT, M.J. (1990). Allozyme diversity in plant species. En *Plant population genetic, Breeding, and genetic resources* (Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. & Weir, B.S.). Sinauer Inc. Sunderland MA
- HAMRICK, J.L., LINHARD, Y.B. & MITTON, J.B. (1979). Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10: 173-200
- HANCOCK, A.M. & A.F. IEZZONI (1988). Malate dehydrogenase isoenzyme patterns in seven *Prunus* species. *HortScience* 23: 381-383
- HANDA, T. & I. KAJIURA (1991). Isozyme analysis of yamamomo (*Myrica rubra* Sieb et Zucc) cultivars. *Jpn. J. Breed.* 41: 203-209
- HARRY, D.E. & KIMMERER, T.W. (1991). Molecular genetics and physiology of alcohol deshydrogenase in woody plants. *Forest Ecology and Management*.43: 251-272
- HARRY, D.E. (1983). Identification of a locus modifying the electrophoretic mobility of malate dehydrogenase isozymes in incense-cedar (*Calocedrus decurrens*), and its implications for population studies. *Biochem. Genet.* 21: 417-434
- HART, G.E. (1970). Evidence for triplicate genes for alcohol dehydrogenase in

- hexaploid wheat. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 66: 1136-1141
- HART, G.E. (1984). Biochemical loci of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*, $2n = 42$, Genomes AABBDD). En *Genetic maps*. Vol. 3: 484-490 (O'Brien, S.J. Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- HARTMANN, T., NAGEL, M. & ILERT, H.L. (1973). Organspezifisch multiple formen der glutamatedehydrogenase in *Medicago sativa*. *Planta* 111: 119-128
- HAUAGGE, R., D.E. KESTER, S. ARULSEKAR, D.E. PARFITT & L. LIU (1987). Isozyme variation among california almond cultivars: II. Cultivar characterization and origins. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 693-698
- HEEMSTRA, M.J. van, L.P. BRUEDERLE & N. VORSA (1991). Inheritance and linkage of thirteen polymorphic isozyme loci in diploid blueberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 89-94
- HERMOSO, J.M., SORIA, J.T., GONZÁLEZ, J.A. & FARRÉ, J.M. (1990). Estudio sobre la polinización natural del chirimoyo. Influencia de la plantación intercalar de maíz. *Actas de Horticultura* 6: 218-223.
- HEUM, M., MURPHY J.P. & PHILLIPS, T.D. (1994). A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. *Theor. Appl. Genet.* 87: 689-696
- HORNAZA, J.I. & HERRERO, M. (1992). Pollen selection. *Theor. Appl. Genet.* 83: 663-672
- HUANG, A.H.C., LIU, K.D.F. & YOULE, R.J. (1976). Organelle-specific isozymes of Aspartate- α -Ketoglutarate transaminase in spinach leaves. *Plant Physiol.* 58: 110-113
- HUANG, H., DANE, F. & NORTON, J.D. (1994). Allozyme diversity in Chinese, Seguin and American chestnut (*Castanea* spp.). *Theor. Appl. Genet.* 88: 981-985
- HUBERT, L.J. (1987). *Assignment methods in combinatorial data analysis*. Marcel Dekker. New York.
- HUNTER, R.L. & MARKERT, C.L. (1957). Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1294-1295
- IBAÑEZ, M.A., DI RENZO, M.A. & POVERENE, M.M. (1993). Isozyme diversity among and within peach groups: freestone, clingstone and nectarines. *Scientia Horticulturae* 53: 281-288
- IBAR, A. (1979). *Aguacate, chirimoyo, mango y papaya*. Aedos. Madrid
- JAIN, S.K., WU, L. & VAIDYA, K.R. (1980). Levels of morphological and allozyme

- variation in Indian amaranths: a striking contrast. *J. Hered.* 71: 283-285
- JARRET, R.L. & R.E. LITZ (1986). Enzyme polymorphism in *Musa acuminata* Colla. *J. Hered.* 77: 183-188
- JENNRICH, R. & SAMPSON, P. (1990). Stepwise discriminant analysis. *BMDP Statistical Software Manual* :339-358
- JENSEN, R.J., MCLEOD, M.J., ESHBAUGH, W.H. & GUTTMAN, S.I. (1979). Numerical taxonomic analyses of allozymic variation in *Capsicum* (Solanaceae). *Taxon* 28: 315-327
- KAHLER, A.L. & LAY, C.L. (1985). Genetics of electrophoretic variants in the annual sunflower. *J. Hered.* 76: 335-340
- KAHN, T.L., ELLSTRAND, N.C. & ARPAIA, M.L. (1991). Current research on the cherimoya cultivars and flowering behavior in California. *Fruit Gardener*. June: 8-11
- KAMBHAMPATI, S. & RAI, K.S. (1991). Patterns of morphometric and allozyme variation in *Aedes albopictus*. *Entomol. exp. appl.* 60: 193-201
- KAZAN, K., MUEHLBAUER, F.S. & WEEDEN, N.F. (1991). Duplication of aldolase and esterase loci in *Cicer* (*Cicer arietinum* L.). *J. Hered.* 82: 58-63
- KAZAN, K., MUEHLBAUER, F.S., WEEDEN N.F., LADIZINSKY, G. (1993). Inheritance and linkage relationships of morphological and isozyme loci in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 86: 417-426
- KENNARD, W.C., SLOCUM, M.K., FIGDORE, S.S. & OSBORN, T.C. (1994). Genetic analysis of morphological variation in *Brassica oleracea* using molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 721-732
- KENNORD, W.C., POETTER, R., DIJKHUIZEN, A., MEGLIA, V., STAUB, J.E. & HARVEY, M.J. (1994). Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. *Theor. Appl. Genet.* 89: 42-48
- KESSLER, P.A. (1987). Some interesting distribution patterns in Annonaceae. *Annonaceae Newsletter* 6:
- KING, J.L. & OHTA, T. (1975). Polyallelic mutational equilibria. *Genetics* 79: 681-691
- KNERR, L.D., STAUB, J.E., HOLDER, D.J. & MAY, B.P. (1989). Genetic diversity in *Cucumis sativa* L. assessed by variation at 18 allozyme coding loci. *Theor. Appl. Genet.* 78: 119-128
- KOENIG, R. & GEPTS, P. (1989). segregation and linkage of genes for seed proteins, isozymes, and morphological traits in comon bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Hered.* 80:

455-459

- KRUEGER, S.K. & KNAPP, S.J. (1990). Genetics of allozyme variation in *Cuphea laminuligera* and *C. lutea*. *J. Hered.* 81: 351-358
- KUMAR, L.S.S. & RANADIVE, K. (1941). A cytological study of the genus *Annona*. *J. Univ. Bombay* 10: 1-35
- KURCZYNSKI, T.W. (1970). Generalized distance and discrete variables. *Biometrics* 26: 525-534
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 222: 680-685
- LANDER, E.S. & BOTSTEIN, D. (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199
- LATTER, B.D.H. (1973). Measures of genetic distance between individuals and populations. En *Genetic Structure of Population* (Morton, N.E. Ed.) : 27-37
- LATTER, B.D.H. (1972). The island model of population differentiation: a general solution. *Genetics* 73: 147-157
- LEBERG, P.L. (1992). Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution* 46: 477-494
- LEE, J.M. & ELLSTRAND, N.C. (1987). Inheritance and linkage of isozymes in the cherimoya. *J.Hered.*78: 383-387
- LEFORD-BUSON, M., LAVERGNE, V., DAUDIN, J.J., CHARCOSSET, A., SAMPOUX, J.P. & GA (1991). Genetic variability among populations of maize germplasm. 2. Enzymatic polymorphism and its relationship to quantitative trait diversity. *Maydica* 36: 237-246
- LEWANDOWSKI, A. & L. MEJNARTOWICZ (1991). Linkage analysis of allozyme loci in polish larch (*Larix decidua* subsp. *polonica* (Racib.) (Domin)). *Hereditas* 114: 107-109
- LI, W.H. (1981). Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*78: 1085-1089
- LINHART, Y.B., DAVIS, M.L. & MITTON, J.B. (1981). Genetic control of allozymes of shikimate dehydrogenase in ponderosa pine. *Biochem. Genet.*19: 641-646
- LIPPITT, B. & FRIDOVICH, I. (1973). Tetrazolium oxidase and superoxide dismutase: evidence for identity. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 738-741
- LOOMIS, W.D. (1974). Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzymology*.31: 528-544

- LOOMIS, W.D. (1967). Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes. *Methods in Enzymology*.13: 555-563
- LOUKAS, M. & KRIMBAS, C.B. (1983). Hystory of olive cultivars based on their genetic distances. *Journal of Horticultural Science*.58: 121-127
- LOULAKAKIS, K.A. & ROUBELAKIS-ANGELAKIS, A. (1991). Plant NAD(H)-glutamate dehydrogenase consists of two subunit polypeptides and their participation in seven isoenzymes occurs in an ordered ratio. *Plant Physiol*..97: 104-111
- LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*.15: 65-95
- MANCINI, R., DE PACE, C. SCARASCIA MUGNOZZA, G.T., DELRE, V. & VITTORI, D. (1989). Isozyme gene markers in *Vicia faba* L.. *Theor. Appl. Genet.* 77: 657-667
- MANCINI, R., DE PACE, C., SCARASCIA MUGNOZZA, G.T., DELRE, V. & VITTORI, D. (1989). Isozyme gene markers in *Vicia faba* L.. *Theor. Appl. Genet.*..77: 657-667
- MANTEL, N.A. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220
- MANZANO, M. (1994). *Cálculo del índice de alogamia en chirimoyo (Annona cherimola Mill) mediante el análisis de isoenzimas*. Memoria de licenciatura. Universidad de Granada.
- MANZANO, M., PERFECTTI, F. & PASCUAL, L. (1994). Cálculo del índice de alogamia en chirimoyo mediante el análisis de isoenzimas. *XXIX Jornadas de genética luso-españolas*
- MARGALEF, R. (1986). *Ecología*. Editorial Omega. Barcelona
- MARKERT, C.L. & MOLLER, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species-specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 45: 753-763
- MARQUARD, R.D. & SKORPENSKE, R.G. (1989). Expression of heritable biochemical markers from various pecan tissues. *Euphytica*.42: 65-70
- MARTÍN MORALES, L. (1993). *Descripción pomológica y análisis de componentes del fruto en una colección de cultivares de chirimoya (Annona cherimola Mill)*. Estación Experimental "La Mayora".
- MASHBURN, S.J., SHARITZ, R.R. & SMITH, M.H. (1978). Genetic variation among *Typha* populations of the Southeastern United States. *Evolution* 32: 681-685

- MATHER, K. (1951). *The measurement of linkage in heredity*. Methuen and Co. London
- MCCOMMAS, S.A. & BRYANT, E.H. (1990). Loss of electrophoretic variation in serially bottlenecked population. *Heredity* 64: 315-321
- McCORD, J.M. (1979). Superoxide dismutases: occurrence, structure, function, and evolution: *isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*
- MILLAR, C.I. (1985). Inheritance of allozyme variants in bishop pine (*Pinus muricata* D. Don). *Biochem Genet.* 23: 933-945
- MOORE, G.A. & CASTLE, W.S. (1988) Morphological and isoenzymic analysis of open-pollinated citrus rootstock populations. *J. Hered.* 79: 59-63
- MORAN, A., ENGELMAN, L., STEPHEN, E. & FITZGERALD, G. (1990). Correspondence analysis. *BMDP Statistical Software Manual* :633-701
- MORDEN, C.W., DOEBLEY, J.F. & SCHERT, K.F. (1989). Allozyme variation in old world races of sorghum bicolor (Poaceae). *Amer. J. Bot.* 76: 247-255
- MORDEN, C.W., DOEBLEY, J.F. & SCHERTZ, K.F. (1987). *A manual of techniques for starch gel electrophoresis of Sorghum isozymes*. Texas Agric. Expt. Sta. Misc. Publ. Nº 1635. College Station
- MORETTI, J., BROUSSIER, G. & JAYLE, M.F. (1957). Réalisation technique et premières applications de l'électrophorese sur gel d'almidon. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 39: 593-605
- MOWREY, B.D., WERNER, D.J. & BYRNE, D.H. (1990). Isozyme survey of various species of *Prunus* in the subgenus *Amygdalus*. *Scientia Horticulturae*. 44: 251-260
- MOWREY, B.D. & WERNER, D.J. (1990). Inheritance of isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and shikimate dehydrogenase in peach and peach x almond hybrids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 312-319
- MUEHLBAUER, F.S., WEEDEN, N.F. & HOFFMAN, D.L. (1989). Inheritance and linkage relationships of morphological and isozyme loci in lentil (*Lens miller*). *J. Hered.* 80: 293-303
- MURPHY, R.W., SITES, J.W., BUTH, D.G. & HAUFLE, C.H. (1990). Proteins I: Isozyme electrophoresis. En *Molecular Systematics* (Hillis, D.M. & Moritz, C. Eds.) :45-126. Sinauer Associates. Sunderland, MA (USA)
- NEL, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3321- 3323
- NEL, M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Human Genet.* 41: 225-233

- NEI, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590
- NEI, M. & CHAKRABORTY, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10
- NEI, M. (1972). Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292
- NEI, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York
- NEI, M. (1973). The theory and estimation of genetic distance. En *Genetic Structure of Population (Morton, N.E. Ed.)* :45-54 Honolulu:University Press of Hawaii (USA)
- NEVO, E. (1978). Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theor. Popul. Biol.* 13: 121-177
- NEVO, E. & BEILES, A. (1988). Genetic parallelism of protein polymorphism in nature: ecological test of the neutral theory of molecular evolution. *Biol. J. Linnean Soc.* 35: 229-245
- NEVO, E. & BEILES, A. (1989). Genetic diversity of wild emmer wheat in Israel and Turkey. *Theor. Appl. Genet.* 77: 421-455
- NEWTON, K.J. (1983). Genetics of mitochondrial isozymes. En *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A (Tanksley, S.D. & Orton, T.J.)* :157-174. Elsevier. Amsterdam
- NEWTON, K.J. (1979). A gene which alters the electrophoretic mobilities of maize mitochondrial malate deshidrogenase isozymes. *Genetics* 91 (Suppl.): 88-89
- NIEBLING, C.R., JOHNSON, K. & GERHOLD, H.D. (1987). Electrophoretic analysis of genetic linkage in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Biochem Genet.* 25: 803-814
- NIENHUIS, J., HELENTJARIS, T., SLOCUM, M., RUGGERO, B. & SCHAEFER, A. (1987). Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato. *Crop Sci.* 27: 797-803
- NOONAN, J.C. (1954). Review of investigations on the *Annona* species. *Florida St. Hort. Soc.* LXVI: 205-210
- NORMAN, E.M., RICE, K. & COCHRAN, S. (1992). Reproductive biology of *Asimina parviflora* (Annonaceae). *Bull. Torrey Bot. Club.* 119: 1-5
- O'MALLEY, D., WHEELER, N.C., GURIES, R.P. (1980). *A manual for starch gel electrophoresis*. Staff Paper Series 11. Dept. Forestry, College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin, Madison.
- OSBORN, T.C., ALEXANDER, D.C. & FOBES, J.F. (1987). Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content

- in tomato fruit. *Theor. Appl. Genet.* 73: 350-356
- PARFITT, D.E. & ARULSEKAR, S. (1989). Inheritance and isozyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114: 486-491
- PASCUAL, L., PERFECTTI, F., GUTIERREZ, M. & VARGAS, A.M. (1993). Characterizing isozymes of Spanish cherimoya cultivars. *HortScience* 28: 845-847
- PASCUAL, L., PERFECTTI, F., GARCÍA, F.J., VARGAS, A. & GUTIERREZ, M. (1993). Identificación de cultivares de chirimoyo mediante análisis de isoenzimas. *Actas de Horticultura* 10: 858-863
- PATERSON, A.H., LANDER, E.S., HEWITT, J.D., PATERSON, S., LINCOLN, S.E. & TANKSLEY, S.D. (1991). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete RFLP linkage map. *Nature* 335: 721-726
- PATTY, L.R., LEE, J.M. & ELLSTRAND, N.C. (1988). Interpretation of triose phosphate isomerase isozymes in the cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Biochemical Genetics* 26: 123-130
- PAUL, E.M. & WILLIAMSON, V.M. (1987). Purification and properties of acid phosphatase-1 from nematode resistant tomato cultivar. *Plant Physiol.* 84: 399-403
- PEIRCE, L.C. & BREWBAKER, J.L. (1973). Applications of isozyme analysis in horticultural science. *Hortscience* 8: 17-22
- PERCY, R.G. & WENDEL, J.F. (1990). Allozyme evidence for the origin and diversification of *Gossypium barbadense* L.. *Theor. Appl. Genet.* 79: 529-542
- PERFECTTI, F., PASCUAL, L., GARCÍA, F.J., VARGAS, A. & GUTIERREZ, M. (1993). Relación y agrupamiento de cultivares de chirimoyo en base al análisis de marcadores genéticos. *Actas de Horticultura* 10: 864-869
- PERFECTTI, F. & PASCUAL, L. (1994). Estudio de la diversidad genética en una colección de cultivares de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.). *XXIX Jornadas de genética luso-españolas*
- PERFECTTI, F. (1992). *Caracterización isoenzimática de cultivares de chirimoyo (Annona cherimola Mill)*. Memoria de licenciatura. universidad de Granada.
- PERRY, M.C., MCINTOSH, M.S. & STONER, A.K. (1991). Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collection: II. allozyme frequencies. *Crop Sci.* 31: 1356-1360.
- PHAM, J.L., GLASZMANN, J.C., SANO, R., BARBIER, P., GHESQUIERE, A. & SECOND, G. (1990). Isozyme markers in rice: genetic analysis and linkage relationships. *Genome* 33: 348-359

- PITTEL, J.A. & CHELIAK, W.M. (1984). Effect of extraction buffers on characterization of isoenzymes from vegetative tissues of five conifer species: a user's manual. *Canadian Forestry Service*: 1-64
- PONTIKIS, C.A., LOUKAS, M. & KOUSOUNIS, G. (1980). The use of biochemical markers to distinguish olive cultivar. *Journal of Horticultural Science*.55: 333-343
- POPENOE, W. (1921). The native home of the cherimoya. *J. Hered.*12: 331-337
- PRAKASH, S., LEWONTIN, R.C. & HUBBY, J.L. (1969). A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural population IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 61: 841-858
- PROCE, S.C., SHUMAKER, K.M., KAHLER, A.L., ALLARD, R.W. & HILL, J.E. (1984). Estimates of population differentiation obtained from enzyme polymorphisms and quantitative characters. *J. Hered.*75: 141-142
- RAJORA, O.P., DANCİK, B.P. & ALEKSIUK, M. (1991). Associations of genes encoding allozymes peroxidase and superoxide dismutase in poplar and spruce species. *Theor. Appl. Genet.* 81: 729-734
- RAMOS DÍAZ, M. (1987). *Descripción pomológica y análisis de componentes del fruto en una colección de cultivares de chirimoya (Annona cherimola Mill)*. EUITA Sevilla
- RANKER, T.A. (1992). Genetic diversity, mating systems, and interpopulation gene flow in neotropical *Hemionitis palmata* L. (Adiantaceae). *Heredity* 69: 175-183
- RATAJCZAK, L., RATAJCZAK, W., KORONIAK, D., PRZYBYLSKA, M. & MAZUROWA, H. (1988). Glutamate dehydrogenase isoenzymes in yellow lupine root nodules. II Subunits composition. *Acta Physiologiae Plantarum*.10: 49-55
- RATAJCZAK, L., PRUS-GLOWACKI, W., RATAJCZAK, W. & LEHMANN, T. (1989). Inmunochemical comparison of the glutamate dehydrogenase isoenzymes in yellow lupin root nodules. *Acta Biochemica Polonica*.36: 285-293
- RAYMOND, D. & WEINSTRaub, L. (1959). Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* 130: 711
- RATAJCZAK, L., MAZUROWA, H., RATAJCZAK, W. & WOZNY, A. (1982). Comparison of Rhizobium and host plant subcellular components from yellow lupine nodules by enzymatic differentiation and electron microscopy. I. Glutamate dehydrogenase and glutamate synthase activity. *Acta Physiologiae Plantarum*.48: 73-79
- ROGERS, J.S. (1972). Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetic, Univ. Texas Publ.* 7213: 145-153

242 Capítulo sexto. Referencias.

- ROGSTAD, S.H., K. WOLFF & B.A. SCHAAL (1991). Geographical variation in *Asimina triloba* Dunal (Annonaceae) revealed by the M13 'DNA fingerprinting' probe. *Amer. J. Bot.* 78: 1391-1396
- ROHLF, F.J. (1992). *NTSYS-pc*. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software
- ROVIRA, M., ALETÀ, N., GERMAIN, E. & ARÚS, P. (1993) Inheritance and linkage relationships of ten isozyme genes in hazelnut. *Theor. Appl. Genet.* 86: 322-328
- RUDING, D. & EKBERG, I. (1978). Linkage studies in *Pinus sylvestris* L. using macrogametophyte allozymes. *Silvae Genet.* 27: 1-12
- SAMUEL, R., PINSKER, W., BALASUBRAMANIAM, S. & MORAWETZ, W. (1991). Allozyme diversity and systematics in Annonaceae - a pilot project. *Pl. Syst. Evol.* 178: 125-134
- SANEWSKI, G.M. (1988) *Growing Custard Apples*. Queensland Department of Primary Industries. Information Series QI87014. Brisbane (Queensland).
- SANGHVI, L.D. (1953). Comparison of genetic and morphological methods for a study of biological differences. *Amer. J. Phys. Anthropol.* 11: 385-404
- SAUER, W. & EHRENDORFER, F. (1984). Notes on the karyosystematics of Annonaceae. *Pl. Syst. Evol.* 146: 47-55
- SAYLOR, L.C. & SMITH, B.W. (1966). Meiotic irregularity in species and interspecific hybrids of *Pinus*. *Am. J. Bot.* 53: 453-468
- SCANDALIOS, J.G. (1974). Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 235-
- SCHROEDER, C.A. (1945). Cherimoya culture in California. *U. California D. of Horticulture. Mimeographed Circular S.* 15: 1-6
- SCHROEDER, C.A. (1951a). Fruit morphology and anatomy of the cherimoya. *Botanical Gazette.* 112: 436-446
- SCHROEDER, C.A. (1951b). Fruits of the Annonas. *University of California, Los Angeles.*: 1-3
- SCHWENNESEN, J., E.A. MIELKE & W.H. WOLFE. (1982). Identification of seedless table grape cultivars and a bud sport with berry isozymes. *HortScience* 17: 366-368
- SERMAN-BROYLES, S.L., GIBSON, J.P., HAMRICK, J.L., BUCHER, M.A. & GIBSON, M.J. (1992). Comparisons of allozyme diversity among rare and widespread *Rhus* species. *Syst. Bot.* 17: 551-559
- SHIELDS, C.R., ORTON, T.J. & STUBER, C.W. (1983). An outline of general resource

- needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. *Isozymes in Plant Genetics and Breeding part A.*: 443-468
- SINGH, A.K., SINGH, J. & SHARMA, S. (1989). Multivariate analysis in relation to genetic improvement in lavender, *Lavandula officinalis* Chaix. *Plant Breeding*.102: 302-305
- SMITH, J.S.C., GOODMAN, M.M. & STUBER, C.W. (1985). Relationships between maize and teosinte of Mexico and Guatemala: numerical analysis of allozyme data. *Economic Botany* 39: 12-24
- SMITH, C. A. B. (1977). A note on genetic distance. *Ann. Human Genet.* 21: 254-276
- SMITH, J.S.C., GOODMAN, M.M. & STUBER, C.W. (1985). Relationships between maize and teosinte of Mexico and Guatemala: numerical analysis of allozyme data. *Economic Botany*.39: 12-24
- SMITHIES, O. (1955). Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.* 61: 629-641
- SMOUSE, P.E., LONG, J.C. & SOKAL, R.R. (1986). Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Syst. Zool.* 35: 627-632
- SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*. Freeman. San Francisco
- SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S. (Eds) (1989). *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press. Portland. OR (USA).
- SOLTIS, D.E., HAUFLER, C.H., DARROW, D.C. & GASTONY, G.S. (1983). Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and staining schedules. *American Fern Journal.* 73:
- SORIA, J.T., HERMOSO, J.M. & FARRÉ, J.M. (1990). Polinización artificial del chirimoyo. *Frutic. Prof.* 35: 15-22
- SORIA, J.T., HERMOSO, J.M. & FARRÉ, J.M. (1993). Estudios sobre la polinización natural de chirimoyo. Efectos de la plantación intercalar de maíz en distintas zonas ecológicas. *Actas de Horticultura* 9: 147-154
- SPIEGEL-ROY, P. (1986). Domestication of fruits trees. En *The origin and domestication of cultivated plant* (Barigozzi, C. Ed.). *Developments in agricultural and managed forest ecology.* 16: 201-211.
- St PIERRE, M.D. & BAYER, R.J. (1991). The impact of domestication on the genetic variability in the orange carrot, cultivated *Daucus carota* ssp. *sativus* and the genetic homogeneity of various cultivars. *Theor. Appl. Genet.*.82: 249-253

- STAUB, J.E., KUPPER, R. S., SCHUMAN, D., WEHNER, T.C. AND MAY, B. (1985). Electrophoretic variation and enzyme storage stability in Cucumber. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110(3): 426-431
- STUBER, C.W. & GOODMAN, M.M. (1983). Inheritance, intracellular localization, and genetic variation of phosphoglucosyltransferase isozymes in maize (*Zea mays* L.). *Biochem. Genet.* 21: 667-689
- STUBER, C.W. (1992). Biochemical and molecular markers in plant breeding. En *Plant Breeding Review* (Janick, J. Edt.). Wiley & Sons. New York
- STUBER, C.W. (1990a) Isozymes as markers for studying and manipulating quantitative traits. En *Isozymes in Plant Biology* (Soltis, D.E. & Soltis, P.S., Eds.). Chapman and Hall. Londres
- STUBER, C.W., LINCOLN, S.E., WOLFF, D.W., HELENTJARIS, T. & LANDER, E.S. (1992). Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132: 823-839
- STUBER, C.W. (1990). Isozymes as markers for studying and manipulating quantitative traits. En *Isozymes in Plant Biology* (Soltis, D.E. & Soltis, P.S. Edt.). Chapman and Hall. London
- SUITER, K.A., WENDEL, J.F. & CASE, J.S. (1990). *Linkage-1*. A computer program for the detection and analysis of genetic linkage. version 3.50
- SUITER, K.A., WENDEL, J.F. & CASE, J.S. (1983). Linkage-1: A PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage. *J. Hered.* 74: 203-204
- SWOFFORD, D.L. & SELANDER, R.B. (1989). *BIOSYS-1, A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics*. Release 1.7. Illinois Natural History Survey
- SZMIDT, A.E. & O. MUONA (1989). Linkage relationships of allozyme loci in *Pinus sylvestris*. *Hereditas* 111: 91-97
- TADMOR, Y., ZAMIR, D. & LADIZINSKY, G. (1987). Genetic mapping of an ancient translocation in the genus *Lens*. *Theor. Appl. Genet.* 73: 883-892
- TANAKA, R. & OKADA, H. (1972). Karyological studies in four species of Annonaceae, a primitive angiosperm. *J. Sci. Hiroshima Univ., ser B., div. 2* 14: 85-105
- TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J. (Eds.) (1983). *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier. Amsterdam

- TANKSLEY, S.D. (1984). Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme-coding genes in pepper, *Capsicum annum*. *Chromosoma* 89: 352-360
- TANKSLEY, S.D. & RICK, C.M. (1980). Isozymic gene linkage map of the tomato: application in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 57: 161-170
- TANKSLEY, S.D. & IGLESIAS-OLIVAS, J. (1984). Inheritance and transfer of multiple-flower character from *Capsicum chinense* into *Capsicum annum*. *Euphytica* 33: 769-777
- TERSAC, M., BLANCHARD, P., BRUNEL, D. & VINCOURT, P. (1994). Relations between heterosis and enzymatic polymorphism in populations of cultivated sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 88: 49-55
- THAKUR, D.R. & SINGH, R.N. (1969). Karyomorphological studies in some *Annona* species. *Indian J. Genet. & Plant Breeding* 2: 285-290
- THAKUR, D.R. & SINGH, R.N. (1967). Pomological description and classification of some *annonas*. *Indian J. Hort.* 24: 11-19
- THOMSON, P.H. (1970). The cherimoya in California. *California Rare Fruits Growers Handbook*: 20-34
- TOMEKPE, K. & R. LUMARET (1991). Association between quantitative traits and allozyme heterozygosity in a tetrasomic species: *Dactylis glomerata*. *Evolution* 45: 359-370
- TOMEKPE, K. & LUMARET, R. (1991). Association between quantitative traits and allozyme heterozygosity in a tetrasomic species: *Dactylis glomerata*. *Evolution*.45: 359-370
- TORRES, A.M., MAU-LASTOVICKA, T., WILLIAMS, T.E. & SOOST, R.K. (1985). Segregation distortion and linkage of Citrus and Poncirus isozyme genes. *J. hered.* 76: 289-294
- TORRES, A.M., T. MAU-LASTOVICKA, V. VITHANAGE & M. SEDGLEY. (1986). Segregation distortion and linkage analysis of hand pollinated avocados. *J. Hered.* 77: 445-450
- TUWAFE, S., KAHLER, A.L. & FERGUSON, M. (1988). Inheritance and geographical distribution of allozyme polymorphisms in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Hered.*79: 170-174
- TORRES, A.M., DIEDENHOFEN, U., BERGH, B.O. & KNIGHT, R.J. (1978). Enzyme polymorphisms as genetic markers in the avocado. *Amer.J.Bot.*65: 134-139
- TORRES, A.M. (1974). Sunflowers alcohol dehydrogenase: Adh-1 genetics and dissociation-recombination. *Biochem. Genet.* 11: 17-24

- TORRES, A.M., SOOST, R.K. & DIEDENHOFEN, U. (1978). Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. *Amer.J.Bot.*:65: 869-881
- TORRES, A.M. (1990) Isozyme analysis of tree fruits. En *Isozymes in Plant Biology* (Soltis, D.E. & Soltis, P.S., Eds.). Chapman and Hall. Londres
- TYSON, H., FIELDS, M.A., CHEUNG, C. & STAROBIN, J. (1985). Isozyme relative mobility (Rm) changes related to leaf position; apparently smooth Rm trends and some implications. *Biochem. Genet.* 23: 641-654
- UCHIDA, K., TSUMURA, Y. & OHBA, K. (1991). Inheritance of isozyme variants in leaf tissues of hinoki, *Chamaecyparis obtusa*, and allozyme diversity of two natural forests. *Japan. J. Breed.*:14: 11-24
- VAILLANCOURT, R.E. & SLINKARD, A.E. (1992). Inheritance of new genetic markers in lentil (*Lens Miller*). *Euphytica* 64: 227-236
- VAILLANCOURT, R.E. & SLINKARD, A.E. (1993). Linkage of morphological and isozyme loci in lentil, *Lens culinaris* L.. *Can. J. Plant Sci.* 73: 917-926
- VALLEJOS, C.E. (1983). Enzyme activity staining. *Enzymes in Plant Genetics and Breeding part A* :
- VANGEYT, J.P.C., E. SMED & M. OLEO (1990). Genetical control and linkage relationships of isozyme markers in sugar beet (*B. vulgaris* L.) 2. NADP- and NAD- specific malate dehydrogenases, 6-P-gluconate dehydrogenase, shikimate dehydrogenase, diaphorase and aconitase. *Theor. Appl. Genet.* 80: 593-601
- VENKATARATNAM, L. & SATYANARAYANASWAMY, G. (1958). Studies on genetic variability in *Annona squamosa* L.. *Indian J. Hort.* 15: 228-238
- VRECERNAR-GADUS, M. & N.C. ELLSTRAND (1984). Independent assortment of four isozyme loci in the Bacon avocado (*Persea americana* Mill.). *Calif.Avoc.Soc.Yrbk* 68: 173-177
- WALKER, J.W. (1972). Chromosome numbers, phylogeny, phytogeography of the Annonaceae and their bearing on the (original) basic chromosome number of angiosperms. *Taxon* 21: 57-65
- WANG, X.R. & SZMIDT, A.E. (1989). *Staining recipes for starch gel electrophoresis.* Swedish University of Agricultural Sciences. Umeå
- WEEDEN, N.F., REISCH, B.L. & MARTENS, M.H.E. (1988). Genetic analysis of isozyme polymorphism in grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 765-769
- WEEDEN, N.F. & LAMBS, R.C. (1987). Genetics and linkage analysis of 19 isozyme loci in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 865-872

- WEIR, B.S. (1990). *Genetic Data Analysis*. Sinauer Associates. Sunderland, MA (USA)
- WEEDEN, N.F. (1983). Plastic isozymes. En *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A* (Tanksley, S.D. & Orton, T.J.) :139-156. Elsevier. Amsterdam
- WEEDEN, N.F. & WENDEL, J.F. (1990) Genetics of plant isozymes. En *Isozymes in Plant Biology* (Soltis, D.E. & Soltis, P.S., Eds.). Chapman and Hall. Londres
- WEEDEN, N.F. & MARX, G.A. (1984). Chromosomal locations of twelve isozyme loci in *Pisum sativum*. *J. Hered.* 75: 365-370
- WEEDEN, N.F. & R.C. LAMB (1985). Identification of apple cultivar by isozyme phenotypes. *J. Amer. Hort. Sci.* 110: 509-515
- WEEDEN, N.F. (1989). Applications of isozymes in plant breeding. *Plant Breeding Reviews*.6: 11-54
- WENDEL, J.F., BRUBAKER, C.L. & PERCIVAL, A.E. (1992). Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of upland cotton. *Amer. J. Bot.* 79: 1291-1310
- WENDEL, J.F. & PARKS, C.R. (1982). Genetic control of isozyme variation in *Camelia japonica* L. *J. Hered.* 73: 197-204
- WENDEL, J.F. & WEEDEN, N.F. (1990) Visualization and interpretation of plant isozymes. En *Isozymes in Plant Biology* (Soltis, D.E. & Soltis, P.S., Eds.). Chapman and Hall. Londres
- WESTER, P.J. (1913). Annonaceus possibilities for the plant breeder. *Philippine Agricultural Review*, Vol. 16, January.
- WESTER, P.J. (1915). Hybridization of annonas. *Philipp Agrie. Rev.* 8: 176-181
- WESTPHAL, L. & WRICKE, G. (1991). Genetic and linkage analysis of isozyme loci in *Daucus carota* L.. *Euphytica* 56: 259-267
- WORKMAN, P.L. & NISWANDER, J.D. (1970). Population studies on southwestern indian tribes. III. Local genetic differentiation in the Papago. *Am. J. Human. Genet.* 22: 24-49
- WRIGHT, S. (1978). *Genetic variability en natural population: Methods. Evolution and the Genetic of Populations vol. 4*
- XIE, C.Y. & KNOWLES, P. (1992). Associations between allozyme phenotypes and soil nutrients in natural population of Jack pine (*Pinus banksiana*). *Biochem. Syst. Ecol.* 20: 179-185
- YNDGAARD, F. & HOSKULDSSON, A. (1985). Electrophoresis: a tool for genebanks. *Plant Genet. Resources-Newsletter* 63: 34-40

248 *Capítulo sexto. Referencias.*

- YU, H. & KIANG, Y.T. (1993).** Inheritance and genetic linkage studies of isozymes in soybean. *J. Hered.* 84: 489-492
- ZAMIR, D. & TADMOR, Y. (1986).** Unequal segregation of nuclear genes in plants. *Bot. Gaz.* 147: 355-358
- ZAMIR, D. & LADIZINSKY, G. (1984).** Genetic of allozyme variants and linkage groups in lentil. *Euphytica* 33: 329-336
- ZEHR, B.E., DUDLEY, J.W., CHOJECKI, J., SAGHAI-MAROOF, M.A. & MOWERS, R.P. (1992).** Use of RFLP markers to search for alleles in a maize population for improvement of an elite hybrid. *Theor. Appl. Genet.* 83: 903-911

Anexos



ANEXO I. CAMBIO DE FASE PARA EL CÁLCULO DEL LIGAMIENTO

Cuando dos cruzamientos (en este caso autofecundaciones) muestran igual fase (acoplamiento o repulsión) no existe en principio ningún problema para agrupar los datos de ambas descendencias. El problema se plantea cuando, aún teniendo iguales genotipos, los genes se encuentran en diferentes fases en los dos individuos.

Dado un individuo heterocigoto para dos genes gen-1: 12 y gen-2: AB, la progenie producida por autofecundación seguirá, en caso de independencia, las proporciones mendelianas 1:2:1:2:4:2:1:2:1, ó, como muestra la tabla A1.1, expresadas en tanto por 1.

TABLA A1.1

		Gen-2		
		AA	AB	BB
Gen-1	11	0.0625	0.125	0.0625
	12	0.125	0.250	0.125
	22	0.0625	0.125	0.625

Sin embargo, en caso de ligamiento a una distancia *r*, tendremos dos casos diferentes. A saber,

* ACOPLAMIENTO

$$\begin{array}{c} \text{gen-1} \quad \text{gen-2} \\ 1 \quad \quad A \\ \hline 2 \quad \quad B \end{array}$$

En este caso los gametos parentales son 1-A y 2-B con frecuencia 0.5 - 0.5r y los recombinantes 1-B y 2-A con frecuencia 0.5r obteniéndose al final la siguiente tabla:

TABLA A1.2

		Gen-2		
		AA	AB	BB
Gen-1	11	0.25r ² -0.5r+0.25	0.5r-0.5r ²	0.25r ²
	12	0.5r-0.5r ²	r ² -r+0.5	0.5r-0.5r ²
	22	0.25r ²	0.5r-0.5r ²	0.25r ² -0.5r+0.25

donde las casillas sombreadas indican las que son fundamentales para el cálculo del ligamiento. Las casillas primera y última con frecuencias 0.25r²-0.5r+0.25 están formadas por la combinación, únicamente, de gametos parentales. Las casillas opuestas, con frecuencias 0.25r², por la combinación exclusiva de gametos recombinantes.

* REPULSIÓN

$$\begin{array}{cc} \text{gen-1} & \text{gen-2} \\ 1 & B \\ \hline 2 & A \end{array}$$

En este caso los gametos parentales son 1-B y 2-A con frecuencia 0.5 - 0.5r y los recombinantes 1-A y 2-B con frecuencia 0.5r, quedando la tabla de progenies como sigue:

TABLA AI.3

		Gen-2		
		AA	AB	BB
Gen-1	11	0.25r ²	0.5r-0.5r ²	0.25r ² -0.5r+0.25
	12	0.5r-0.5r ²	r ² -r+0.5	0.5r-0.5r ²
	22	0.25r ² -0.5r+0.25	0.5r-0.5r ²	0.25r ²

Si se tienen dos progenies derivadas de la autofecundaciones de dos individuos diferentes (uno con la pareja de genes en cuestión en fase de acoplamiento y el otro en repulsión) los datos (las tablas) no pueden ser agrupadas tal cual, pues (aparte de que posiblemente no sean homogéneas) la suma falsearía los resultados, pues se estaría reuniendo las casillas opuestas (sombreadas) que son por las que se puede determinar la fase y el ligamiento.

Para soslayar este problema se puede realizar un cambio de fase, por ejemplo de repulsión a acoplamiento, en una de las progenies. Este cambio no afecta al cálculo de r y p y sitúa a ambos cruzamientos en igual fase y por tanto se pueden agrupar (si el test de homogeneidad no indica lo contrario).

Para realizar el cambio de fase lo único que se hace es cambiar el orden de las casillas en la tabla de tal forma que el segundo gen cambie de orden. Así la tabla AI.III que representa el caso de repulsión puede pasar a acoplamiento de esta forma:

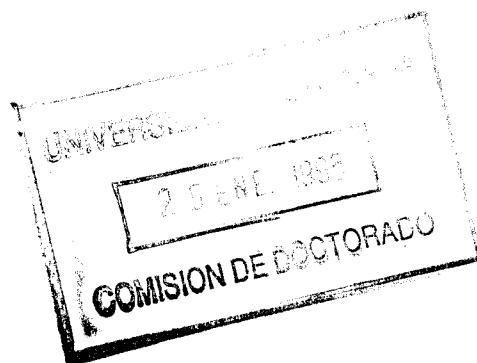
TABLA AI.4

		Gen-2		
		BB	AB	AA
Gen-1	11	0.25r ² -0.5r+0.25	0.5r-0.5r ²	0.25r ²
	12	0.5r-0.5r ²	r ² -r+0.5	0.5r-0.5r ²
	22	0.25r ²	0.5r-0.5r ²	0.25r ² -0.5r+0.25

Como se puede apreciar esta tabla es similar a la que se obtiene en el caso de acoplamiento, y, por tanto, se pueden agrupar sin sumar casillas exclusivamente recombinantes con casillas exclusivamente parentales.

ANEXO II. DIVERSOS PARÁMETROS DE DIVERSIDAD PARA CADA CULTIVAR.

Cultivar	Indicador	Valor	Clase	Valor
AA	9	0.409	31	1.41
AG	10	0.455	32	1.45
AP	8	0.364	30	1.36
JOY	9	0.409	31	1.41
CA	4	0.182	26	1.18
CM	4	0.182	26	1.18
FI	4	0.182	26	1.18
MA	4	0.182	26	1.18
NE	4	0.182	26	1.18
PC	8	0.364	30	1.36
PN	1	0.045	23	1.05
PAZ	2	0.091	24	1.09
BA	5	0.227	27	1.23
BO	5	0.227	27	1.23
BH	4	0.182	26	1.18
CH	4	0.182	26	1.18
CT	7	0.318	29	1.32
LO	3	0.136	25	1.14
PI	4	0.182	26	1.18
SA	5	0.227	27	1.23
SP	6	0.273	28	1.27
WH	6	0.273	28	1.27
B1	2	0.091	24	1.09
B2	6	0.273	28	1.27
B3	3	0.136	25	1.14
BS	2	0.091	24	1.09
CL	3	0.136	25	1.14
CO	0	0	22	1
CN	0	0	22	1
CR	2	0.091	24	1.09
EM	4	0.182	26	1.18
EN	4	0.182	26	1.18
FI	4	0.182	26	1.18
SE	4	0.182	26	1.18
AZ	0	0	22	1
ZA	3	0.136	25	1.14
BRON	3	0.136	25	1.14
BURT	3	0.136	25	1.14
MOS	6	0.273	28	1.27
M4	3	0.136	25	1.14
M5	2	0.091	24	1.09
M7	4	0.182	26	1.18
M10	6	0.273	28	1.27
M14	4	0.182	26	1.18
M16	3	0.136	25	1.14
M17	2	0.091	24	1.09
M19	2	0.091	24	1.09
M23	2	0.091	24	1.09
M26	2	0.091	24	1.09
LPL	2	0.091	24	1.09
LPP	4	0.182	26	1.18
E1	5	0.227	27	1.23
E2	5	0.227	27	1.23



Alfabeto	no. nivel	A. nivel	no. grupo	no. alumnos
E3	5	0.227	27	1.23
E4	5	0.227	27	1.23
E5	4	0.182	26	1.18
E6	4	0.182	26	1.18
E8	2	0.091	24	1.09
E9	3	0.136	26	1.14
E10	3	0.136	26	1.14
E11	5	0.227	27	1.23
E12	3	0.136	26	1.14
E13	5	0.227	27	1.23
E14	3	0.136	26	1.14
E15	4	0.182	26	1.18
E16	4	0.182	26	1.18
E17	4	0.182	26	1.18
E18	3	0.136	26	1.14
E19	4	0.182	26	1.18
E21	3	0.136	26	1.14
E22	6	0.273	28	1.27
E23	3	0.136	26	1.14
E24	5	0.227	27	1.23
E25	3	0.136	26	1.14
E26	3	0.136	26	1.14
E27	3	0.136	26	1.14
E28	2	0.091	24	1.09
E29	5	0.227	27	1.23
E30	2	0.091	24	1.09
E31	2	0.091	24	1.09
E32	4	0.182	26	1.18
E33	5	0.227	27	1.23
E34	3	0.136	26	1.14
E35	3	0.136	26	1.14
E36	1	0.045	23	1.06
E37	2	0.091	24	1.09
E38	4	0.182	26	1.18
E39	5	0.227	27	1.23
P4.10	4	0.182	26	1.18
P604	4	0.182	26	1.18
P606	4	0.182	26	1.18
C1	2	0.091	24	1.09
C2	4	0.182	26	1.18
C3TD	3	0.136	26	1.14
C3TE	4	0.182	26	1.18
C4	6	0.273	28	1.27
CU	4	0.182	26	1.18
PE	6	0.273	28	1.27
SP77	4	0.182	26	1.18
SP78	6	0.273	28	1.27
P1	4	0.182	26	1.18
P2	3	0.136	26	1.14
P3	1	0.045	23	1.06
P4	5	0.227	27	1.23
P5	4	0.182	26	1.18
P6	2	0.091	24	1.09

Cultura	nº loci homocigotos	% loci heterocigotos	nº células	nº células/locus
P7	4	0.182	26	1.18
P8	2	0.091	24	1.09
P10	4	0.182	26	1.18
P11	2	0.091	24	1.09
P12	6	0.273	28	1.27
P13	2	0.091	24	1.09
P15	2	0.091	24	1.09
P17	2	0.091	24	1.09
P18	3	0.136	25	1.14
P19	3	0.136	25	1.14
P20	5	0.227	27	1.23
P22	2	0.091	24	1.09
P23	2	0.091	24	1.09
P25	5	0.227	27	1.23
P26	1	0.045	23	1.05
P27	1	0.045	23	1.05
P29	5	0.227	27	1.23
P33	4	0.182	26	1.18
P34	3	0.136	25	1.14
P35	6	0.273	28	1.27
P38	6	0.273	28	1.27
P39	4	0.182	26	1.18
P40	2	0.091	24	1.09
P41	3	0.136	25	1.14
P42	2	0.091	24	1.09
P43	2	0.091	24	1.09
P44	1	0.045	23	1.05
P45	5	0.227	27	1.23
P46	3	0.136	25	1.14
P47	4	0.182	26	1.18
P48	4	0.182	26	1.18
P49	4	0.182	26	1.18
P50	6	0.273	28	1.27
P51	1	0.045	23	1.05
P52	4	0.182	26	1.18
P53	4	0.182	26	1.18
P54	3	0.136	25	1.14
P55	4	0.182	26	1.18
P56	5	0.227	27	1.23
P57	4	0.182	26	1.18
P58	6	0.273	28	1.27
P59	5	0.227	27	1.23
P60	4	0.182	26	1.18
P61	2	0.091	24	1.09
P62	2	0.091	24	1.09
P64	5	0.227	27	1.23
P66	3	0.136	25	1.14
P67	4	0.182	26	1.18
P68	4	0.182	26	1.18
P69	4	0.182	26	1.18
P71	5	0.227	27	1.23
P72	2	0.091	24	1.09
P73	7	0.318	29	1.32

Cultivar	nº test heterocigotos	% test heterocigotos	nº cariotes	nº cariotes/focus
P74	1	0.045	23	1.05
P75	2	0.091	24	1.09
P76	5	0.227	27	1.23
P77	4	0.182	26	1.18
P78	5	0.227	27	1.23
P79	6	0.273	28	1.27
P80	3	0.136	25	1.14
P81	4	0.182	26	1.18
P83	6	0.273	28	1.27
P84	2	0.091	24	1.09
P85	2	0.091	24	1.09
P86	2	0.091	24	1.09
P87	3	0.136	25	1.14
P88	3	0.136	25	1.14
P89	5	0.227	27	1.23
P90	5	0.227	27	1.23
P91	7	0.318	29	1.32
P92	2	0.091	24	1.09
P93	7	0.318	29	1.32
P94	5	0.227	27	1.23
P95	3	0.136	25	1.14
P96	1	0.045	23	1.05
P102	3	0.136	25	1.14
P104	3	0.136	25	1.14
P105	1	0.045	23	1.05
P106	2	0.091	24	1.09
P107	2	0.091	24	1.09
P108	6	0.273	28	1.27
P114	4	0.182	26	1.18
P115	6	0.273	28	1.27
P116	1	0.045	23	1.05
P117	4	0.182	26	1.18
P118	4	0.182	26	1.18
P119	0	0	22	1
P120	3	0.136	25	1.14
P121	4	0.182	26	1.18
P122	3	0.136	25	1.14
P123	3	0.136	25	1.14
P125	2	0.091	24	1.09
P126	5	0.227	27	1.23
P127	5	0.227	27	1.23
P128	2	0.091	24	1.09
P129	3	0.136	25	1.14
P130	0	0	22	1
P131	3	0.136	25	1.14
P132	3	0.136	25	1.14
P133	7	0.318	29	1.32
P135	3	0.136	25	1.14
P136	1	0.045	23	1.05
P137	4	0.182	26	1.18
P138	3	0.136	25	1.14

ANEXO III. MATRIZ DE DISTANCIAS DE χ^2

Matriz de distancias de χ^2 ($\times 10^2$) entre los cultivares, representados aquí por su abreviatura.

	AA	AP	AG	JOY	CA	CM	FI	MA	ME	PC	PR	PAS	BA	BO	BE	CH	CT	LO	PI	SA	SP	NE	B1	B2	B3	BS	CL	CO	CM	CR	
AA	000																														
AG	082	000																													
AP	277	289	000																												
BA	163	183	321	000																											
CA	365	356	387	332	000																										
CM	365	356	387	332	000	000																									
FI	400	387	396	370	153	153	000																								
MA	396	383	420	370	216	216	200	000																							
ME	392	374	400	361	163	163	163	258	000																						
PC	392	379	365	361	224	224	163	258	163	000																					
PR	416	400	412	392	200	200	216	173	216	271	000																				
PAS	412	396	408	387	163	163	115	200	163	200	183	000																			
BA	346	337	370	306	208	208	265	271	216	265	258	283	000																		
BO	351	361	337	316	289	289	294	327	294	283	311	306	271	000																	
BE	332	337	346	289	327	327	337	321	346	327	351	356	271	208	000																
CH	342	351	346	300	271	271	294	346	245	258	327	316	216	258	306	000															
CT	370	374	342	332	294	294	316	300	294	283	321	337	216	271	231	271	000														
LO	370	361	392	342	141	141	208	200	216	265	183	183	208	265	316	271	294	000													
PI	396	383	392	361	216	216	200	258	163	200	224	245	191	283	311	231	271	245	000												
SA	342	332	374	300	258	258	252	289	245	258	306	271	231	224	231	252	245	258	238	000											
SP	383	374	383	351	258	258	289	306	224	245	258	294	252	277	316	258	277	294	238	289	000										
NE	408	412	379	379	258	258	265	300	252	245	277	294	271	231	316	283	271	271	216	265	238	000									
B1	412	416	370	387	300	300	327	294	306	306	271	316	311	294	306	346	277	289	294	300	289	224	000								
B2	370	374	337	337	321	321	327	316	327	316	316	337	289	183	200	327	238	300	306	252	311	238	216	000							
B3	420	424	383	396	342	342	346	306	346	327	316	337	351	294	306	383	294	332	337	311	332	252	141	200	000						
BS	383	392	365	346	283	283	306	356	245	258	337	327	216	258	306	163	216	283	231	231	258	231	294	283	337	000					
CL	351	361	332	311	283	283	316	337	271	306	294	337	200	231	258	200	231	283	216	245	238	238	271	245	316	200	000				
CO	365	374	374	327	294	294	316	365	258	294	346	337	216	231	283	163	245	283	245	231	271	271	337	283	374	115	200	000			
CM	365	374	374	327	294	294	316	365	258	294	346	337	216	231	283	163	245	283	245	231	271	271	337	283	374	115	200	000	000		
CR	387	396	321	351	306	306	337	356	294	294	316	356	231	258	283	258	216	306	245	271	265	224	216	231	271	183	163	231	231	000	
EM	337	342	300	294	321	321	346	365	316	327	327	365	252	258	258	216	283	311	271	306	294	316	327	271	365	283	183	258	258	258	
EM	342	332	327	300	231	231	265	289	271	289	231	283	216	258	277	231	300	231	224	265	271	289	311	289	351	294	200	294	294	258	
HI	400	387	396	370	153	153	000	200	163	163	216	115	265	294	337	294	316	208	200	252	289	265	327	327	346	306	316	316	316	337	
SE	383	374	379	351	115	115	100	224	163	191	216	115	245	271	321	271	300	183	224	231	271	265	311	311	332	283	294	294	294	316	
AS	365	374	374	327	294	294	316	365	258	294	346	337	216	231	283	163	245	283	245	231	271	271	337	283	374	115	200	000	000	231	
AA	AP	AG	JOY	CA	CM	FI	MA	ME	PC	PR	PAS	BA	BO	BE	CH	CT	LO	PI	SA	SP	NE	B1	B2	B3	BS	CL	CO	CM	CR		

	AA	AP	AG	JOY	CA	CM	FI	MA	ME	PC	FR	PAS	BA	BO	BE	CH	CT	LO	PI	SA	SP	ME	B1	B2	B3	B6	CL	CO	CH	CR
IA	379	370	387	346	141	141	173	238	141	208	200	183	200	245	311	231	277	163	173	200	245	208	265	289	311	231	245	245	245	271
INOM	327	337	289	283	316	316	346	165	316	327	327	365	245	245	271	200	294	306	271	300	289	311	337	283	374	271	163	245	245	245
IBUF	396	379	416	365	141	141	183	208	141	216	183	183	191	311	342	258	289	163	173	271	265	271	316	337	356	271	283	283	283	306
MD8	356	346	387	316	238	238	265	311	200	245	289	283	231	311	321	224	294	289	191	231	216	277	311	321	342	231	245	245	245	271
M4	337	316	383	294	258	258	258	294	231	277	283	271	231	265	277	265	300	245	231	163	321	306	337	283	365	271	283	245	245	306
M5	342	327	404	306	342	342	337	316	327	337	316	356	311	283	283	356	337	321	294	252	321	311	306	258	316	346	294	327	327	316
M7	351	337	416	316	321	321	316	277	306	316	283	337	300	300	300	346	311	311	277	238	289	294	294	283	306	337	294	337	337	316
M10	342	342	379	306	316	316	306	294	294	294	294	337	283	306	316	283	321	306	245	283	300	289	306	294	337	316	245	316	316	294
M14	337	321	356	294	321	321	316	316	306	321	306	346	265	265	252	300	300	311	245	224	306	289	306	245	337	306	216	283	283	271
M16	342	342	379	300	337	337	327	316	327	332	327	365	294	300	277	311	306	337	258	245	321	283	294	271	306	316	231	316	316	283
M17	327	327	420	289	342	342	346	294	346	346	342	374	311	306	289	356	306	321	327	271	342	327	337	294	346	346	327	327	327	346
M19	351	332	412	316	316	316	327	306	294	327	283	327	294	294	294	346	327	306	283	231	294	306	283	271	294	327	283	337	337	306
M23	342	327	404	306	342	342	337	316	327	337	316	356	311	283	283	356	337	321	294	252	321	311	306	258	316	346	294	327	327	316
M25	346	346	400	306	327	327	316	306	327	327	316	356	316	346	327	327	346	346	258	283	337	306	316	327	327	356	283	365	365	327
LFL	387	396	356	379	306	306	337	342	294	316	306	356	258	300	321	283	252	327	252	294	252	258	271	306	316	245	216	271	271	200
LFP	365	346	365	327	224	224	231	265	200	258	224	245	200	277	306	231	265	224	191	216	277	277	327	306	365	258	231	258	258	283
B1	365	356	365	327	252	252	277	306	216	265	277	294	183	289	321	141	245	252	200	245	238	283	342	321	379	183	200	183	183	258
B2	346	337	361	306	183	183	238	271	216	265	258	258	153	289	306	183	258	183	200	245	289	289	342	321	379	231	216	231	231	271
B3	387	396	361	356	346	346	374	374	327	337	346	383	294	283	337	271	283	337	306	327	283	258	283	258	283	245	216	271	271	231
B4	387	396	356	351	258	258	294	300	258	271	258	316	216	265	311	245	224	283	208	283	238	200	258	258	283	216	200	258	258	183
B5	365	374	346	332	231	231	271	283	231	271	231	283	216	258	306	216	271	245	200	283	224	224	245	271	294	245	141	258	258	216
B6	387	392	370	361	252	252	265	252	245	265	216	271	252	283	332	258	300	238	208	311	245	224	238	289	289	283	200	294	294	258
B8	392	396	383	356	265	265	277	300	245	265	271	316	208	294	311	216	265	289	153	289	224	231	289	300	332	216	183	231	231	216
B9	365	374	346	327	245	245	283	306	271	306	258	306	231	245	294	245	283	271	216	271	271	216	271	258	294	271	163	283	283	231
B10	351	361	332	311	283	283	316	337	271	306	294	337	200	231	258	200	231	283	216	245	238	238	271	245	316	200	000	200	200	163
B11	327	316	342	283	231	231	277	306	231	277	294	294	153	252	271	183	245	216	216	231	289	289	342	289	379	216	200	183	183	258
B12	379	370	370	342	216	216	252	277	200	252	216	271	163	271	289	231	252	245	129	245	208	231	265	277	311	231	163	245	245	200
B13	332	342	351	294	208	208	271	245	258	271	238	283	224	258	289	231	258	224	258	277	238	258	283	306	327	283	231	294	294	283
B14	361	370	374	321	252	252	306	294	258	294	289	327	191	316	321	183	231	277	231	294	238	283	327	337	365	216	200	231	231	258
B15	361	370	346	321	224	224	258	306	216	258	265	283	200	258	300	163	258	252	163	245	245	224	283	294	327	200	141	216	216	216
B16	346	356	365	311	200	200	271	258	231	271	258	283	183	283	306	216	245	216	231	283	252	252	283	306	327	245	200	258	258	258
B17	396	383	392	365	183	183	163	216	163	200	173	200	224	258	311	271	294	200	115	238	245	191	258	283	306	271	245	283	283	271
B18	361	370	342	321	245	245	283	306	245	283	258	306	200	271	294	200	258	271	183	271	238	238	271	283	316	231	115	245	245	200
B20	356	346	342	316	191	191	224	277	231	277	224	245	200	258	294	216	289	191	191	231	289	265	311	289	351	258	200	258	258	258
B21	374	365	370	337	173	173	208	265	183	238	208	231	183	245	283	231	265	208	129	200	238	208	265	277	311	231	200	245	245	231
B22	370	361	356	342	224	224	252	265	200	252	208	231	216	245	316	216	289	173	208	258	245	245	265	277	311	245	200	245	245	258
B23	327	337	351	283	252	252	306	294	271	306	289	327	153	245	252	216	200	238	245	258	271	289	327	271	365	216	200	183	183	231
B24	370	379	361	337	271	271	306	294	258	271	258	316	245	238	283	245	224	283	238	271	173	231	252	277	294	245	200	258	258	231
B25	374	383	356	342	258	258	294	306	245	283	258	306	231	245	294	231	258	271	216	271	208	208	231	258	283	231	115	245	245	200
B26	365	356	346	327	216	216	252	277	231	277	216	271	200	271	289	245	277	245	173	245	245	238	265	277	311	271	163	283	283	231
B27	351	361	351	311	208	208	245	294	231	245	252	271	216	216	265	200	271	238	183	224	238	216	271	283	316	231	200	245	245	231
B28	365	374	351	327	258	258	294	300	271	306	258	316	231	252	277	245	238	283	224	245	231	224	258	271	306	245	141	258	258	216
B29	356	346	342	316	245	245	277	300	231	252	245	294</																		

	AA	AP	AG	JOY	CA	CM	FI	MA	ME	PC	PR	PAX	BA	BO	BH	CH	CT	LO	PI	SA	SP	WE	B1	B2	B3	BS	CL	CO	CM	CR
E32	346	356	379	316	283	283	316	283	306	311	258	306	306	311	342	277	351	271	294	321	283	311	283	327	316	337	271	346	346	316
E33	327	337	342	283	216	216	271	300	231	271	294	294	153	252	277	141	224	216	208	231	277	258	316	294	356	183	163	183	183	231
E34	374	365	361	337	173	173	208	265	216	265	208	231	216	283	316	231	300	208	173	245	277	252	300	311	342	271	216	283	283	271
E35	379	387	356	342	289	289	316	342	294	294	321	337	283	277	316	245	277	311	277	265	277	265	294	327	337	258	245	283	283	258
E36	400	383	383	365	224	224	231	265	231	283	224	245	258	342	365	271	321	252	224	283	311	311	356	365	392	316	283	327	327	337
E37	400	392	396	365	208	208	238	289	200	252	238	258	200	306	337	200	289	238	153	271	238	265	321	332	361	216	231	231	231	258
E38	379	370	374	342	191	191	224	277	163	224	224	245	163	258	294	200	252	224	100	216	216	216	277	289	321	200	183	216	216	216
E39	370	361	356	332	208	208	238	289	183	238	238	258	183	271	306	183	265	238	129	231	231	231	289	300	332	216	163	231	231	231
F410	400	400	396	370	183	183	100	224	200	191	245	163	283	294	321	294	300	231	224	271	306	265	311	311	332	306	316	316	316	337
F604	396	396	387	361	306	306	300	321	271	289	294	337	231	245	265	271	238	306	191	271	265	216	277	224	300	245	183	245	245	216
F606	400	387	396	370	153	153	100	224	163	191	216	115	265	294	321	294	300	208	224	252	289	283	311	311	332	306	316	316	316	337
C1	342	351	337	300	271	271	306	327	283	294	283	327	216	183	216	231	245	271	231	224	231	231	258	231	306	231	141	231	231	183
C2	351	361	346	311	224	224	258	306	216	258	265	283	163	216	265	163	231	224	163	216	245	224	283	258	327	163	141	163	163	183
C3TD	351	361	374	311	252	252	306	294	258	294	289	327	153	283	289	183	200	252	231	271	238	283	327	306	365	183	200	183	183	231
C3TE	346	356	346	306	265	265	294	337	245	258	300	316	200	183	238	163	231	265	200	208	216	224	283	258	327	163	141	163	163	183
C4	306	316	346	258	311	311	337	356	294	300	342	356	258	238	258	191	277	311	258	208	265	277	306	283	337	231	183	231	231	245
CU	332	342	346	289	265	265	316	321	271	283	300	337	173	208	216	200	208	265	224	238	216	245	283	258	327	200	141	200	200	183
DE	332	337	379	289	252	252	252	289	231	245	306	294	208	265	283	191	258	252	191	173	289	252	311	289	342	200	231	200	200	258
EP77	342	351	346	300	224	224	283	289	271	283	265	306	208	289	294	200	277	252	224	300	258	283	316	327	356	271	200	283	283	258
EP78	356	361	356	321	224	224	224	277	200	224	271	258	208	245	311	163	265	208	191	238	271	224	300	289	342	200	200	200	200	258
F1	346	356	351	306	231	231	258	316	216	231	294	283	216	258	306	115	271	258	200	238	252	252	316	327	356	200	200	216	216	258
F2	361	370	356	321	252	252	283	327	231	271	289	306	183	200	252	183	216	252	183	200	231	208	271	245	316	141	115	141	141	163
F3	365	374	365	327	183	183	216	283	231	271	258	245	231	283	327	200	294	216	216	245	306	258	316	327	356	245	231	258	258	283
F4	370	361	356	332	208	208	238	289	183	238	238	258	183	271	306	183	265	238	129	231	231	231	289	300	332	216	163	231	231	231
F5	337	327	374	294	283	283	300	332	271	306	327	316	245	311	327	191	316	271	265	245	321	342	379	332	404	245	271	216	216	316
F6	370	379	374	332	245	245	271	327	245	258	306	294	245	306	346	115	306	271	231	289	271	294	356	365	392	216	245	231	231	294
F7	342	351	342	300	231	231	258	316	216	258	294	283	183	245	294	115	245	231	200	216	277	252	316	294	356	163	163	163	163	231
F8	374	383	374	337	245	245	271	327	216	258	306	294	216	294	337	115	271	271	200	258	258	258	327	337	365	163	200	183	183	258
F10	316	327	337	271	271	271	294	346	258	289	327	316	216	238	289	153	271	258	245	216	306	289	346	294	383	200	200	163	163	258
F11	306	316	392	258	283	283	306	327	294	316	337	327	271	283	294	258	306	283	283	183	337	306	327	306	337	271	283	271	271	306
F12	300	311	327	252	289	289	316	337	283	311	321	337	231	238	258	191	277	277	245	216	300	289	316	258	346	231	183	200	200	245
F13	400	408	327	365	306	306	337	356	294	294	316	356	258	327	346	231	271	327	245	327	271	258	258	306	306	216	200	271	271	163
F15	370	379	370	332	200	200	231	294	216	258	271	258	216	294	337	163	283	231	200	258	289	265	327	337	365	216	216	231	231	271
F17	374	383	342	337	311	311	337	374	283	294	342	356	231	231	277	200	231	300	245	258	265	245	294	245	337	115	183	115	115	163
F18	346	356	361	306	289	289	316	356	271	271	321	337	231	245	289	141	283	289	231	271	238	283	337	316	374	200	216	200	200	245
F19	379	370	387	342	183	183	208	277	141	208	245	231	163	271	311	183	252	216	129	200	238	231	300	311	342	183	216	200	200	245
F20	400	392	400	370	271	271	289	321	245	289	306	294	283	306	379	271	311	283	265	294	311	271	342	332	332	294	294	306	306	337
F22	387	396	412	351	245	245	271	316	258	294	306	294	258	306	356	245	306	271	245	283	321	277	346	337	346	258	283	271	271	306
F23	316	316	392	271	337	337	316	337	327	327	365	356	316	316	316	294	346	327	294	245	383	337	374	327	383	327	316	306	306	356
F25	356	346	356	316	208	208	238	289	216	238	238	258	183	245	283	183	277	208	173	238	245	271	321	300	361	231	216	231	231	245
F26	379	387	387	342	231	231	258	316	200	245	294	283	200	245	294	183	231	258	183	200	238	208	283	294	327	141	183	163	163	216
F27	337	346	365	294	306	306	327	374	283	283	356	346	245	245	294	141	294	294	271	271	283	316	374	327	408	200	258	163	163	283
F29	361	370	361	327	208	208	245	283	200	216	238	258	216	216	289	183	271	224	183	252	200	208	258	283	306	216	200	231	231	231
F33	387	387	374	351	294	294	245	306	245	231	327	294	245	294	316	183	271	294	200	258	306	283	365	327	383	216	245	216	216	294
F34	379	387	379	346	173	173	216	231	231	271	208	231	245	277	332	258	265	191	238	265	277	252	289	311	327	271	271	283	283	294

AA AP AG JOY CA CM FI MA ME PC PR PAX BA BO BH CH CT LO PI SA SP WE B1 B2 B3 BS CL CO CM CR

260 Anexos

	AA	AP	AG	JOY	CA	CM	FI	MA	ME	PC	PR	PAS	BA	BO	BE	CE	CT	LO	PI	SA	SP	ME	B1	B2	B3	BS	CL	CO	CH	CR
P35	356	346	361	327	231	231	252	277	200	224	245	231	231	245	321	183	300	183	238	252	252	271	300	311	342	245	245	245	294	
P38	400	400	387	370	252	252	231	271	216	231	252	271	258	271	342	245	306	265	163	294	271	191	294	294	316	271	231	283	283	283
P39	379	370	365	346	208	208	238	277	200	252	224	245	231	231	294	245	277	224	191	216	224	191	238	265	289	245	183	258	258	245
P40	374	365	383	337	163	163	191	265	163	224	231	216	183	258	300	216	265	200	153	183	258	224	289	300	332	216	231	231	258	
P41	379	387	351	346	183	183	216	271	231	245	245	231	258	283	346	231	294	200	245	271	306	231	271	306	316	245	258	283	283	271
P42	379	387	387	346	208	208	245	252	258	294	238	258	271	300	346	283	277	224	265	283	300	277	306	327	327	294	294	306	306	316
P43	383	392	392	351	163	163	200	258	183	231	231	216	216	271	337	200	283	183	200	258	265	238	294	316	337	216	245	231	231	271
P44	392	392	400	356	216	216	183	258	200	216	258	245	231	283	316	245	283	245	141	231	294	216	306	316	346	245	258	258	283	
P45	342	351	327	300	238	238	271	316	231	271	277	294	183	231	277	141	245	238	183	231	258	238	294	271	337	183	115	183	183	200
P46	370	379	327	332	321	321	346	383	306	327	351	365	258	245	289	231	271	311	271	271	306	277	306	271	346	216	183	200	200	200
P47	361	351	361	321	200	200	224	289	200	252	258	245	183	283	321	163	277	200	191	231	289	283	342	321	379	216	216	216	271	
P48	361	351	370	327	216	216	238	289	216	265	258	245	216	183	289	245	289	183	238	216	294	238	311	238	332	245	258	216	216	283
P49	412	404	412	383	216	216	238	283	200	252	258	245	245	306	374	231	300	231	224	289	271	265	337	337	351	245	294	258	258	316
P50	387	370	361	356	224	224	231	245	200	231	208	231	231	277	321	283	238	208	224	238	277	252	277	277	316	258	283	283	283	271
P51	383	374	392	346	141	141	173	252	183	238	216	200	200	283	321	231	289	183	173	216	283	252	311	321	351	245	258	258	283	
P52	365	374	321	327	271	271	294	346	258	231	327	316	231	258	306	183	245	271	245	252	289	252	283	294	327	163	245	216	216	183
P53	365	356	379	332	153	153	224	191	231	277	173	231	208	306	327	271	277	173	238	283	265	277	300	321	342	306	258	316	316	306
P54	408	400	379	374	265	265	289	332	216	238	289	306	216	283	316	216	238	289	173	245	208	208	265	289	311	141	200	200	200	183
P55	400	408	374	370	277	277	306	321	258	252	300	316	271	316	370	238	265	289	265	294	258	252	271	327	316	200	283	258	258	231
P56	374	356	374	342	216	216	216	271	141	216	231	216	200	271	327	200	283	200	183	231	265	265	316	306	356	231	231	231	283	
P57	346	337	346	306	200	200	224	289	200	252	258	245	183	245	289	183	265	200	191	183	283	252	311	289	351	216	200	216	216	258
P58	365	374	337	332	265	265	316	306	271	283	289	327	208	277	300	231	208	252	252	300	252	252	265	265	306	200	216	231	231	200
P59	396	387	356	365	224	224	277	252	258	265	238	283	238	346	365	283	265	238	265	327	283	283	277	332	321	283	283	327	327	258
P60	379	370	365	346	208	208	238	277	200	252	224	245	231	231	294	245	277	224	191	216	224	191	238	265	289	245	183	258	258	245
P61	400	387	396	365	183	183	163	231	200	231	191	216	224	294	321	271	306	216	115	252	283	238	306	316	346	283	258	294	294	283
P62	356	365	365	316	191	191	231	265	245	283	238	258	200	252	294	216	252	191	224	231	289	265	316	294	356	231	231	231	258	
P64	412	400	412	379	231	231	216	245	216	245	238	258	238	321	361	271	277	258	173	283	289	265	351	342	365	283	294	294	294	316
P66	396	383	404	361	208	208	183	258	141	183	245	231	191	294	327	216	271	238	082	224	258	231	316	327	356	216	245	231	231	271
P67	361	370	361	321	224	224	258	289	216	258	265	283	200	277	316	163	238	252	191	245	245	245	306	316	346	200	183	216	216	245
P68	361	370	361	321	224	224	258	289	216	258	265	283	200	277	316	163	238	252	191	245	245	245	306	316	346	200	183	216	216	245
P69	404	392	379	374	277	277	258	306	245	258	294	283	277	283	337	283	306	265	245	252	311	252	294	306	337	271	271	283	283	283
P71	383	374	365	351	224	224	252	271	200	252	238	258	231	300	351	216	283	238	216	271	245	265	311	332	351	258	231	271	271	294
P72	342	351	332	306	245	245	283	294	271	306	245	294	216	183	245	258	271	216	245	258	271	245	258	200	306	258	183	231	231	216
P73	383	374	374	351	216	216	238	283	183	238	258	245	231	271	346	216	277	231	208	252	265	231	306	306	321	245	245	258	258	294
P74	428	412	412	400	245	245	245	294	200	245	258	245	271	294	346	306	306	258	231	245	283	245	271	316	316	271	294	294	294	283
P75	400	392	396	365	208	208	238	289	200	252	238	258	200	306	337	200	289	238	153	271	238	265	321	332	361	216	231	231	231	258
P76	370	361	370	337	231	231	252	300	183	238	271	258	200	271	332	141	277	216	208	245	245	265	321	311	361	183	216	183	183	271
P77	404	396	392	374	208	208	238	271	200	252	224	245	231	306	351	231	289	224	191	289	238	265	306	327	342	245	258	258	258	283
P78	374	383	346	342	216	216	245	294	200	216	271	258	231	271	337	183	258	231	216	258	265	208	258	294	306	183	216	231	231	231
P79	365	356	379	327	224	224	277	265	231	277	252	294	173	294	316	231	238	252	208	271	245	258	321	311	342	258	216	271	271	271
P80	370	379	351	332	252	252	283	311	245	283	289	306	231	300	337	183	265	277	224	271	271	271	327	337	365	231	200	245	245	271
P81	351	361	346	316	191	191	231	271	216	258	224	245	200	183	265	216	258	173	200	216	252	200	245	231	294	216	183	216	216	216
P83	356	365	327	321	231	231	258	306	216	231	283	271	216	245	316	163	245	216	231	245	277	224	271	271	316	163	200	200	200	216
P84	365	374	374	327	245	245	271	327	216	258	306	294	183	258	306	115	245	245	200	231	258	258	327	306	365	115	200	115	115	231
P85	387	396	396	361	200	200	231	258	183	231	231	216	231	258	337	216	283	183	216	258	252	224	258	306	306	216	245	231	231	271

	AA	AP	AG	JOY	CA	CM	FI	MA	ME	PC	PR	PAE	BA	BO	BH	CH	CT	LO	PI	SA	SP	WH	BI	B2	B3	BS	CL	CO	CH	CR
P86	361	370	370	327	258	258	283	327	231	271	306	294	216	231	306	163	271	231	245	258	271	271	327	283	365	163	231	115	115	258
P87	356	346	365	316	183	183	208	277	183	238	245	231	163	231	277	200	252	183	173	163	271	238	300	277	342	200	216	200	200	245
P88	379	387	379	346	231	231	258	306	200	245	283	271	231	283	346	141	283	245	216	271	245	245	306	327	346	183	216	200	200	271
P89	361	365	346	327	283	283	289	321	258	277	300	316	238	245	306	183	289	258	224	289	271	258	321	277	361	216	200	183	183	258
P90	374	383	351	342	208	208	245	277	231	271	238	258	245	283	337	216	283	224	216	289	271	252	289	311	327	258	216	271	271	271
P91	337	346	311	294	265	265	316	300	283	294	300	337	191	294	294	216	163	265	258	277	283	277	300	289	337	216	200	245	245	216
P92	432	416	416	400	277	277	283	311	245	283	277	294	271	300	346	316	289	300	238	258	289	252	306	316	327	283	294	306	306	283
P93	374	365	383	342	208	208	238	258	183	238	224	245	183	224	311	216	245	191	200	231	231	224	300	265	321	216	231	216	216	258
P94	370	374	370	337	200	200	208	231	216	238	224	245	238	265	321	231	271	216	200	252	258	208	277	300	321	258	231	271	271	283
P95	383	374	370	346	277	277	300	337	231	277	300	316	200	258	289	200	224	277	191	224	224	252	306	283	342	163	183	163	163	216
P96	447	440	383	416	316	316	332	379	306	311	356	346	316	374	428	271	351	337	300	356	356	311	370	379	379	283	327	327	327	316
P102	379	383	361	342	252	252	252	311	231	252	306	294	238	306	342	183	289	277	191	265	294	252	332	342	370	231	216	245	245	283
P104	392	396	392	356	252	252	252	306	216	238	306	294	224	306	337	183	252	277	173	258	265	245	327	337	361	183	245	200	200	271
P105	365	374	374	327	231	231	258	306	245	283	294	283	316	245	258	258	231	231	306	258	306	316	327	245	258	258	258	258	283	283
P106	383	392	365	356	283	283	306	327	258	294	306	294	271	294	365	183	316	245	283	306	294	294	327	337	365	231	245	231	231	306
P107	387	396	370	351	200	200	231	294	216	231	271	258	216	294	337	200	258	231	200	258	289	238	294	316	337	183	245	231	231	231
P108	316	327	321	271	306	306	337	337	327	311	316	356	271	300	300	238	300	306	283	289	306	311	306	294	337	283	231	306	306	245
P114	346	356	379	306	300	300	327	346	271	300	332	346	231	252	271	191	252	300	231	200	245	258	294	271	327	163	183	163	163	216
P115	365	356	337	327	265	265	289	332	231	224	289	306	200	216	258	200	224	265	191	208	216	216	265	252	311	163	183	200	200	163
P116	327	306	408	283	306	306	306	327	283	316	327	316	283	306	306	306	337	294	283	200	356	346	365	316	374	316	327	294	294	346
P117	374	365	332	337	277	277	300	342	271	289	300	316	231	294	327	200	289	265	238	294	300	300	342	300	379	216	231	216	216	245
P118	294	306	351	245	327	327	346	374	306	311	374	365	271	238	265	191	289	316	294	208	306	311	346	294	374	231	231	200	200	283
P119	365	374	356	327	316	316	346	365	294	327	327	365	216	231	258	216	245	306	245	271	245	271	306	245	346	183	141	141	141	183
P120	370	361	365	332	238	238	265	311	200	252	265	283	163	216	258	200	224	238	153	183	216	216	277	252	321	163	141	163	163	183
P121	332	342	356	289	332	332	356	374	316	316	361	374	271	283	300	231	289	321	283	258	311	306	327	283	356	216	258	216	216	245
P122	311	321	356	265	337	337	365	365	327	332	346	383	258	265	265	224	300	327	283	277	277	327	337	283	365	258	231	231	231	258
P123	370	379	379	337	163	163	200	258	183	231	231	216	216	231	306	216	271	183	200	216	258	200	258	283	306	216	231	231	231	258
P125	351	361	356	311	365	365	383	408	337	311	408	400	306	289	311	238	289	356	327	265	321	316	327	306	356	200	294	216	216	245
P126	321	332	342	277	277	277	327	311	306	311	311	346	224	245	224	277	216	277	265	200	283	238	231	216	271	231	200	258	258	183
P127	321	311	365	277	351	351	387	365	337	327	370	400	277	327	294	265	283	351	306	277	283	327	321	311	332	271	258	294	294	271
P128	379	387	387	346	258	258	283	327	216	258	306	294	216	231	306	163	245	245	231	231	231	231	294	283	337	115	200	115	115	231
P129	346	356	361	306	258	258	283	337	231	245	316	306	200	200	258	141	231	258	216	191	238	238	306	283	346	141	183	141	141	216
P130	356	365	383	316	258	258	283	337	258	258	316	306	258	231	283	216	283	283	245	216	258	245	306	316	346	231	245	245	245	271
P131	327	337	342	283	252	252	306	311	283	294	289	327	191	191	200	231	224	252	238	224	238	238	271	245	316	231	163	231	231	200
P132	346	356	374	311	183	183	216	245	231	271	245	231	231	245	294	231	289	163	245	216	306	258	283	271	316	245	258	245	245	283
P133	351	356	342	311	258	258	289	294	271	258	289	327	216	306	306	238	245	283	200	277	271	231	277	300	321	245	200	283	283	216
P135	327	337	332	283	294	294	316	365	271	283	346	337	231	200	258	141	258	283	258	224	277	277	337	283	374	183	183	141	141	245
P136	356	365	383	316	271	271	294	346	271	271	327	316	245	283	327	141	306	271	258	283	283	316	374	356	408	216	271	216	216	294
P137	337	346	351	294	231	231	258	316	216	231	294	283	183	216	271	115	245	231	200	208	252	252	316	294	356	163	200	163	163	231
P138	356	365	361	316	216	216	245	306	231	245	283	271	231	283	327	141	294	245	216	265	277	277	337	346	374	231	231	245	245	283

AA AP AG JOY CA CM FI MA ME PC PR PAE BA BO BH CH CT LO PI SA SP WH BI B2 B3 BS CL CO CH CR

262 Anexos

EM	EN	EI	EE	AE	EA	ENO	BUR	MOS	M4	M5	M7	M10	M14	M16	M17	M19	M23	M25	LPL	LPP	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E8	E9	E10	
EM	000																													
EN	191	000																												
EI	346	265	000																											
EE	332	245	100	000																										
AE	258	294	316	294	000																									
EA	300	231	173	141	245	000																								
ENO	082	183	346	327	245	294	000																							
BUR	316	245	183	183	283	163	316	000																						
MOS	294	265	265	245	245	231	289	238	000																					
M4	289	252	258	258	245	216	289	245	245	000																				
M5	316	300	337	351	327	311	316	337	300	231	000																			
M7	337	300	316	332	337	289	337	316	283	245	115	000																		
M10	258	258	306	327	316	294	258	294	258	271	200	200	000																	
M14	238	231	316	332	283	289	238	316	277	200	163	200	200	000																
M16	277	265	327	346	316	306	277	337	283	258	183	183	183	141	000															
M17	346	346	346	365	327	327	346	342	337	258	163	153	231	231	216	000														
M19	327	283	327	327	337	283	327	306	271	231	115	115	216	200	200	216	000													
M23	316	300	337	351	327	311	316	337	300	231	000	115	200	163	183	163	115	000												
M25	306	271	316	337	365	306	306	327	271	283	216	200	163	216	141	245	216	216	000											
LPL	306	294	337	316	271	271	294	306	277	337	356	327	327	316	316	361	337	356	327	000										
LPP	258	200	231	231	258	183	258	208	265	183	306	277	283	231	271	311	283	306	294	289	000									
E1	238	231	277	258	183	216	231	224	208	245	342	316	283	277	306	342	327	342	327	265	163	000								
E2	238	183	238	216	231	200	231	163	238	231	342	332	283	277	306	342	327	342	316	294	173	153	000							
E3	283	306	374	356	271	316	271	337	294	356	327	327	294	306	294	356	316	327	337	294	327	271	306	000						
E4	271	245	294	271	258	231	258	258	238	306	346	316	294	306	306	351	327	346	306	200	252	224	245	245	000					
E5	216	200	271	245	258	200	200	231	231	306	316	306	231	271	271	346	294	316	271	231	245	216	216	231	183	000				
E6	252	238	265	265	294	224	245	245	265	327	311	300	216	277	271	337	306	311	271	271	252	252	258	231	115	000				
E8	252	238	277	277	231	238	245	245	191	306	321	311	245	277	271	346	316	321	271	231	271	208	238	258	183	163	183	000		
E9	231	183	283	258	283	216	216	271	258	294	327	316	271	258	258	356	306	327	258	245	231	245	231	258	163	141	200	200	000	
E10	183	200	316	294	200	245	163	283	245	283	294	294	245	216	231	327	283	294	283	216	231	200	216	216	200	141	200	183	163	000
E11	208	216	277	258	183	216	200	216	252	200	311	321	283	238	294	311	316	311	327	294	173	153	115	294	258	231	265	252	245	200
E12	238	183	252	231	245	183	231	200	183	258	300	289	258	252	271	346	271	300	271	216	216	200	200	271	163	141	191	129	163	163
E13	258	216	271	245	294	200	245	238	289	300	337	300	283	300	300	306	316	337	294	265	224	238	224	306	224	183	216	258	200	231
E14	258	258	306	283	231	245	245	238	231	316	374	342	294	316	316	346	356	374	316	238	238	153	191	271	191	183	231	183	216	200
E15	216	200	258	231	216	183	200	224	200	271	337	321	258	271	271	356	316	337	271	224	208	173	173	258	173	115	183	163	141	141
E16	258	245	271	245	258	200	245	200	258	306	346	327	271	306	306	327	327	346	306	258	245	216	183	271	216	141	183	216	200	200
E17	294	224	163	191	283	129	294	173	238	231	271	252	245	245	258	306	258	271	258	277	191	245	231	316	238	200	191	208	216	245
E18	200	183	283	258	245	216	183	245	216	294	327	316	245	258	258	356	306	327	258	216	231	200	200	245	163	082	163	141	115	115
E20	224	115	224	200	258	183	216	208	245	216	311	306	271	238	271	346	294	311	283	289	153	191	129	306	238	200	238	238	183	200
E21	265	183	208	183	245	115	258	191	200	216	300	283	283	252	271	337	271	300	271	238	173	208	191	306	191	183	224	191	163	200
E22	238	216	252	231	245	183	231	208	245	258	300	294	245	265	294	337	283	300	316	289	208	191	191	258	252	163	153	238	231	200
E23	231	245	306	283	183	245	216	252	271	245	316	311	294	271	306	283	327	316	337	252	224	191	191	294	208	231	271	231	245	200
E24	271	258	306	283	258	231	258	271	252	316	306	271	277	294	289	311	283	306	306	216	277	252	283	258	200	183	216	216	231	200
E25	231	231	294	271	245	216	216	258	245	316	306	294	245	258	258	337	283	306	283	216	258	231	245	216	200	082	141	183	163	115
E26	224	141	252	231	283	183	216	231	231	258	300	289	258	224	245	346	271	300	245	245	216	200	283	200	141	191	191	115	163	

	EM	EN	EI	EE	AS	EA	ERO	BUR	MOS	M4	M5	M7	M10	M14	M16	M17	M19	M23	M25	LPL	LPP	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E8	E9	E10
E27	245	183	245	216	245	163	231	238	224	252	316	300	283	277	277	337	294	316	271	238	224	238	224	306	191	183	231	200	163	200
E28	245	216	294	271	258	216	231	283	265	294	316	283	283	245	245	321	294	316	271	200	208	224	245	271	183	163	216	216	141	141
E29	191	141	277	258	271	216	183	231	208	277	311	300	245	245	265	356	283	311	258	245	216	200	200	271	200	141	191	173	163	163
E30	238	115	238	216	306	200	231	216	245	271	321	311	271	252	271	365	294	321	258	271	200	231	183	306	216	163	208	208	141	200
E31	216	216	306	283	183	231	200	271	231	271	283	283	258	231	245	316	271	283	294	200	245	216	231	231	183	163	216	163	183	082
E32	277	238	316	294	346	283	265	283	265	332	306	294	216	311	300	337	283	306	258	327	327	306	283	306	283	200	200	271	258	271
E33	216	216	271	245	183	200	200	216	238	245	337	327	271	271	283	321	327	337	306	258	191	153	115	271	216	183	231	216	200	163
E34	252	141	208	183	283	163	245	191	231	245	332	316	283	265	283	365	306	332	271	277	173	208	153	316	224	183	224	224	163	216
E35	294	271	316	294	283	245	283	311	306	311	365	332	337	311	311	351	346	365	327	191	245	258	277	327	252	258	294	294	245	245
E36	283	216	231	231	327	216	283	208	289	258	365	332	316	294	316	370	337	365	306	321	141	216	191	365	277	258	283	294	245	283
E37	277	216	238	216	231	200	271	173	163	271	351	337	294	311	327	383	327	351	316	265	238	173	173	294	208	200	238	153	231	231
E38	252	200	224	200	216	141	245	173	163	231	311	294	271	265	283	346	283	311	283	224	191	173	173	283	173	163	208	153	183	183
E39	224	183	238	216	231	163	216	191	183	245	321	306	258	252	271	356	294	321	271	238	173	153	153	271	191	141	191	173	163	163
P410	332	283	100	141	316	200	346	216	283	283	351	332	306	332	327	346	346	351	316	337	258	294	258	374	294	271	265	277	283	316
P604	238	258	300	316	245	271	258	283	271	283	277	277	245	224	231	306	283	277	283	258	258	258	271	258	216	231	238	191	216	183
P606	332	265	100	100	316	173	346	183	265	258	351	332	327	332	346	365	327	351	337	337	231	277	238	374	294	271	283	294	283	316
C1	216	183	306	283	231	231	200	294	265	265	271	271	271	224	238	306	258	271	283	231	245	258	258	271	216	200	245	216	183	141
C2	216	200	258	231	163	183	200	224	200	231	306	300	258	258	271	327	294	306	294	224	208	173	173	258	173	163	216	163	183	141
C3TD	258	258	306	283	183	245	245	238	231	283	346	321	294	306	316	316	337	346	337	238	238	153	191	271	191	216	258	183	245	200
C3TK	216	216	294	271	163	216	200	265	224	252	294	289	271	252	265	316	283	294	306	224	238	208	224	258	208	200	245	200	216	141
C4	224	238	337	316	231	271	208	311	224	252	258	252	216	224	224	283	245	258	245	277	265	238	252	271	265	231	271	258	245	183
CU	216	216	316	294	200	245	200	265	245	277	294	289	271	252	265	300	283	294	306	224	258	231	224	258	208	200	245	200	216	141
DE	271	258	252	252	200	208	265	245	191	183	265	252	216	238	231	258	271	265	245	283	231	208	208	306	245	245	258	216	258	231
EP77	216	163	283	258	283	245	200	224	245	311	356	342	271	300	300	361	337	356	283	265	258	231	173	294	208	163	216	200	183	200
EP78	238	238	224	224	200	173	231	216	252	245	311	300	231	265	271	306	316	311	294	283	200	173	173	271	245	183	183	216	231	200
P1	231	216	258	231	216	183	216	231	224	265	356	337	283	300	300	356	337	356	294	258	216	183	183	294	216	183	231	216	200	200
P2	231	231	283	258	141	200	216	252	216	245	294	289	271	245	258	316	283	294	306	208	224	191	208	245	191	183	231	183	200	115
P3	271	200	216	183	258	163	258	216	258	258	365	346	306	306	306	365	346	365	294	283	200	216	163	327	231	200	245	245	183	231
P4	224	183	238	216	231	163	216	191	183	245	321	306	258	252	271	356	294	321	271	238	173	153	153	271	191	141	191	173	163	163
P5	258	252	300	283	216	271	252	258	216	200	311	321	271	265	306	327	316	311	316	346	245	183	183	316	306	283	311	277	306	271
P6	258	231	271	245	231	231	245	231	224	300	392	374	306	342	342	392	374	392	327	294	258	183	183	306	245	216	258	216	245	245
P7	216	216	258	231	163	183	200	231	231	231	337	327	271	271	283	337	327	337	306	258	183	141	141	271	216	183	231	216	200	163
P8	258	258	271	245	183	200	245	231	200	283	374	356	294	316	316	374	356	374	316	258	231	141	183	271	216	183	231	183	216	200
P10	208	238	294	271	163	231	191	271	245	200	306	316	258	245	283	306	316	306	306	294	216	183	183	294	258	231	271	258	245	200
P11	316	283	306	283	271	245	306	306	245	200	245	231	258	271	245	245	231	245	231	327	271	283	271	337	294	294	327	306	283	283
P12	191	224	316	294	200	258	173	289	216	200	258	277	216	200	231	283	271	258	258	289	238	208	208	271	252	216	258	245	231	183
P13	258	258	337	316	271	283	245	294	245	346	374	365	294	316	316	400	356	374	316	231	294	231	258	231	183	183	231	183	216	200
P15	258	216	231	200	231	183	245	200	231	271	374	356	294	316	316	374	356	374	306	271	216	183	141	306	216	183	231	216	200	216
P17	245	283	337	316	115	271	231	300	245	271	316	332	306	271	306	337	327	316	356	252	277	208	252	231	224	245	283	216	271	183
P18	231	231	316	294	200	258	216	277	216	283	327	321	271	306	316	346	316	327	316	277	277	208	238	283	238	231	271	200	258	216
P19	277	231	208	183	200	115	271	163	183	216	332	311	294	289	306	346	306	332	306	245	183	163	163	306	200	200	238	191	216	216
P20	332	306	289	271	306	231	327	258	283	306	361	342	327	342	337	374	337	361	337	337	271	258	258	283	271	258	277	300	258	294
P22	327	283	271	245	271	231	316	245	258	294	374	356	337	356	337	374	356	374	327	306	283	258	231	271	231	258	294	258	245	283
P23	306	306	316	337	306	306	306	337	306	200	216	231	216	216	200	200	258	216	200	383	271	306	294	365	356	337	337	337	327	316
P25	224	141	238	216	231	200	216	191	208	224	311	306	271	271	300	346	294	311	306	277	208	191	153	306	224	216	252	208	231	216
EM	EN	EI	EE	AS	EA	ERO	BUR	MOS	M4	M5	M7	M10	M14	M16	M17	M19	M23	M25	LPL	LPP	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E8	E9	E10	

	EM	EN	EL	EE	EA	EB	EC	ED	EE	EF	EG	EH	EI	EJ	EK	EL	EM	EN	EO	EP	EQ	ER	ES	ET	EU	EV	EW	EX	EY	EZ
P26	283	271	258	231	163	163	271	231	216	258	337	316	306	294	294	337	316	337	316	216	231	200	216	283	200	200	245	200	216	183
P27	245	271	327	306	163	271	231	294	258	258	337	346	306	316	346	337	346	337	356	316	283	216	245	316	283	283	316	258	306	258
P29	245	216	245	216	231	163	231	208	208	277	316	300	258	300	300	337	294	316	294	238	252	224	224	271	191	141	183	183	200	200
P33	271	283	245	271	216	258	271	258	258	271	346	337	258	283	283	337	356	346	306	316	231	183	216	306	283	258	258	216	283	245
P34	316	245	216	183	283	163	306	208	271	277	346	311	311	332	327	332	327	346	316	277	231	245	224	327	224	216	245	258	231	271
P35	252	231	252	231	245	183	245	216	265	252	321	311	271	294	321	337	306	321	337	316	216	200	200	294	283	216	208	277	271	245
P38	271	258	231	258	283	216	271	224	258	294	316	300	216	271	258	327	316	316	258	289	238	238	238	271	224	183	163	200	200	231
P39	265	216	238	216	258	141	258	224	245	258	289	271	271	238	258	327	258	289	283	252	191	224	224	271	238	163	191	238	183	183
P40	289	216	191	163	231	082	283	183	216	200	321	300	306	277	294	337	294	321	294	258	163	200	183	327	216	216	252	224	200	231
P41	294	231	216	183	283	163	283	216	283	283	365	346	306	327	327	365	346	365	316	294	231	245	200	306	231	200	231	271	216	258
P42	337	271	245	216	306	200	327	238	289	294	346	311	327	346	327	332	327	346	316	300	258	271	252	327	252	245	271	283	258	294
P43	294	245	200	163	231	141	283	163	231	271	356	337	294	337	337	356	337	356	327	271	245	216	183	306	216	183	216	216	231	245
P44	306	258	183	216	258	163	306	216	258	231	316	294	271	271	258	306	316	316	258	283	200	245	231	346	245	245	245	216	231	258
P45	183	183	271	245	183	200	163	238	216	245	316	311	245	245	258	337	306	316	283	238	191	153	153	245	191	141	200	183	163	115
P46	231	271	346	327	200	283	216	321	294	283	327	342	306	258	294	346	337	327	346	208	265	238	252	271	265	245	283	271	258	183
P47	238	183	224	200	216	183	231	183	231	216	342	332	283	277	306	356	327	342	316	294	163	141	082	306	245	216	252	238	231	216
P48	277	245	238	216	216	163	271	231	283	183	289	300	306	265	316	306	294	289	346	316	200	231	216	306	258	258	277	289	245	258
P49	332	283	238	216	258	200	327	183	224	289	370	351	321	356	365	383	346	370	356	316	271	216	216	294	245	245	265	238	271	294
P50	316	258	231	231	283	183	316	208	283	208	294	265	300	277	306	300	271	294	327	300	163	231	238	316	252	271	283	294	283	283
P51	300	200	173	141	258	115	294	163	231	216	342	321	316	300	316	356	316	342	306	283	183	216	163	346	231	231	265	238	216	258
P52	271	258	294	271	216	231	258	271	265	265	356	346	316	321	332	356	346	356	346	258	258	231	231	294	216	258	294	258	271	245
P53	289	200	224	200	316	183	283	173	283	283	342	306	294	300	316	327	316	342	306	289	191	224	173	327	238	200	224	265	216	258
P54	289	271	289	271	200	216	283	238	183	283	332	316	306	289	306	365	306	332	327	224	252	191	238	245	191	216	252	173	245	200
P55	332	321	306	283	258	245	321	265	238	316	365	332	306	356	356	351	346	365	346	252	294	231	277	283	208	245	271	245	294	283
P56	258	231	216	216	231	163	258	163	245	200	306	294	258	258	294	327	283	306	316	306	141	163	163	294	271	216	231	258	258	231
P57	238	183	224	200	216	141	231	216	245	183	311	300	283	238	271	327	294	311	294	283	115	163	141	306	245	216	252	252	200	200
P58	271	271	316	294	231	258	258	252	245	311	327	321	277	311	316	332	316	327	337	265	294	231	238	216	208	200	231	200	258	216
P59	311	258	277	258	327	245	306	208	294	327	379	346	316	342	356	365	356	379	346	277	252	238	208	306	224	231	252	277	271	283
P60	265	216	238	216	258	141	258	224	245	258	289	271	271	238	258	327	258	289	283	252	191	224	224	271	238	163	191	238	183	183
P61	294	191	163	191	294	173	294	173	238	231	306	289	271	258	271	337	294	306	258	289	191	245	200	346	238	231	238	208	216	258
P62	271	200	231	200	231	183	258	224	265	231	337	311	306	294	306	321	327	337	316	265	183	200	173	327	208	231	271	245	216	231
P64	327	265	216	238	294	224	327	191	252	265	346	311	300	311	316	342	337	346	306	300	216	224	216	337	224	271	277	238	258	294
P66	294	252	183	208	231	153	294	163	208	216	316	294	271	271	283	327	306	316	283	271	183	191	191	327	231	231	238	191	245	245
P67	245	231	258	231	216	183	231	224	224	271	356	321	283	294	294	342	337	356	294	224	183	141	173	283	173	163	216	200	183	183
P68	245	231	258	231	216	183	231	224	224	271	356	321	283	294	294	342	337	356	294	224	183	141	173	283	173	163	216	200	183	183
P69	316	289	258	277	283	224	316	271	321	258	306	294	294	258	283	316	306	306	327	271	216	265	265	327	316	283	277	311	294	271
P71	252	245	252	231	271	183	245	208	252	283	351	316	283	300	316	351	327	351	316	277	183	163	191	294	238	183	208	252	231	231
P72	216	200	283	258	231	216	200	271	283	245	258	283	258	231	271	294	271	258	306	271	245	258	245	271	231	183	216	231	200	183
P73	289	258	238	216	258	163	283	200	238	265	342	321	289	306	316	356	316	342	316	294	216	200	200	271	231	200	224	252	216	245
P74	356	306	245	245	294	183	356	231	294	258	327	306	337	306	327	346	294	327	346	245	231	283	283	346	294	283	294	306	294	294
P75	277	216	238	216	231	200	271	173	163	271	351	337	294	311	327	383	327	351	316	265	238	173	173	294	208	200	238	153	231	231
P76	252	245	252	231	183	183	245	200	216	245	332	321	271	289	316	346	316	332	337	294	200	115	163	258	258	200	224	224	258	216
P77	300	245	238	216	258	200	294	173	191	289	342	327	289	327	337	374	316	342	327	289	265	208	208	283	238	200	224	191	258	258
P78	271	258	245	216	231	163	258	216	245	283	356	337	283	316	316	356	337	356	316	258	231	200	200	258	200	163	200	231	216	216
P79	265	231	277	258	271	216	258	208	245	283	351	316	294	289	306	337	327	351	306	252	191	173	173	283	173	200	238	224	183	216

	EM	EN	EI	EE	AE	EA	ERO	BUR	MOS	M4	M5	M7	M10	M14	M16	M17	M19	M23	M25	LPL	LPP	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E8	E9	E10
P80	231	245	283	258	245	216	216	252	252	294	374	342	294	306	306	361	356	374	306	252	200	163	191	294	208	183	231	231	200	200
P81	245	200	231	200	216	141	231	224	245	231	283	277	258	258	271	306	271	283	294	252	208	224	208	271	208	163	200	216	183	183
P83	245	245	258	231	200	183	231	231	258	258	337	327	271	294	306	337	327	337	327	271	216	183	183	245	216	183	216	245	231	200
P84	258	258	271	245	115	200	245	231	200	245	346	337	294	306	316	346	337	346	337	258	231	141	183	271	216	216	258	183	245	200
P85	306	283	231	200	231	141	294	200	245	283	346	327	294	337	337	346	327	346	337	271	258	231	231	294	231	183	183	231	245	245
P86	258	283	283	258	115	216	245	245	245	245	327	337	294	306	337	327	337	327	365	294	258	183	216	271	258	231	258	231	283	231
P87	265	200	208	183	200	115	258	200	231	163	300	289	294	252	283	316	283	300	306	271	141	183	163	316	231	231	265	238	216	216
P88	271	271	258	231	200	183	258	216	216	294	365	346	283	327	327	365	346	365	327	271	245	163	200	258	231	163	200	200	231	216
P89	208	252	289	289	183	252	200	265	252	271	300	316	231	252	283	316	327	300	316	300	252	183	216	245	265	200	200	200	258	200
P90	258	216	245	216	271	200	245	208	238	300	346	332	265	311	306	365	327	346	294	277	252	224	191	271	224	141	183	216	200	216
P91	245	245	316	294	245	258	231	265	277	289	346	321	289	289	294	316	337	346	316	252	224	191	191	258	191	216	258	245	231	200
P92	356	306	283	283	306	231	356	265	300	271	346	311	356	306	327	351	316	346	346	224	216	271	289	346	252	306	327	306	271	294
P93	277	245	238	216	216	163	271	191	238	231	311	283	283	289	316	311	294	311	337	265	183	163	191	271	191	216	238	238	231	231
P94	277	238	208	208	271	153	271	224	271	271	321	283	258	277	271	300	316	321	271	265	183	208	216	306	224	183	183	231	200	231
P95	265	258	300	283	163	231	258	252	191	252	300	294	289	258	283	337	283	300	327	252	238	173	224	245	238	231	265	191	258	183
P96	332	316	332	316	327	306	327	294	306	356	443	428	374	387	400	455	424	443	392	346	306	258	258	316	271	306	332	311	294	327
P102	238	252	252	252	245	208	231	245	252	283	361	342	271	289	283	356	356	361	283	283	216	191	191	306	245	200	216	216	216	216
P104	300	289	252	252	200	208	294	231	200	277	351	332	289	316	306	346	346	351	306	271	258	191	224	294	231	231	245	163	258	245
P105	316	271	258	231	258	183	306	258	258	258	337	316	327	316	294	337	316	337	294	283	245	258	245	316	245	245	283	258	231	258
P106	258	294	306	283	231	245	245	271	283	316	374	365	294	337	346	374	365	374	365	327	271	200	231	271	294	216	216	271	283	245
P107	294	245	231	200	231	183	283	200	231	271	374	356	316	337	337	374	356	374	327	258	245	216	183	306	183	216	258	216	231	245
P108	224	191	337	316	306	306	208	306	252	289	294	294	216	265	265	327	283	294	245	306	294	271	245	283	245	231	271	258	245	231
P114	265	277	327	306	163	258	252	289	163	245	271	265	245	245	245	294	258	271	283	252	277	208	252	245	238	231	271	200	258	183
P115	238	216	289	271	200	216	231	252	224	238	289	283	283	245	277	327	271	289	316	238	224	208	224	258	208	231	265	224	245	183
P116	327	294	306	306	294	271	327	294	271	115	200	216	271	231	258	231	200	200	258	374	245	294	283	374	346	346	365	346	337	327
P117	224	216	300	283	216	271	216	252	245	258	342	356	294	277	327	374	346	342	346	311	238	173	173	271	252	245	277	238	271	231
P118	238	277	346	327	200	283	224	327	265	224	271	283	258	238	265	271	283	271	294	316	271	245	258	306	306	283	316	306	294	231
P119	216	258	346	327	141	283	200	306	245	283	294	316	283	245	283	327	306	294	337	245	283	216	258	231	231	216	258	183	245	141
P120	238	216	265	245	163	183	231	224	200	216	277	271	271	224	258	316	258	277	306	224	191	173	191	258	208	200	238	191	216	141
P121	271	294	356	337	216	306	258	321	216	245	271	289	245	271	294	294	283	271	294	311	311	252	277	283	265	283	316	258	306	258
P122	224	252	365	346	231	316	208	327	224	265	258	283	231	252	277	294	271	258	283	306	316	258	283	283	271	258	294	231	283	231
P123	294	245	200	163	231	082	283	200	245	245	327	306	294	306	306	327	306	327	306	258	216	231	216	306	216	183	216	231	200	231
P125	311	342	383	365	216	327	300	356	277	277	316	327	316	311	332	316	327	316	356	316	337	283	316	306	306	337	365	316	356	294
P126	277	252	327	306	258	258	265	300	252	245	245	238	258	216	216	252	231	245	258	252	271	283	265	271	224	245	283	258	231	200
P127	283	289	387	374	294	337	277	332	245	300	265	258	258	258	252	289	245	265	271	321	316	271	289	258	300	294	321	289	316	258
P128	283	294	283	258	115	200	271	245	231	271	327	316	294	306	316	327	316	327	356	258	258	183	231	245	245	216	245	216	271	200
P129	245	245	283	258	141	200	231	258	238	238	316	306	294	277	289	316	306	316	327	245	231	200	216	283	231	231	271	231	245	183
P130	294	258	283	258	245	200	283	283	271	271	327	306	316	306	306	327	306	327	306	271	258	271	271	337	258	258	294	271	245	245
P131	231	200	306	283	231	231	216	277	271	265	283	277	283	238	252	289	271	283	294	238	245	258	238	283	224	216	258	231	200	163
P132	294	231	216	183	245	163	283	216	258	216	306	294	283	294	294	306	294	306	306	306	231	245	200	316	258	231	258	271	245	258
P133	245	231	289	289	283	252	238	252	231	294	311	294	216	252	245	311	306	311	231	252	258	238	216	271	191	183	200	183	200	200
P135	200	245	316	294	141	245	183	294	277	238	316	327	294	252	289	316	327	316	337	283	231	200	216	283	271	245	283	271	258	183
P136	271	245	294	271	216	258	258	258	245	283	365	356	306	346	356	365	356	365	346	316	283	216	216	327	271	271	306	245	294	271
P137	231	216	258	231	163	183	216	231	224	224	327	316	283	289	300	327	316	327	316	258	216	183	183	294	216	216	258	216	231	200
P138	245	200	245	216	245	200	231	216	238	277	374	356	294	321	321	374	356	374	306	283	231	200	163	316	231	200	245	231	216	231

EM EN EI EE AE EA ERO BUR MOS M4 M5 M7 M10 M14 M16 M17 M19 M23 M25 LPL LPP E1 E2 E3 E4 E5 E6 E8 E9 E10

266 Anexos

E11 E12 E13 E14 E15 E16 E17 E18 E20 E21 E22 E23 E24 E25 E26 E27 E28 E29 E30 E31 E32 E33 E34 E35 E36 E37 E38 E39 410 604

E11 000

E12 216 000

E13 238 231 000

E14 208 200 183 000

E15 191 141 200 163 000

E16 200 200 141 141 163 000

E17 245 173 231 271 200 231 000

E18 216 115 200 163 082 163 216 000

E20 173 183 231 245 163 231 191 183 000

E21 208 115 216 231 141 216 129 163 141 000

E22 191 200 231 245 183 200 191 200 183 200 000

E23 153 216 216 183 216 200 271 216 231 231 245 000

E24 283 200 191 224 208 216 238 200 277 224 238 238 000

E25 245 163 200 200 141 163 216 115 231 200 183 245 163 000

E26 216 115 200 216 141 200 173 115 141 115 200 245 231 163 000

E27 238 163 183 231 141 216 183 163 183 115 231 231 191 200 163 000

E28 245 183 173 191 153 200 224 141 208 173 238 224 183 141 141 173 000

E29 216 115 200 200 141 200 208 115 183 163 200 245 200 163 115 163 183 000

E30 231 141 216 231 163 216 191 141 115 141 216 258 258 200 082 183 183 141 000

E31 216 141 245 216 163 216 231 141 216 183 216 183 183 141 183 183 163 183 216 000

E32 316 258 238 283 245 245 283 231 271 283 231 316 245 231 258 252 283 224 245 283 000

E33 115 200 191 153 129 141 238 163 173 191 191 153 245 200 200 191 200 200 216 183 283 000

E34 208 163 216 231 141 216 173 163 082 115 200 258 265 216 115 163 191 163 082 231 258 191 000

E35 277 271 208 252 224 258 277 245 265 238 289 277 238 245 245 208 191 245 271 258 321 238 252 000

E36 238 245 238 252 224 258 224 245 173 208 252 289 311 283 200 252 238 231 183 306 316 238 153 271 000

E37 224 141 271 200 163 231 208 183 183 163 216 245 252 231 200 200 252 183 183 216 271 208 163 300 238 000

E38 191 082 231 200 115 200 153 141 163 082 183 216 208 183 141 141 191 141 163 163 271 173 141 252 224 115 000

E39 173 115 216 183 082 183 173 115 141 115 163 231 224 163 115 163 173 115 141 183 258 153 115 238 191 141 082 000

F410 294 271 271 306 258 271 191 283 245 231 271 306 306 294 271 245 294 294 258 306 316 271 231 316 258 258 245 258 000

F604 258 200 294 271 231 271 224 216 258 231 258 245 245 216 231 245 231 231 258 163 327 245 271 306 316 258 216 231 283 000

F606 277 252 271 306 258 271 191 283 224 208 252 306 306 294 252 245 294 277 238 306 316 271 208 316 231 238 224 238 100 300

C1 245 183 216 258 200 245 231 183 216 183 245 216 183 183 183 141 163 183 216 115 277 216 231 231 306 258 200 216 306 200

C2 173 141 231 200 115 200 200 141 163 141 183 163 208 183 183 141 191 183 200 115 271 129 183 252 265 163 115 141 258 200

C3TD 191 200 216 115 200 183 271 200 245 231 245 115 224 231 245 231 224 231 258 183 306 153 258 277 289 200 200 216 306 245

C3TE 208 183 231 231 163 231 231 183 216 183 216 200 173 183 216 141 191 183 245 115 277 173 231 224 300 216 163 183 294 200

C4 238 245 252 258 200 258 283 216 245 245 245 258 224 216 245 208 224 208 271 200 231 208 258 245 311 271 231 216 337 258

CU 208 183 208 208 191 200 252 183 238 208 238 173 173 183 216 173 191 183 245 115 277 173 252 245 316 238 191 208 316 200

FE 208 224 265 245 200 245 224 231 224 208 238 216 258 258 252 208 258 245 265 216 277 183 238 277 283 224 191 208 252 238

SP77 224 183 173 173 153 163 252 141 191 208 238 224 224 200 183 173 208 141 163 216 208 173 173 258 245 191 191 173 283 271

SP78 173 224 216 216 163 183 191 200 191 208 153 216 245 200 224 216 231 224 238 216 271 141 208 258 245 224 191 173 224 238

F1 200 200 183 183 115 183 231 163 200 183 216 231 216 200 200 141 200 163 216 216 252 141 183 200 231 200 163 141 258 271

F2 191 163 245 216 141 216 216 163 200 163 200 183 191 163 200 163 173 200 231 082 294 153 216 238 289 200 141 163 283 183

F3 216 216 200 216 141 200 216 183 141 163 231 245 271 231 183 163 200 216 163 245 271 163 115 231 183 200 183 163 216 294

F4 173 115 216 183 082 183 173 115 141 115 163 231 224 163 115 163 173 115 141 183 258 153 115 238 191 141 082 000 258 231

F5 183 271 311 258 245 283 300 271 216 271 245 245 327 306 283 289 316 265 271 283 289 216 245 332 271 216 245 231 316 316

E11 E12 E13 E14 E15 E16 E17 E18 E20 E21 E22 E23 E24 E25 E26 E27 E28 E29 E30 E31 E32 E33 E34 E35 E36 E37 E38 E39 410 604

	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30	E31	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	410	604
P6	231	231	231	183	163	216	271	200	216	231	245	258	258	245	245	200	258	200	231	258	252	183	200	258	245	163	200	183	271	306
P7	141	200	216	183	115	183	231	163	163	183	183	183	245	200	200	183	200	200	216	183	283	082	183	231	231	200	163	141	258	245
P8	200	200	231	141	115	183	245	163	216	200	216	231	245	200	216	200	216	200	231	216	283	141	200	245	245	163	163	141	271	271
P10	141	245	252	231	183	231	271	216	200	231	216	183	277	245	245	224	245	238	258	216	289	141	231	265	271	245	216	200	294	271
P11	271	283	283	306	258	294	283	283	258	245	294	271	294	306	283	231	283	294	294	271	283	245	271	294	316	294	258	271	306	316
P12	173	231	265	245	183	245	271	200	200	231	216	200	265	231	231	224	238	224	245	200	252	173	231	283	289	245	216	200	316	258
P13	271	200	271	200	183	231	283	163	258	245	258	271	258	200	216	245	231	200	231	216	283	231	245	271	306	216	216	200	337	271
P15	200	200	216	183	115	183	231	163	163	183	216	231	258	216	200	183	216	200	183	231	258	141	141	245	200	163	163	141	231	283
P17	208	231	306	245	216	271	283	231	258	245	245	200	252	231	271	245	252	258	294	163	337	208	283	289	342	231	216	231	337	231
P18	238	216	258	231	200	258	271	216	245	231	245	231	224	245	258	183	265	200	271	200	258	208	258	277	321	200	200	216	316	258
P19	183	141	231	200	141	200	173	183	183	115	200	216	231	216	183	163	216	183	200	200	294	163	163	245	216	141	082	115	231	245
P20	271	271	283	283	245	258	265	271	271	258	245	316	271	271	271	283	294	271	283	306	316	258	258	316	283	271	245	231	306	306
P22	271	245	283	258	216	258	271	245	245	231	283	271	283	283	271	231	283	271	258	271	306	231	231	306	283	216	216	231	271	294
P23	271	337	327	346	306	337	294	327	283	306	316	306	356	346	316	306	327	327	327	327	327	283	306	337	316	346	316	306	316	316
P25	191	163	245	245	183	245	208	200	141	163	200	216	238	245	200	163	252	163	183	200	252	191	163	277	238	141	141	163	258	245
P26	216	183	231	200	141	200	216	183	231	163	231	216	200	183	216	163	183	216	245	163	306	163	216	216	271	200	141	163	258	231
P27	216	271	283	258	245	283	306	271	271	271	271	216	271	294	306	231	306	258	316	245	306	216	294	294	337	245	245	258	327	294
P29	238	163	183	216	141	183	183	163	216	163	183	231	153	163	200	115	208	163	216	183	208	191	200	238	277	183	141	163	245	245
P33	216	258	294	231	216	258	245	245	245	258	245	258	306	271	271	271	283	258	283	258	337	200	258	306	271	231	231	216	245	245
P34	265	231	191	238	208	216	208	231	208	191	238	238	208	245	231	191	224	258	216	258	265	224	191	258	231	224	208	224	216	306
P35	200	245	216	258	216	216	224	245	216	231	115	258	245	231	245	231	271	216	258	258	238	200	231	271	258	245	216	200	271	294
P38	252	216	245	245	183	216	163	200	231	216	200	283	252	200	216	231	238	216	231	245	271	224	216	289	252	231	200	183	231	200
P39	224	183	200	245	163	200	153	183	183	141	163	271	208	141	141	183	153	183	183	200	271	208	163	224	224	231	163	141	258	245
P40	200	163	216	231	163	216	153	200	163	082	216	231	245	231	163	141	200	200	183	216	306	183	141	231	200	183	115	141	216	258
P41	245	245	200	245	183	200	216	216	183	200	216	271	271	231	216	200	231	245	200	271	258	200	163	245	216	231	216	200	216	316
P42	289	258	224	265	238	245	238	258	238	224	265	265	224	271	258	224	252	283	245	283	283	252	224	283	258	252	238	252	245	327
P43	231	200	216	216	163	183	200	200	200	183	200	231	231	216	231	183	245	231	216	231	245	183	183	271	245	163	163	183	200	283
P44	245	216	245	258	200	245	141	231	216	163	258	258	271	258	216	183	231	245	231	245	327	216	200	258	231	231	183	200	183	231
P45	153	163	216	183	082	183	216	115	141	163	163	183	224	163	163	163	173	163	183	141	258	100	163	238	238	183	141	115	271	216
P46	208	258	294	271	216	271	294	231	245	258	245	231	277	231	258	258	238	258	283	200	337	208	271	208	321	283	245	231	346	258
P47	141	200	245	216	163	216	224	200	115	183	183	216	283	245	200	216	245	200	183	231	283	141	141	271	183	163	163	141	245	271
P48	183	245	258	294	245	258	208	271	200	200	200	216	283	271	245	231	271	271	258	245	327	216	231	294	271	258	216	231	258	258
P49	258	231	283	245	231	245	238	258	245	231	231	283	258	271	271	258	306	258	258	283	289	245	231	327	271	163	200	216	258	294
P50	238	245	252	289	265	271	191	283	224	208	224	252	252	283	245	252	265	271	258	271	332	252	238	283	231	265	224	238	258	283
P51	216	183	231	245	183	231	173	216	141	115	231	245	271	258	183	163	231	216	163	245	294	200	115	258	183	163	141	163	200	283
P52	231	245	258	258	216	258	271	245	245	231	258	231	258	271	271	200	271	245	283	231	311	200	258	231	306	245	216	231	294	283
P53	224	216	141	200	216	163	208	216	183	200	216	231	252	231	183	231	208	216	163	271	258	208	163	265	173	231	216	200	245	306
P54	238	163	283	216	183	245	224	200	245	183	231	258	224	200	216	216	224	200	245	183	316	224	231	265	289	163	141	163	306	231
P55	289	258	258	224	238	245	277	258	300	265	265	265	245	258	294	258	277	277	306	271	289	252	289	265	316	238	238	252	306	316
P56	163	216	245	245	200	216	183	231	183	200	141	245	271	231	216	245	258	216	231	245	294	183	200	283	200	216	183	163	245	258
P57	141	200	216	231	163	216	191	200	115	141	183	216	271	231	163	183	200	200	183	216	306	141	141	231	183	216	163	141	245	258
P58	238	216	252	208	224	200	265	216	265	252	224	208	208	216	258	252	265	245	271	200	277	208	277	316	337	224	224	238	316	258
P59	252	245	216	216	245	200	265	245	245	258	245	258	277	258	245	283	265	245	231	294	283	238	231	277	238	245	245	231	294	327
P60	224	183	200	245	163	200	153	183	183	141	163	271	208	141	141	183	153	183	183	200	271	208	163	224	224	231	163	141	258	245
P61	245	173	258	271	200	258	115	216	153	129	238	271	277	258	173	183	238	208	153	245	294	238	129	289	191	173	153	173	191	238
E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30	E31	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	410	604	

	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30	E31	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	410	604	
P62	208	216	208	224	191	231	224	216	153	173	238	173	252	258	216	173	208	245	200	216	294	173	173	245	216	208	191	208	231	271	
P64	258	224	277	252	238	271	208	258	231	216	271	265	265	294	252	252	277	252	238	283	321	252	216	306	216	200	200	216	238	252	
P66	208	173	258	231	183	231	141	216	208	153	224	245	258	245	208	200	245	208	224	231	316	200	191	271	216	173	129	153	208	224	
P67	191	183	173	129	100	163	224	141	191	173	208	191	208	183	183	173	153	183	200	200	271	129	173	200	200	191	153	129	258	258	
P68	191	183	173	129	100	163	224	141	191	173	208	191	208	183	183	173	153	183	200	200	271	129	173	200	200	191	153	129	258	258	
P69	252	289	283	316	271	283	216	294	252	252	238	306	306	271	265	283	271	289	289	283	356	258	265	216	271	311	265	252	277	277	
P71	208	216	191	191	173	183	216	200	208	208	173	252	238	200	200	238	208	200	216	258	271	191	191	245	163	224	191	153	271	294	
P72	216	200	231	271	216	231	216	200	200	200	200	183	231	200	200	200	216	231	216	163	271	216	231	294	306	258	216	231	283	231	
P73	216	216	231	231	183	200	208	216	216	200	183	271	231	216	216	231	245	216	231	258	277	200	200	271	231	216	183	163	258	271	
P74	283	258	283	316	271	283	200	294	271	216	258	316	283	271	258	258	271	283	283	283	356	283	258	216	271	283	231	245	271	294	
P75	224	141	271	200	163	231	208	183	183	163	216	245	252	231	200	200	252	183	183	216	271	208	163	300	238	000	115	141	258	258	
P76	163	216	245	200	183	200	224	216	200	216	141	231	258	216	231	245	258	216	245	231	283	163	216	283	245	183	183	163	271	271	
P77	252	183	271	231	200	231	208	216	216	200	200	271	224	231	231	231	277	216	216	245	252	238	200	321	265	115	163	183	258	283	
P78	216	216	200	200	141	163	216	183	216	200	183	245	231	183	216	200	216	216	231	231	258	163	200	231	245	216	183	163	245	283	
P79	191	183	183	141	183	163	238	183	216	200	231	200	238	216	183	231	191	183	200	231	294	173	200	252	208	216	183	163	294	245	
P80	208	216	191	153	129	183	252	163	208	208	224	224	238	200	200	208	173	200	216	231	283	153	191	216	183	224	191	153	283	283	
P81	208	183	200	245	163	200	163	183	163	141	163	200	208	183	183	141	191	216	200	163	258	173	183	252	265	216	163	183	231	231	
P83	183	231	216	216	163	183	231	200	200	216	163	216	245	200	231	216	231	231	245	216	271	141	216	245	258	231	200	183	258	271	
P84	183	200	258	183	163	216	245	200	216	200	216	183	245	231	245	200	245	231	258	183	306	141	231	271	283	163	163	183	271	245	
P85	245	216	216	231	183	183	200	216	245	200	163	245	216	200	245	200	245	245	258	231	245	200	231	271	283	216	183	200	231	283	
P86	183	245	271	231	216	231	258	245	245	245	200	183	258	245	283	245	283	271	294	216	306	183	271	306	316	216	216	231	283	271	
P87	163	183	231	245	183	231	173	216	141	115	200	200	258	245	183	163	216	216	200	200	316	163	163	245	216	200	141	163	231	245	
P88	216	216	216	163	141	163	231	183	231	216	183	245	231	183	231	216	231	216	245	231	258	163	216	258	258	183	183	163	258	283	
P89	183	238	271	231	200	231	238	216	224	252	173	216	265	216	252	258	265	238	265	216	283	191	252	311	300	224	224	208	289	238	
P90	238	200	216	216	141	183	216	163	183	200	183	258	208	183	200	200	224	200	183	231	208	191	163	277	238	183	183	163	245	283	
P91	191	231	200	163	200	183	283	200	231	245	245	163	224	231	231	245	208	231	245	216	300	153	245	252	265	258	231	216	316	271	
P92	289	258	289	300	277	306	238	294	277	224	300	300	289	294	258	265	252	283	283	283	383	289	265	200	258	289	238	252	306	271	
P93	191	200	224	224	208	216	200	231	208	191	173	191	224	231	231	224	238	231	245	216	294	191	224	271	245	208	173	191	258	231	
P94	231	224	153	208	173	183	163	200	200	183	200	238	224	200	191	191	173	224	208	245	271	191	183	216	200	245	200	183	208	265	
P95	208	183	294	231	200	258	238	216	231	200	216	231	208	216	231	231	238	216	258	163	321	208	245	289	300	183	163	183	316	216	
P96	294	306	337	283	271	306	332	294	283	306	306	346	365	327	306	327	337	294	294	346	356	283	271	327	271	258	283	258	346	346	
P102	208	224	231	200	141	200	224	183	208	208	224	258	271	216	208	216	216	208	224	245	294	163	191	245	200	224	191	153	252	265	
P104	238	208	271	200	183	231	224	216	252	208	252	245	231	245	252	216	258	238	265	231	311	200	238	283	283	173	173	191	252	252	
P105	258	231	245	258	200	245	231	231	231	183	271	258	231	258	231	183	231	258	245	245	316	216	216	258	271	245	200	216	258	294	
P106	231	283	258	231	216	216	283	245	258	283	163	271	283	231	283	283	283	271	294	271	271	200	271	306	283	258	258	231	306	316	
P107	231	200	245	216	163	216	231	200	200	183	245	231	258	245	231	183	245	231	216	231	283	183	183	258	245	163	163	183	231	283	
P108	271	245	265	271	231	271	306	216	231	271	271	271	271	271	258	245	238	271	208	231	245	183	245	245	300	306	258	258	245	337	294
P114	238	216	289	231	200	258	271	216	258	231	245	231	224	216	258	224	238	238	283	163	277	208	271	283	332	216	200	216	327	231	
P115	208	183	258	258	200	258	224	216	216	183	216	231	208	216	216	183	224	183	245	163	300	208	231	238	289	216	163	183	306	216	
P116	258	306	337	356	316	346	283	337	271	271	306	294	346	356	306	294	337	316	316	316	337	294	294	346	306	316	283	294	327	327	
P117	173	231	306	245	216	271	277	231	183	245	216	231	311	271	245	271	289	231	231	245	306	208	216	321	265	183	216	200	316	283	
P118	216	294	277	283	245	283	316	271	271	283	271	245	271	271	294	252	271	265	316	245	283	216	294	265	327	306	271	258	346	294	
P119	216	200	294	231	216	258	283	200	258	245	245	183	231	200	245	245	231	231	271	115	316	216	283	306	346	231	216	231	346	200	
P120	173	141	258	231	163	231	191	183	183	141	183	200	208	183	183	183	191	183	216	115	306	173	200	252	265	183	115	141	283	183	
P121	252	271	327	283	258	306	316	271	283	283	283	245	294	294	306	271	311	283	316	245	283	252	306	332	361	258	258	271	356	294	

E11 E12 E13 E14 E15 E16 E17 E18 E20 E21 E22 E23 E24 E25 E26 E27 E28 E29 E30 E31 E32 E33 E34 E35 E36 E37 E38 E39 410 604

E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30	E31	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	410	604	
F122	258	245	300	271	258	294	316	245	283	283	283	231	258	271	283	252	294	238	294	216	245	258	306	332	365	258	258	271	365	271
F123	231	200	183	231	163	183	163	200	200	141	200	231	216	200	200	141	200	231	216	216	271	183	183	231	245	216	163	183	200	271
F125	283	327	342	316	306	337	356	327	337	327	327	283	306	327	356	300	337	321	374	283	337	283	356	300	392	316	306	316	383	327
F126	252	231	245	265	238	245	265	231	252	224	277	224	238	231	231	216	208	252	258	183	289	224	265	265	327	289	238	252	327	245
F127	277	283	306	277	289	294	337	283	311	311	300	300	283	283	294	306	300	252	316	271	283	277	321	321	356	300	289	277	400	306
F128	216	231	258	216	200	216	245	231	258	231	200	216	216	200	271	231	245	258	294	183	306	183	271	271	316	216	200	216	283	245
F129	200	216	231	231	183	231	245	216	231	200	231	200	200	216	245	163	216	216	271	163	300	163	245	216	294	231	183	200	283	231
F130	271	245	216	271	216	258	245	245	258	200	283	271	216	245	245	141	216	231	271	231	294	231	245	200	294	271	216	231	283	283
F131	224	200	191	238	208	216	238	200	224	191	252	191	191	200	200	153	173	200	231	141	289	191	238	231	306	265	208	224	306	216
F132	231	245	231	271	216	231	216	245	183	200	216	231	265	258	245	200	258	271	231	245	258	200	200	283	258	231	216	231	216	294
F133	231	191	216	191	173	183	231	163	231	216	245	238	245	200	191	216	208	183	208	216	252	191	216	265	271	231	200	183	289	238
F135	163	258	245	245	200	245	283	231	231	245	231	200	245	231	258	216	231	231	283	200	311	163	258	231	294	271	231	216	316	258
F136	245	258	271	245	231	271	294	258	245	258	271	245	271	294	294	216	306	245	283	258	271	216	258	294	306	200	231	245	294	306
F137	183	200	216	216	163	216	231	200	200	183	216	183	216	231	231	141	231	200	245	183	277	141	216	231	271	200	163	183	258	245
F138	216	216	200	200	141	200	245	183	183	200	231	245	245	231	216	163	231	183	200	245	238	163	163	231	216	183	183	163	245	294

E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30	E31	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	410	604	
606	C1	C2	C3D	C3E	C4	CU	PE	S77	S78	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	15	17	18	19	20	22	23	25	
F606	000																													
C1	306	000																												
C2	258	163	000																											
C3TD	306	231	163	000																										
C3TE	294	115	115	200	000																									
C4	337	191	200	258	153	000																								
CU	316	115	153	173	100	183	000																							
PE	271	238	163	216	191	191	224	000																						
SP77	283	216	191	208	208	231	183	252	000																					
SP78	245	245	163	216	200	231	231	163	231	000																				
P1	258	216	163	216	163	191	200	191	163	163	000																			
P2	283	141	082	183	082	183	129	183	224	183	183	000																		
P3	216	245	183	245	231	258	258	216	183	183	141	216	000																	
P4	238	216	141	216	183	216	208	208	173	173	141	163	163	000																
P5	300	311	231	245	265	238	289	191	265	224	238	258	245	231	000															
P6	271	271	200	216	216	238	245	224	163	200	115	231	163	183	208	000														
P7	258	216	115	183	163	200	200	163	200	115	115	141	141	141	200	163	000													
P8	271	258	163	183	200	231	231	200	200	163	115	183	163	141	216	115	115	000												
P10	294	238	163	216	191	191	224	163	238	163	173	183	200	200	163	208	115	183	000											
P11	306	258	231	283	245	200	271	163	294	258	245	245	245	271	245	283	231	271	216	000										
P12	316	224	163	231	191	153	216	163	231	200	208	183	231	200	163	238	163	216	115	200	000									
P13	337	258	216	231	245	271	245	283	216	258	231	231	258	200	294	231	231	200	271	337	258	000								
P15	231	258	163	216	216	245	245	200	163	163	115	200	082	141	216	115	115	115	183	258	216	231	000							
P17	337	216	163	200	163	231	191	231	277	231	245	141	283	231	245	258	200	216	200	294	200	216	258	000						
P18	316	200	163	200	141	183	173	216	208	231	183	183	258	216	245	183	200	200	216	258	216	245	231	200	000					
P19	208	231	141	200	183	245	216	173	216	173	141	163	163	115	231	183	141	141	200	245	231	245	141	231	216	000				
P20	289	327	271	306	294	306	316	277	294	238	245	283	258	231	294	271	245	245	283	306	294	316	245	327	316	231	000			

270 Anexos

	606	C1	C2	C3D	C3E	C4	CU	FE	877	878	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	15	17	18	19	20	22	23	25
P22	271	294	216	258	258	294	283	231	245	245	216	245	200	231	271	216	216	216	258	258	271	294	183	294	271	200	231	000		
P23	337	316	294	337	306	245	327	200	337	258	294	306	294	306	245	327	271	316	231	183	216	374	306	327	316	306	337	327	000	
P25	238	200	141	216	163	224	191	200	173	208	183	183	200	163	208	183	183	216	208	258	208	258	183	231	163	163	283	231	306	000
P26	258	200	141	200	141	216	183	183	231	183	141	115	183	163	271	200	141	141	200	245	231	245	163	200	216	115	258	216	316	216
P27	327	245	200	216	183	216	216	216	258	231	200	216	271	258	216	200	200	216	183	258	216	294	245	200	115	231	327	283	294	200
P29	245	183	141	216	141	208	173	208	173	183	141	163	200	163	277	183	183	183	224	258	224	231	183	231	163	163	258	231	327	163
P33	271	294	216	231	245	271	271	200	271	163	216	231	245	216	231	216	183	183	216	306	245	271	216	245	245	216	294	283	271	245
P34	216	258	208	238	252	294	271	238	231	216	216	238	163	224	289	231	216	231	258	258	271	294	183	300	277	200	245	216	327	224
P35	252	258	216	258	216	238	245	231	245	153	183	231	231	200	238	216	183	216	208	283	238	294	216	271	231	200	245	283	306	200
P38	258	271	216	271	245	271	265	231	238	163	216	231	231	183	294	245	216	216	258	316	258	258	216	283	271	216	231	258	294	245
P39	238	200	200	271	200	231	224	252	238	191	200	183	200	141	294	258	200	216	245	283	245	258	216	258	271	183	245	283	316	231
P40	191	216	163	231	200	258	231	191	231	191	163	183	141	141	258	216	163	183	216	231	245	271	163	258	245	082	245	216	294	183
P41	216	271	216	271	258	283	283	245	216	183	183	245	115	200	271	200	183	200	231	271	258	245	141	283	283	200	258	231	316	231
P42	245	283	238	265	277	311	294	258	258	245	245	265	200	252	306	258	245	258	283	258	289	316	216	321	300	231	231	216	327	252
P43	200	258	163	216	216	271	245	200	200	163	163	200	141	183	245	163	163	163	216	258	245	258	115	258	231	141	245	183	327	183
P44	216	245	200	258	231	283	258	183	258	183	200	216	183	200	294	245	200	216	245	258	271	294	200	283	271	163	283	245	258	231
P45	271	183	082	183	141	183	173	183	173	141	141	115	163	115	216	183	082	141	141	245	141	200	141	183	183	163	258	231	283	163
P46	346	231	200	258	200	231	224	258	277	231	245	183	271	231	271	283	200	245	200	306	200	245	258	183	258	258	327	316	316	258
P47	224	258	163	216	216	245	245	191	200	153	163	200	141	141	163	163	115	163	163	258	200	258	115	245	231	141	245	216	283	141
P48	238	245	200	258	231	283	258	224	294	191	245	216	231	231	245	283	200	258	200	258	231	327	245	245	271	200	245	258	283	216
P49	238	316	231	245	271	311	294	245	258	224	231	258	231	216	238	200	231	200	271	306	289	283	200	283	258	183	183	200	356	216
P50	231	271	238	265	265	306	283	252	306	231	271	252	258	238	289	306	245	283	271	283	283	306	271	277	300	216	258	294	306	238
P51	173	245	183	245	231	283	258	208	216	208	183	216	115	163	245	200	183	200	231	245	258	283	141	283	258	115	258	200	306	163
P52	294	231	183	231	183	238	216	208	245	216	183	200	231	231	265	216	183	216	208	258	238	216	216	200	200	200	306	258	316	200
P53	224	271	245	231	283	306	265	277	191	224	231	271	183	200	283	245	231	245	271	306	283	283	200	327	306	216	271	271	337	231
P54	289	231	183	216	183	245	208	238	252	238	216	163	258	163	271	231	216	183	258	306	258	183	231	163	216	163	283	271	356	216
P55	306	300	238	224	258	283	277	245	277	245	238	252	271	252	283	238	245	216	258	294	277	200	245	238	252	231	306	283	356	271
P56	216	271	200	245	231	258	258	216	258	141	200	216	216	163	216	231	163	200	200	283	231	283	200	258	258	163	231	271	283	200
P57	224	216	163	231	200	231	231	191	231	153	163	183	141	141	216	216	115	183	163	231	200	271	163	245	245	141	245	245	258	183
P58	316	245	191	173	224	271	200	252	231	231	258	208	283	238	277	258	231	231	258	306	245	200	258	191	224	245	283	283	356	238
P59	277	316	271	245	306	327	289	300	224	252	258	294	245	231	294	258	258	258	294	346	306	216	231	306	316	245	294	294	374	258
P60	238	200	200	271	200	231	224	252	238	191	200	183	200	141	294	258	200	216	245	283	245	258	216	258	271	183	245	283	316	231
P61	191	245	200	271	245	294	265	224	224	224	231	231	183	173	277	245	231	245	271	283	271	283	200	294	271	173	289	245	294	173
P62	231	216	153	191	208	265	231	200	216	200	200	191	141	208	245	216	163	216	200	231	224	283	163	252	238	183	294	216	294	173
P64	238	306	238	252	277	316	294	231	258	238	245	265	231	216	271	245	245	245	283	306	294	306	216	311	289	191	224	216	316	216
P66	208	258	183	231	216	271	245	173	245	173	183	200	200	153	252	216	183	183	231	271	258	271	183	258	245	100	252	231	283	191
P67	258	231	153	173	191	224	216	200	183	163	115	173	141	129	245	163	115	115	183	258	208	216	115	238	224	141	245	216	306	208
P68	258	231	153	173	191	224	216	200	183	163	115	173	141	129	245	163	115	115	183	258	208	216	115	238	224	141	245	216	306	208
P69	277	283	271	316	271	294	294	265	327	208	271	258	271	252	311	316	245	283	271	316	294	316	283	294	327	252	300	337	294	289
P71	252	283	224	238	252	265	271	252	231	173	183	238	200	153	258	216	183	183	231	306	252	258	183	289	277	183	231	271	327	238
P72	283	163	163	231	200	258	200	245	245	216	258	183	245	231	283	294	216	271	216	271	200	271	258	216	245	245	316	294	306	216
P73	238	283	216	258	245	265	271	231	245	173	183	231	200	163	252	216	183	183	231	283	252	271	183	283	271	163	115	216	316	231
P74	245	283	271	316	271	316	294	283	327	258	271	258	271	245	337	316	271	283	306	316	327	316	283	306	327	216	294	316	346	283
P75	238	258	163	200	216	271	238	224	191	224	200	200	200	141	216	163	200	163	245	294	245	216	163	231	200	141	271	216	346	141
P76	252	271	183	200	216	245	245	208	245	129	183	200	216	163	183	183	141	141	183	283	216	245	183	216	216	163	231	258	306	200

	606	C1	C2	C3D	C3E	C4	CU	FE	S77	S78	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	15	17	18	19	20	22	23	25	
F77	238	283	200	231	245	289	265	245	224	224	231	231	231	183	238	200	231	200	271	306	265	245	200	258	231	183	231	231	356	183	
F78	245	258	183	231	216	245	245	216	216	141	141	200	163	163	258	183	141	141	200	271	231	200	141	231	245	163	231	231	316	231	
F79	277	258	216	183	245	271	224	252	191	224	200	231	216	163	271	231	200	200	245	306	258	245	200	283	271	183	231	245	337	231	
F80	283	258	191	208	224	238	245	231	200	183	141	208	163	153	258	183	141	141	200	283	224	231	141	265	252	183	258	245	316	238	
F81	231	163	115	216	163	231	191	200	224	163	200	141	183	183	271	245	163	216	200	231	200	258	200	216	216	183	271	245	294	183	
F83	258	245	163	216	200	231	231	200	231	115	163	183	183	183	231	200	115	163	163	258	200	216	163	200	231	183	245	245	294	216	
F84	271	231	115	141	163	231	200	163	231	163	163	141	200	183	200	163	115	115	163	245	200	231	163	163	163	141	271	216	306	183	
F85	231	258	183	231	216	271	245	216	245	163	183	200	200	200	283	216	183	183	231	271	258	271	183	258	245	163	245	231	337	231	
F86	283	258	163	183	200	258	231	200	271	163	216	183	245	231	200	216	163	183	163	271	200	271	216	163	200	200	283	258	306	216	
F87	208	200	141	216	183	245	216	173	245	173	183	163	163	163	231	231	141	200	183	216	216	283	183	231	231	115	258	231	271	163	
F88	258	271	183	200	216	245	245	216	216	141	141	200	183	163	231	141	141	082	200	283	231	216	141	231	216	163	231	231	327	231	
F89	306	258	183	216	216	245	238	216	252	141	231	200	258	208	208	231	183	200	183	306	183	245	231	183	216	238	289	294	283	224	
F90	245	258	183	245	231	252	252	238	173	183	183	216	163	163	252	183	183	183	231	283	224	231	141	271	245	200	216	216	327	200	
F91	316	245	200	163	231	252	208	238	208	216	216	216	231	216	265	245	183	216	216	283	224	216	216	231	258	231	271	271	316	245	
F92	283	283	277	300	277	321	294	294	327	294	283	265	283	252	346	327	283	294	316	327	332	316	294	311	332	231	294	306	356	289	
F93	238	245	173	191	208	265	231	208	258	173	216	191	231	191	245	245	183	216	216	271	238	283	216	238	238	163	216	231	316	191	
F94	231	245	208	238	238	265	258	216	231	141	183	224	163	183	289	231	183	200	231	271	252	271	183	289	277	191	252	258	283	245	
F95	300	216	163	200	163	224	191	216	265	224	231	141	271	183	238	245	200	200	231	283	224	245	245	163	200	183	258	271	327	200	
F96	332	374	306	316	337	346	356	321	294	289	271	327	271	258	283	245	271	245	306	374	327	245	245	316	327	271	258	283	392	294	
F102	271	271	200	245	231	245	258	200	216	141	141	216	163	153	252	183	141	141	200	283	231	245	141	271	258	173	252	245	283	238	
F104	271	271	183	200	216	265	245	173	245	183	183	200	216	191	245	183	183	141	231	271	252	245	183	231	216	153	238	216	306	224	
F105	258	245	200	258	231	271	258	216	258	231	200	216	183	216	294	245	200	216	245	216	258	294	200	283	271	183	216	200	294	245	
F106	306	306	306	231	245	258	271	283	258	271	163	216	245	245	231	245	216	183	183	216	316	245	271	216	258	258	245	271	294	337	271
F107	231	258	163	216	216	271	245	200	200	200	163	200	141	183	245	163	163	163	216	258	245	216	115	231	231	141	271	183	327	183	
F108	337	238	231	271	238	183	238	238	191	271	238	258	258	245	238	238	245	271	238	245	191	231	245	271	216	283	337	294	283	208	
F114	327	208	163	200	153	153	183	163	258	231	224	141	271	216	216	238	200	200	200	216	163	245	245	163	183	216	306	271	283	224	
F115	289	163	163	231	115	191	153	216	238	224	200	141	258	183	265	245	200	231	224	271	224	231	245	163	183	183	294	283	316	163	
F116	306	306	283	327	294	258	316	216	346	294	306	294	306	294	231	337	283	327	245	163	231	383	316	316	306	271	327	316	163	271	
F117	300	283	200	231	245	271	265	252	238	224	245	231	245	200	163	216	200	216	200	316	200	216	216	183	231	231	306	283	316	183	
F118	346	238	231	271	191	115	224	191	277	231	208	216	271	258	208	252	200	245	153	200	153	316	258	231	216	258	316	306	216	252	
F119	346	183	163	183	163	231	163	245	258	245	258	141	294	231	258	271	216	231	216	306	200	231	271	115	200	245	337	306	337	231	
F120	265	163	115	200	115	200	153	191	238	191	200	082	231	141	245	245	163	200	200	258	200	245	216	163	200	141	271	258	306	163	
F121	356	271	216	245	231	200	252	200	289	271	271	231	306	271	200	271	245	258	200	216	163	258	283	183	200	271	346	306	258	245	
F122	365	224	216	231	208	183	208	224	252	283	265	231	316	271	224	265	258	271	224	245	173	271	294	216	163	283	356	316	283	224	
F123	200	216	163	231	200	258	231	200	231	163	163	183	141	183	283	216	163	183	216	231	245	271	163	258	245	141	245	216	306	216	
F125	383	289	271	283	238	216	265	238	332	294	277	258	337	316	252	289	271	283	238	258	238	283	316	200	231	294	365	337	294	289	
F126	327	173	208	238	200	200	173	216	252	271	265	191	271	252	294	311	245	283	245	216	208	258	283	224	265	258	337	306	283	258	
F127	387	277	289	277	258	191	238	271	277	311	289	277	346	277	265	300	294	294	289	271	245	271	327	265	252	306	337	346	294	283	
F128	283	231	163	183	163	231	200	200	271	163	200	141	245	216	245	216	163	163	200	271	231	258	216	163	200	183	271	258	327	231	
F129	283	163	141	200	082	173	141	173	231	183	141	115	216	200	252	200	141	183	173	231	208	271	200	183	163	163	283	245	294	183	
F130	283	183	216	271	163	200	200	231	245	245	163	200	216	231	316	231	216	231	245	231	271	306	231	271	200	200	306	271	306	231	
F131	306	082	173	208	129	200	082	238	200	245	216	153	245	224	311	271	216	258	238	258	231	271	258	224	208	231	327	294	316	208	
F132	216	245	183	245	231	258	258	183	245	183	216	216	163	231	231	231	183	231	216	200	216	306	183	271	258	200	271	216	271	200	
F133	306	238	208	224	231	231	208	216	173	216	208	224	231	183	277	238	216	216	231	283	224	183	216	252	252	224	300	283	294	238	
F135	316	200	183	231	141	173	183	208	245	183	163	163	231	216	224	216	141	200	129	258	173	283	216	183	200	216	294	283	271	216	

272 Anexos

	606	C1	C2	C3D	C3E	C4	CU	FE	S77	S78	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	15	17	18	19	20	22	23	25
P136	294	258	200	216	200	231	231	216	216	231	183	231	231	245	216	141	200	200	216	258	245	283	200	245	115	216	316	245	316	163
P137	258	183	115	183	115	191	163	153	200	163	115	141	183	183	224	163	115	163	153	216	191	258	163	200	141	141	271	216	283	141
P138	245	245	183	231	200	224	231	208	141	183	082	216	115	163	224	082	141	141	191	258	224	245	082	271	200	163	258	200	306	163

	26	27	29	33	34	35	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
P26	000																													
P27	231	000																												
P29	163	216	000																											
P33	231	245	258	000																										
P34	216	294	191	294	000																									
P35	231	231	183	245	245	000																								
P38	231	306	200	200	252	231	000																							
P39	183	306	183	271	224	200	200	000																						
P40	141	258	183	245	183	216	231	163	000																					
P41	216	294	200	271	163	216	231	200	183	000																				
P42	245	316	224	316	082	271	277	252	216	200	000																			
P43	163	245	141	245	141	200	216	216	163	141	183	000																		
P44	183	283	216	200	216	258	183	216	141	216	245	200	000																	
P45	163	216	163	200	224	200	200	183	183	200	252	183	216	000																
P46	231	258	258	271	311	271	283	245	271	283	332	283	294	183	000															
P47	200	231	216	200	216	183	231	216	163	183	245	163	216	141	245	000														
P48	231	245	231	271	231	200	245	216	183	231	258	216	231	216	258	200	000													
P49	231	271	216	258	200	231	231	258	216	231	216	163	258	245	327	200	231	000												
P50	258	306	252	283	200	231	265	224	200	231	216	245	231	252	300	231	200	245	000											
P51	183	271	200	258	163	231	245	200	082	163	200	141	163	200	294	141	200	200	216	000										
P52	200	200	200	258	258	231	283	271	216	216	283	216	245	200	231	216	245	271	245	231	000									
P53	258	327	231	294	173	231	245	200	200	183	208	200	245	231	316	200	245	245	224	183	294	000								
P54	163	258	200	245	277	258	245	200	200	258	300	231	245	200	245	231	271	231	252	231	216	283	000							
P55	231	271	216	283	245	265	277	277	258	231	271	216	283	252	289	271	294	245	258	271	191	277	208	000						
P56	216	258	216	200	245	141	200	183	183	216	271	200	216	183	258	141	183	216	183	200	245	216	231	271	000					
P57	183	245	216	216	183	231	163	115	183	245	200	183	141	231	115	163	245	200	141	216	200	231	283	141	000					
P58	245	258	208	271	245	258	265	265	271	258	258	231	294	208	265	258	271	231	245	283	231	265	208	216	258	271	000			
P59	283	337	258	306	238	258	271	258	258	200	265	231	294	258	306	231	294	258	238	245	245	163	258	208	245	258	238	000		
P60	183	306	183	271	224	200	200	000	163	200	252	216	216	183	245	216	216	258	224	200	271	200	200	277	183	163	265	258	000	
P61	231	306	216	245	208	265	200	208	153	216	238	200	141	216	306	191	238	238	224	129	271	208	238	300	216	191	289	265	208	000
P62	200	245	208	258	141	245	265	238	163	183	183	163	200	173	265	163	200	245	216	141	216	191	265	258	231	163	258	252	238	191
P64	245	306	252	245	200	277	208	271	208	258	216	216	200	252	332	208	252	173	216	191	283	231	258	283	231	238	283	258	271	173
P66	163	258	200	183	231	224	183	208	129	231	258	183	115	200	283	173	224	208	216	153	231	238	191	258	163	173	271	265	208	141
P67	141	245	173	216	183	216	208	191	163	183	216	163	200	129	238	163	245	231	245	183	216	191	208	216	200	163	245	224	191	224
P68	141	245	173	216	183	216	208	191	163	183	216	163	200	129	238	163	245	231	245	183	216	191	208	216	200	163	245	224	191	224
P69	258	327	283	258	294	238	245	208	238	258	316	283	231	258	216	252	238	311	231	265	271	277	277	306	200	208	316	289	208	258
P71	216	294	208	245	216	183	208	173	200	200	245	200	245	191	277	183	245	231	231	216	271	173	238	245	163	183	271	208	173	245
P72	245	258	200	294	231	245	258	216	231	245	258	231	258	183	231	245	183	294	245	245	258	245	271	294	245	216	216	294	216	245
P73	200	283	200	245	200	183	183	183	183	200	216	183	231	200	283	183	200	141	216	200	258	216	231	258	163	183	245	245	183	238

	26	27	29	33	34	35	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
P74	231	337	258	306	271	258	271	200	200	258	294	258	231	283	258	271	245	283	216	231	271	271	245	283	216	231	316	283	200	245
P75	200	245	183	231	224	245	231	231	183	231	252	163	231	183	283	163	258	163	265	163	245	231	163	238	216	216	224	245	231	173
P76	200	216	200	183	245	141	216	200	200	216	271	183	245	163	245	141	200	183	231	216	231	231	200	231	115	163	216	245	200	252
P77	231	271	183	258	191	231	231	231	216	231	208	163	258	216	306	200	258	115	238	200	271	231	200	238	216	245	191	245	231	208
P78	163	258	163	231	200	183	200	183	183	115	231	141	216	163	245	183	231	216	231	200	183	216	200	183	183	183	216	200	183	245
P79	216	294	231	258	238	245	216	216	200	245	265	231	245	200	283	200	245	231	252	216	271	163	231	265	216	200	252	200	216	238
P80	183	271	208	231	216	231	224	208	200	200	245	200	231	153	252	183	271	258	271	216	245	208	238	245	216	183	271	238	208	252
P81	183	245	141	258	173	200	216	163	163	183	208	163	200	141	231	200	163	245	208	183	216	216	231	252	200	163	208	271	163	200
P83	183	231	183	216	216	163	216	200	200	141	245	163	231	141	216	163	200	231	216	216	163	231	216	200	163	163	200	216	200	258
P84	141	163	183	183	231	216	245	245	183	231	258	163	216	141	231	163	216	200	258	200	183	271	183	216	200	183	200	283	245	245
P85	163	258	141	258	183	163	216	200	183	183	216	115	216	200	283	216	216	200	245	200	231	231	231	216	200	216	231	258	200	245
P86	200	163	200	216	245	200	258	258	231	245	271	183	258	183	231	200	183	216	258	245	216	283	231	231	200	216	200	294	258	283
P87	163	231	200	231	200	200	245	183	082	200	231	183	163	163	245	141	141	231	183	115	200	216	216	271	163	082	258	271	183	173
P88	163	231	163	200	216	183	200	200	200	183	245	141	231	163	258	183	245	183	271	216	231	231	200	200	183	200	216	245	200	258
P89	245	216	216	183	277	208	200	238	265	258	300	231	258	163	216	208	224	252	277	277	258	277	238	265	200	224	208	289	238	265
P90	216	283	163	258	153	216	200	200	216	163	173	141	245	163	271	183	258	183	252	200	258	200	245	252	216	216	208	231	200	216
P91	231	271	245	258	224	258	271	258	245	231	238	245	271	183	245	216	271	271	224	258	216	216	245	238	245	216	173	200	258	283
P92	245	346	289	316	283	306	277	238	216	294	306	294	245	289	265	283	258	294	231	245	283	277	252	294	258	245	337	289	238	252
P93	200	245	191	245	200	183	208	208	183	231	231	183	231	191	265	183	141	183	183	200	231	208	224	231	163	183	231	238	208	231
P94	200	294	191	231	163	208	173	163	173	163	200	183	163	191	277	208	224	252	216	191	258	163	258	245	200	173	271	231	163	200
P95	183	231	216	231	265	245	258	216	216	294	277	245	258	183	231	216	245	216	238	245	245	294	141	265	216	216	191	306	216	252
P96	306	337	316	294	327	306	283	316	294	258	346	283	327	283	327	245	316	245	327	283	271	306	271	271	283	283	316	245	316	311
P102	183	271	216	183	245	224	183	208	191	200	271	200	183	163	258	173	265	252	283	208	245	238	238	271	200	173	283	265	208	224
P104	163	231	200	183	216	252	216	252	191	245	231	183	183	200	283	208	265	173	258	208	231	277	191	231	231	224	216	289	252	224
P105	183	283	216	283	163	271	271	231	163	216	141	200	200	216	294	231	245	231	231	183	245	258	258	283	258	200	258	306	231	231
P106	245	258	231	231	271	163	245	245	271	231	294	216	294	200	271	216	258	245	294	283	271	271	271	258	200	231	245	283	245	316
P107	163	245	183	245	183	245	245	245	163	141	216	115	200	183	271	163	245	200	245	141	163	231	200	200	231	200	231	216	245	200
P108	294	258	238	306	289	277	294	294	294	258	306	271	316	216	283	245	316	311	311	283	238	283	283	277	294	271	252	271	294	283
P114	183	216	208	245	283	265	271	245	245	294	300	245	271	183	231	245	271	265	294	271	238	316	183	238	258	245	216	327	245	283
P115	183	216	183	258	277	216	258	200	200	258	300	245	245	183	216	216	231	271	224	231	163	283	141	245	216	200	224	271	200	238
P116	306	283	316	316	316	294	337	306	258	327	316	316	283	294	327	271	245	327	258	271	306	327	327	346	258	245	346	365	306	283
P117	271	231	258	231	289	245	271	271	258	245	311	245	294	183	231	163	245	245	265	245	231	271	216	265	216	216	224	245	271	252
P118	231	183	252	271	311	238	306	271	271	294	327	283	294	216	231	245	258	321	311	294	238	327	283	300	258	231	300	346	271	327
P119	216	216	231	258	306	283	283	258	271	316	327	271	294	183	200	258	258	294	306	294	258	316	200	283	271	258	200	327	258	294
P120	141	231	183	231	252	216	231	163	163	258	277	216	216	141	200	183	200	245	224	200	216	258	141	265	183	163	224	283	163	208
P121	271	200	258	283	316	294	316	316	294	306	332	283	316	231	258	271	283	300	306	306	231	346	245	238	294	283	231	327	316	316
P122	283	183	238	294	321	289	316	316	306	337	337	294	327	231	271	283	294	311	332	316	265	337	271	289	306	294	238	346	316	316
P123	141	258	141	258	141	200	216	163	115	141	183	115	163	183	271	200	183	216	216	141	216	200	231	231	200	163	245	258	163	200
P125	271	200	289	306	351	300	356	337	316	327	365	316	337	283	258	306	306	332	321	337	191	383	258	238	316	306	277	337	337	365
P126	231	294	245	316	277	300	300	238	245	271	294	283	271	224	252	283	271	332	265	271	238	277	238	271	294	245	224	289	238	277
P127	306	283	294	316	365	300	332	300	327	346	365	346	356	277	300	306	346	337	327	346	289	332	252	300	306	306	258	311	300	346
P128	141	200	183	216	245	200	245	216	216	245	271	183	245	183	231	216	216	216	258	245	216	283	183	216	200	216	200	294	216	283
P129	115	163	163	231	245	200	258	216	183	245	271	200	216	163	216	200	216	258	258	216	163	283	200	252	216	183	245	306	216	258
P130	163	216	183	294	245	245	283	216	183	245	271	231	216	231	283	258	258	294	283	216	216	283	245	283	271	216	306	327	216	258
P131	200	245	191	294	258	258	277	208	216	271	283	258	245	191	238	258	245	316	271	245	231	252	238	300	271	216	231	300	208	252
	26	27	29	33	34	35	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61

274 Anexos

26 27 29 33 34 35 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61
P132 216 258 200 271 153 216 258 231 183 163 183 141 216 200 283 183 183 224 224 163 231 216 283 271 216 183 252 271 231 216
P133 231 294 216 245 271 271 208 231 238 231 294 245 231 191 265 238 300 289 283 252 238 231 216 231 258 238 216 216 231 231
P135 183 163 216 231 283 200 271 231 231 258 306 245 258 163 183 200 216 294 283 258 200 294 245 289 216 183 271 316 231 294
P136 231 115 200 245 258 231 294 306 245 258 283 200 271 216 294 200 271 231 306 231 200 294 258 258 258 245 258 306 306 271
P137 141 141 141 216 216 183 245 231 163 216 245 163 200 141 231 163 200 231 245 183 141 258 216 238 200 163 231 283 231 231
P138 183 216 163 231 200 200 231 231 183 163 231 141 216 163 271 141 258 216 283 163 200 216 245 252 216 183 271 245 231 216
26 27 29 33 34 35 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61

62 64 66 67 68 69 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95
P62 000
P64 216 000
P66 216 163 000
P67 163 216 183 000
P68 163 216 183 000 000
P69 283 294 231 271 271 000
P71 231 238 208 141 141 252 000
P72 200 306 271 245 245 283 271 000
P73 245 191 191 183 183 252 163 271 000
P74 283 283 216 271 271 141 258 294 245 000
P75 208 200 173 191 191 311 224 258 216 283 000
P76 231 252 191 183 183 238 163 245 163 258 183 000
P77 238 200 208 224 224 311 224 258 183 283 115 183 000
P78 216 258 200 141 141 245 163 245 163 245 216 163 216 000
P79 224 200 208 153 153 289 173 271 183 283 216 216 245 216 000
P80 200 245 216 082 082 283 115 271 200 294 224 200 252 163 173 000
P81 153 265 216 191 191 245 224 115 216 245 216 200 216 183 245 224 000
P83 200 271 216 163 163 231 183 216 183 258 231 141 231 082 231 183 163 000
P84 183 245 183 163 163 283 231 231 216 283 163 141 200 183 231 200 183 163 000
P85 216 258 200 183 183 271 200 231 183 245 216 183 200 141 245 216 163 163 183 000
P86 216 283 231 216 216 283 245 200 231 294 216 141 216 200 271 245 183 163 115 183 000
P87 141 224 153 183 183 224 216 200 200 216 200 183 231 200 216 216 141 183 163 200 200 000
P88 231 258 200 141 141 271 163 258 163 271 183 115 183 115 216 163 200 141 141 141 163 216 000
P89 252 283 238 224 224 265 231 200 238 316 224 153 224 216 265 238 200 183 183 231 141 238 183 000
P90 208 224 231 173 173 294 191 231 163 294 183 200 141 163 231 191 183 183 216 183 231 231 163 216 000
P91 208 252 258 173 173 294 224 245 231 316 258 231 258 200 183 191 231 183 216 258 245 231 231 245 216 000
P92 271 245 231 258 258 200 271 316 258 141 289 294 311 283 238 283 277 294 294 294 327 231 306 342 321 300 000
P93 183 191 191 183 183 252 183 216 163 245 208 163 208 200 173 216 173 183 183 183 183 163 200 216 224 224 231 000
P94 183 224 191 141 141 224 153 231 191 245 245 208 245 163 200 163 173 183 231 183 245 191 183 224 191 224 258 191 000
P95 252 245 208 224 224 277 252 245 216 271 183 183 183 245 245 252 216 231 163 245 200 200 216 208 231 231 277 208 271 000
P96 316 277 289 271 271 332 258 374 245 337 258 258 283 245 258 258 337 258 283 316 316 306 258 311 283 294 316 283 311 316
P102 231 238 173 141 141 252 153 283 191 283 224 191 252 163 208 115 231 183 200 216 245 208 163 216 200 231 294 238 163 252
P104 231 191 153 183 183 289 238 283 191 283 173 191 173 200 238 216 231 216 141 200 200 208 163 216 200 231 294 224 216 173
P105 200 231 216 200 200 294 258 258 200 271 245 258 231 216 258 231 200 231 216 216 258 183 231 294 200 231 283 245 216 231
P106 271 316 271 216 216 283 183 271 216 316 258 141 245 183 271 200 231 163 200 183 183 258 141 183 216 258 356 231 231 258
P107 163 216 183 163 163 294 231 258 216 271 163 216 200 141 231 200 200 163 163 183 216 183 183 258 183 216 283 216 216 245
62 64 66 67 68 69 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95

	62	64	66	67	68	69	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
P100	258	311	306	258	258	346	294	258	300	365	258	283	277	258	283	271	258	245	271	306	294	283	283	271	238	238	365	294	294	289
P114	252	294	245	224	224	306	277	245	265	306	216	216	238	245	271	252	216	231	163	245	200	231	216	216	252	252	311	238	277	153
P115	238	271	208	224	224	252	252	231	245	245	216	216	245	216	245	252	200	200	200	245	231	183	245	238	258	231	252	208	258	163
P116	283	306	271	316	316	306	327	294	306	306	316	294	327	327	327	337	283	306	294	327	294	231	337	316	337	327	316	283	316	294
P117	238	271	252	238	238	300	252	245	258	327	183	183	216	231	258	252	245	200	200	283	200	231	231	173	231	231	332	238	283	216
P118	271	332	283	245	245	294	283	271	277	327	306	245	321	258	294	258	258	231	231	283	231	245	258	245	289	265	337	271	283	252
P119	258	316	271	245	245	316	294	183	294	327	231	231	258	271	271	271	216	245	183	271	183	245	245	183	271	245	327	245	294	163
P120	208	245	173	191	191	238	224	200	216	231	183	183	216	216	216	224	163	200	163	216	200	141	216	208	231	231	238	173	231	115
P121	277	327	294	277	277	346	321	258	311	356	258	258	277	271	316	300	258	245	216	294	216	271	271	231	289	265	361	277	321	238
P122	283	332	306	283	283	365	327	231	321	374	258	271	277	306	306	306	258	283	231	306	231	283	283	231	289	277	374	283	327	238
P123	163	245	183	163	163	245	200	200	183	216	216	200	216	141	231	200	115	163	183	115	200	141	163	245	183	245	258	183	141	245
P125	316	361	316	306	306	327	346	316	332	337	316	283	332	283	346	327	306	258	245	316	245	294	294	283	342	289	346	306	346	265
P126	245	321	283	258	258	294	306	216	300	294	289	294	306	258	265	283	208	245	258	283	283	231	294	289	283	216	294	271	271	245
P127	346	351	321	306	306	342	316	327	316	356	300	283	311	306	289	316	321	294	294	346	316	316	306	294	321	265	356	316	342	252
P128	231	283	216	200	200	258	231	231	216	258	216	141	216	183	258	231	183	163	115	163	115	200	141	183	231	245	294	183	231	163
P129	200	271	200	183	183	258	245	231	231	258	231	200	258	200	245	216	183	183	141	200	183	163	200	231	245	231	271	200	231	183
P130	231	294	231	216	216	283	271	271	258	258	271	271	294	231	271	245	216	245	231	231	271	200	245	306	271	283	271	258	231	258
P131	216	306	258	231	231	283	283	183	283	283	265	271	289	258	238	258	173	245	231	258	258	200	271	265	265	224	283	245	245	224
P132	141	252	231	216	216	271	245	200	224	271	231	216	224	200	271	245	141	183	200	183	200	163	216	245	191	252	306	200	200	265
P133	258	265	224	200	200	289	238	258	252	306	231	252	258	200	200	216	238	216	245	258	283	252	231	238	224	191	306	265	216	258
P135	231	306	245	200	200	258	245	231	245	294	271	200	294	216	258	216	216	183	183	245	183	200	216	200	258	231	306	231	245	216
P136	216	271	245	231	231	337	283	283	271	337	200	216	231	245	283	258	245	231	163	245	200	231	216	245	245	271	346	245	283	245
P137	163	245	183	163	163	271	231	216	216	271	200	183	231	183	231	200	163	163	115	183	163	141	183	216	216	216	283	183	216	200
P138	183	231	200	141	141	294	200	271	200	294	183	200	216	163	216	163	216	183	183	200	231	200	163	245	163	231	306	231	200	258

	96	102	104	105	106	107	108	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	125	126	127	128	129	130	131	132	133	135	136	137	138		
P96	000																															
P102	252	000																														
P104	289	183	000																													
P105	337	231	183	000																												
P106	283	200	245	294	000																											
P107	245	200	183	200	258	000																										
P108	316	283	300	306	306	245	000																									
P114	337	258	208	258	258	245	238	000																								
P115	306	252	238	258	283	216	238	191	000																							
P116	392	327	316	283	356	316	294	271	283	000																						
P117	245	252	252	306	245	216	231	245	216	306	000																					
P118	356	258	277	283	271	283	231	191	224	231	271	000																				
P119	356	283	245	294	271	271	271	163	200	327	216	245	000																			
P120	316	224	208	231	258	216	271	163	115	271	216	231	163	000																		
P121	337	306	265	306	294	258	200	163	231	245	216	200	216	245	000																	
P122	374	316	277	316	306	294	183	173	238	271	245	200	183	245	141	000																
P123	316	200	200	163	231	163	294	245	231	294	283	271	271	200	294	306	000															
P125	337	327	289	327	316	283	258	208	224	283	271	183	258	271	163	216	316	000														

96 102 104 105 106 107 108 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 125 126 127 128 129 130 131 132 133 135 136 137 138

276 Anexos

96 102 104 105 106 107 108 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 125 126 127 128 129 130 131 132 133 135 136 137 138
F126 365 294 289 258 327 258 224 191 200 271 289 238 231 208 224 238 245 252 000
F127 346 321 311 337 327 327 216 216 231 283 277 231 271 265 224 216 346 231 224 000
F128 316 231 183 245 183 216 306 163 200 316 245 231 183 163 245 258 183 245 258 294 000
F129 327 216 200 216 245 200 265 173 141 283 258 173 200 141 245 238 183 224 224 277 141 000
F130 356 245 245 216 306 231 283 245 200 294 327 216 283 216 294 283 183 271 245 306 231 141 000
F131 374 271 271 245 306 258 252 216 173 306 289 238 200 173 277 238 216 289 153 265 231 163 183 000
F132 327 245 238 200 245 183 258 245 258 258 258 283 231 271 283 141 306 245 337 216 216 245 245 000
F133 289 200 231 271 283 216 208 238 224 327 245 277 258 231 252 265 245 300 200 245 271 252 271 224 283 000
F135 327 216 245 258 231 245 265 208 183 283 231 129 200 183 245 238 231 224 252 277 183 115 200 200 245 265 000
F136 306 258 216 271 258 200 231 231 231 306 231 231 258 245 231 216 245 245 306 294 216 183 216 258 231 283 216 000
F137 306 200 183 200 231 163 238 191 163 271 231 191 216 163 231 224 163 238 238 289 163 082 163 183 183 238 141 141 000
F138 258 163 200 216 231 141 224 252 231 316 231 238 283 231 283 277 183 300 289 311 231 183 200 245 200 224 200 163 141 000
96 102 104 105 106 107 108 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 125 126 127 128 129 130 131 132 133 135 136 137 138

ANEXO IV. MATRIZ DE DISTANCIAS DE NEI.

Matriz de distancias de Nei ($\times 10^{-4}$) entre los cultivares, representados aquí por su abreviatura.

	AA	AP	AG	JOY	CA	CM	PI	MA	ME	PC	PF	PAM	BA	BO	BE	CH	CY	LO	PI	BA	BP	WE	B1	B2	B3	B6	CL	CO	CH	CH		
AA	000																															
AG	014	000																														
AP	152	171	000																													
JOY	029	044	105	000																												
CA	326	312	390	272	000																											
CM	326	312	390	272	000	000																										
PI	403	369	430	345	030	030	000																									
MA	303	350	479	345	070	070	070	000																								
ME	403	350	450	345	051	051	051	134	000																							
PC	391	356	365	331	095	095	053	140	053	000																						
PF	439	306	474	400	061	061	007	049	007	146	000																					
PAM	440	393	403	400	050	050	024	076	050	077	061	000																				
BA	277	263	346	200	079	079	135	150	093	142	129	174	000																			
BO	260	201	291	200	195	195	210	242	210	190	231	235	137	000																		
BE	230	240	304	172	255	255	255	239	200	235	307	312	150	079	000																	
CH	272	293	304	204	163	163	192	200	134	140	259	240	093	150	223	000																
CY	306	311	203	233	104	104	216	200	104	163	236	273	002	141	095	153	000															
LO	320	306	390	205	030	030	077	064	090	137	049	062	091	140	235	175	197	000														
PI	303	350	417	300	070	070	070	134	051	001	101	130	052	100	200	105	124	110	000													
BA	260	245	365	192	150	150	135	195	121	127	216	174	100	094	093	135	111	162	107	000												
BP	330	324	392	202	137	137	102	197	094	114	144	191	110	169	229	137	143	179	094	169	000											
WE	410	425	372	350	137	137	152	102	122	114	150	191	124	124	229	167	120	149	000	139	097	000										
B1	440	454	346	400	202	202	240	107	217	195	166	241	219	204	240	312	163	105	107	219	176	090	000									
B2	319	324	270	264	246	246	262	229	262	243	234	206	169	067	000	262	113	194	197	139	220	126	104	000								
B3	477	404	390	436	203	203	300	205	300	247	241	292	304	223	235	405	197	264	267	239	250	135	037	092	000							
BE	351	374	320	279	107	107	217	312	130	134	204	272	090	145	217	050	091	199	102	117	132	104	211	191	292	000						
CL	205	306	264	217	175	175	235	267	175	215	211	292	070	105	146	090	107	107	090	133	106	106	170	120	240	000	000					
CO	302	323	352	236	210	210	240	335	153	107	307	295	006	113	101	040	114	194	126	113	156	156	295	105	302	023	005	000				
CH	302	323	352	236	210	210	240	335	153	107	307	295	006	113	101	040	114	194	126	113	156	156	295	105	302	023	005	000	000			
CH	369	393	243	297	217	217	279	312	217	195	253	336	117	145	107	150	091	229	130	174	147	090	100	104	170	074	062	123	123	000		
BE	255	250	210	100	239	239	200	322	255	269	259	346	135	150	163	105	104	220	163	210	197	229	279	167	369	107	064	153	153	150		
BE	272	250	269	204	105	105	140	177	163	106	114	107	093	150	177	134	200	110	092	165	167	102	232	102	317	217	090	210	210	150		
BE	403	369	430	345	030	030	000	070	051	053	007	024	135	210	255	192	216	077	070	135	102	152	240	262	300	217	235	240	240	279		
BE	364	350	390	300	025	025	013	092	051	067	007	024	121	100	239	163	200	064	092	121	167	152	232	246	203	107	205	210	210	240		
AE	302	323	352	236	210	210	240	335	153	107	307	295	006	113	101	040	114	194	126	113	156	156	295	105	302	023	005	000	000	123		
EA	357	343	410	302	030	030	051	104	030	079	074	062	070	133	220	110	151	050	051	070	120	070	156	194	232	115	130	130	130	170		
BE	233	253	199	169	235	235	300	334	267	201	272	350	133	133	175	090	197	217	175	207	194	226	292	179	301	170	050	130	130	142		
BE	396	343	470	339	030	030	064	077	030	093	049	062	064	239	203	146	101	050	051	162	135	149	229	274	312	170	107	194	194	229		
BE	301	206	412	220	122	122	152	213	000	114	100	191	095	233	246	094	159	194	066	124	002	156	230	253	291	104	120	127	127	161		
M4	267	219	390	200	146	146	146	205	110	167	102	170	105	140	160	160	101	130	110	051	226	210	292	179	346	170	107	130	130	229		
M5	262	231	422	213	296	296	312	240	279	293	253	336	219	174	150	312	240	244	217	131	230	230	211	132	229	304	199	264	264	241		
M7	272	240	450	221	239	239	255	177	223	235	199	279	195	195	177	200	200	220	177	107	102	197	107	167	205	279	205	271	271	240		
	AA	AP	AG	JOY	CA	CM	PI	MA	ME	PC	PF	PAM	BA	BO	BE	CH	CY	LO	PI	BA	BP	WE	B1	B2	B3	B6	CL	CO	CH	CH		

M10	282	260	372	229	229	229	229	197	229	209	203	206	185	217	229	197	240	210	137	185	180	180	222	204	274	254	149	245	245	222
M14	255	223	304	188	239	239	255	255	223	252	229	312	135	135	119	200	169	220	134	107	197	182	217	100	267	217	090	181	181	150
M16	285	270	371	217	267	267	267	235	267	264	272	350	192	207	160	251	197	200	146	133	226	179	199	149	217	260	130	252	252	199
M17	245	231	462	197	296	296	312	217	312	293	299	370	219	204	172	312	209	244	240	145	270	254	272	191	292	304	260	264	264	304
M19	297	240	462	245	240	240	279	217	217	259	194	272	204	204	187	312	240	229	187	117	191	222	182	161	199	304	199	295	295	241
M23	262	231	422	213	296	296	312	240	279	293	253	336	219	174	150	312	240	244	217	131	230	230	211	132	229	304	199	264	264	241
M25	314	300	442	245	240	240	240	217	279	259	253	336	235	299	240	279	273	292	150	174	254	222	241	254	260	336	199	360	360	272
LPL	400	433	365	332	187	187	240	263	187	195	223	304	117	189	232	150	185	229	116	174	118	104	154	191	229	100	080	150	150	074
LPP	326	275	340	255	092	092	185	140	078	140	101	130	065	165	192	134	130	104	065	093	152	152	240	197	334	150	110	153	153	187
M1	314	299	328	242	135	135	165	210	093	142	171	204	053	182	226	039	111	140	065	137	110	154	283	233	374	063	070	060	060	145
M2	277	263	389	200	065	065	107	150	093	142	129	145	039	182	210	065	141	078	065	137	169	169	283	233	374	117	105	113	113	174
M3	371	396	389	314	389	389	380	344	275	291	311	405	190	190	275	100	172	287	210	262	185	154	174	154	192	145	105	169	169	117
M4	371	396	328	295	121	121	180	195	150	150	157	235	080	152	226	121	096	162	079	167	110	067	145	154	192	090	078	140	140	063
M5	326	350	304	272	185	185	163	163	134	170	114	187	093	150	223	105	153	118	078	180	094	094	130	167	205	130	038	153	153	182
M6	383	389	359	345	119	119	140	119	134	155	087	158	135	180	271	163	200	104	092	226	100	094	116	182	190	187	090	210	210	150
M8	380	393	402	314	144	144	172	202	130	149	166	241	076	204	232	182	133	185	037	189	090	184	197	206	276	100	062	123	123	100
M9	339	362	316	267	118	118	175	205	175	215	154	229	105	133	205	146	166	150	090	162	149	092	170	149	217	170	050	194	194	115
M10	285	306	264	217	175	175	235	267	175	215	211	292	070	105	146	090	187	187	090	133	186	186	170	120	240	080	080	085	085	062
M11	242	220	274	175	121	121	165	210	121	174	186	204	039	123	150	065	111	105	093	180	169	169	283	169	374	090	070	060	060	145
M12	357	343	371	285	090	090	132	160	090	137	100	170	051	162	190	110	121	130	025	133	078	092	156	164	232	115	050	130	130	080
M13	260	281	389	200	079	079	150	121	150	150	115	174	094	137	195	121	141	091	121	152	110	124	174	217	255	174	105	190	190	174
M14	320	343	353	250	132	132	205	205	146	183	196	260	064	223	251	064	187	173	090	192	186	149	260	274	346	080	076	111	111	142
M15	308	330	304	230	092	092	134	192	185	140	156	187	065	150	208	051	124	132	051	121	180	094	187	197	267	076	038	099	099	182
M16	290	312	340	238	078	078	163	134	134	170	142	187	065	180	223	105	124	090	105	180	122	122	187	229	267	130	090	153	153	150
M17	383	350	417	326	051	051	051	078	051	081	049	076	079	150	200	163	153	064	025	107	100	066	130	167	205	158	118	181	181	158
M18	320	343	299	250	118	118	175	205	146	183	154	229	078	162	205	090	136	158	064	162	186	186	170	179	240	115	025	138	138	080
M19	290	275	286	221	065	065	092	140	105	155	181	130	065	150	192	105	169	077	065	121	182	152	232	182	317	158	090	153	153	158
M21	339	324	371	267	051	051	077	132	064	108	087	115	051	133	175	118	121	089	025	078	186	078	156	164	232	115	076	138	138	115
M22	319	305	315	282	094	094	122	122	080	129	075	104	095	124	229	108	174	051	094	154	111	111	147	156	226	132	092	127	127	161
M23	233	253	299	169	132	132	205	205	175	215	196	260	038	185	132	090	079	116	118	133	149	164	260	149	346	088	076	068	068	115
M24	295	318	346	242	150	150	218	180	150	158	157	235	188	123	188	121	096	162	187	137	053	095	131	169	192	117	078	140	140	117
M25	339	362	316	285	146	146	205	205	146	183	154	229	185	133	205	118	136	158	090	162	078	078	115	149	187	115	025	138	138	080
M26	339	324	316	267	090	090	132	160	118	167	180	170	078	162	198	146	151	138	051	133	128	186	156	164	232	170	050	194	194	115
M27	285	306	334	217	077	077	118	175	118	122	140	170	078	185	168	090	136	116	064	091	186	092	170	179	240	115	076	138	138	115
M28	314	336	311	245	138	138	187	282	158	195	166	241	090	131	172	138	185	170	089	117	184	090	154	161	229	127	037	150	150	180
M29	314	299	389	242	121	121	165	195	121	142	129	204	080	167	195	093	156	162	052	152	081	124	189	281	271	145	051	169	169	117
M30	351	336	328	279	076	076	116	144	130	179	086	154	090	204	232	158	193	115	063	174	161	147	197	286	276	211	088	235	235	154
M31	297	318	311	229	158	158	217	248	158	195	194	272	063	090	138	182	091	170	076	117	090	090	154	184	229	074	812	872	872	049
M32	298	312	359	255	163	163	223	163	223	218	142	217	218	226	384	177	388	146	192	258	167	213	187	262	235	279	175	383	383	240
M33	242	263	274	175	093	093	150	195	121	158	186	284	039	123	165	039	096	185	079	188	139	124	235	185	321	063	051	068	068	117
M34	339	324	334	267	051	051	077	132	090	137	087	115	078	192	235	118	181	089	051	133	164	135	214	226	296	170	183	194	194	170
M35	357	381	316	285	190	190	235	283	285	183	256	292	162	177	235	146	151	232	168	148	164	135	199	242	288	142	138	194	194	142
M36	400	348	377	326	181	181	114	156	114	176	111	139	129	295	324	170	236	140	181	186	218	218	315	332	405	253	182	276	276	284
M37	388	374	422	314	089	089	116	172	076	120	125	154	063	235	279	076	163	128	037	174	118	147	256	270	341	180	115	123	123	154
M38	345	330	378	272	065	065	092	148	051	095	181	138	039	158	192	078	189	184	013	093	088	088	172	182	251	076	064	099	099	182
M39	332	318	328	260	079	079	187	165	065	112	115	145	053	167	218	065	126	119	026	188	095	095	189	281	271	098	051	113	113	117

AA AP AQ JOY CA CM CZ MA ME PE PF PAE BA BO BE CE CF LG FZ GA GP WH BI B2 B3 B8 CL CO CH CM

	AA	AP	AG	JOY	CA	CM	PI	MA	ME	PC	PB	PAN	BA	BO	BE	CH	CE	LO	PI	BA	OP	WE	BI	BZ	B3	BS	CL	CO	CH	CR
F410	403	389	438	345	051	051	013	092	070	067	114	050	150	210	239	192	200	090	092	150	197	152	232	246	203	217	235	240	240	279
P604	383	369	398	308	192	192	200	239	163	106	199	279	093	121	140	163	109	205	065	150	122	000	172	094	220	130	064	126	126	102
P606	403	369	438	345	030	030	013	092	051	067	007	024	135	210	239	192	200	077	092	135	102	167	232	246	203	217	235	240	240	279
CA	262	202	293	197	150	150	217	240	107	195	194	272	090	063	102	130	119	170	102	103	104	104	154	104	229	127	037	123	123	074
CE	272	293	304	204	092	092	134	192	105	140	156	107	039	093	140	051	095	104	051	093	100	094	107	137	267	050	030	040	040	076
CEBD	205	306	353	217	132	132	205	205	146	103	196	260	030	162	190	064	079	144	090	162	106	149	260	210	346	062	076	060	060	115
CEBE	238	250	304	172	140	140	223	239	163	170	213	279	052	079	105	070	000	160	092	107	000	100	107	137	267	076	030	073	073	076
CA	195	215	270	131	213	213	262	296	197	193	202	320	124	110	137	066	143	226	137	001	126	156	222	172	274	104	065	100	100	132
CU	238	250	304	172	140	140	223	239	163	170	213	279	052	079	105	070	000	160	092	107	000	100	107	137	267	076	030	073	073	076
PE	247	250	372	179	122	122	122	102	100	114	203	191	001	139	167	066	120	135	066	053	156	126	230	100	291	077	120	073	073	161
BP77	272	293	304	204	092	092	163	177	163	170	156	217	079	195	223	070	169	132	092	195	137	167	240	262	334	150	090	101	101	150
BP78	301	305	315	247	094	094	094	152	000	099	144	132	001	124	213	052	143	070	066	110	141	097	206	100	291	077	092	073	073	161
P1	290	312	322	221	105	105	134	223	105	110	199	107	093	150	223	025	153	146	070	107	122	122	240	262	334	076	090	099	099	150
P2	205	306	316	217	132	132	175	235	110	152	196	229	051	070	132	064	079	144	064	070	092	070	170	120	240	037	025	035	035	062
P3	326	340	340	257	061	061	007	170	114	146	150	139	101	106	259	007	190	100	007	129	203	144	253	265	336	139	126	162	162	194
P4	332	310	320	260	079	079	107	165	065	112	115	145	053	167	210	065	126	119	026	100	095	095	109	201	271	090	051	113	113	117
P5	255	240	340	100	192	192	200	271	163	202	259	240	121	226	255	065	216	175	140	150	246	279	399	279	463	130	175	099	099	240
P6	332	355	365	262	130	130	150	240	130	134	223	211	117	235	312	024	209	170	102	109	161	191	336	355	430	100	142	123	123	211
P7	272	293	206	204	105	105	134	223	105	140	199	107	065	121	192	025	124	110	070	093	152	122	240	197	334	050	064	040	040	130
P8	351	374	365	279	130	130	150	240	102	134	223	211	090	204	279	024	140	170	076	145	132	132	272	206	350	049	000	072	072	154
P10	221	240	269	156	163	163	192	200	163	106	259	240	093	107	177	030	153	146	134	093	197	102	312	197	405	076	090	040	040	150
P11	213	231	402	150	107	107	217	240	217	227	204	272	174	174	107	150	209	199	107	063	254	222	272	222	292	102	199	177	177	241
P12	179	190	243	115	102	102	229	262	197	226	249	206	095	110	137	066	143	164	137	095	100	100	254	141	300	104	065	073	073	132
P13	420	454	259	351	217	217	279	312	217	195	253	336	145	267	312	130	140	260	130	267	161	132	154	222	229	100	000	177	177	049
P15	332	355	346	262	076	076	102	107	102	134	166	154	090	204	279	050	170	115	076	145	176	147	272	206	350	100	115	123	123	102
P17	314	336	276	245	232	232	279	346	107	195	299	336	090	117	172	076	091	214	130	145	147	132	211	132	292	024	062	023	023	049
P18	267	200	334	200	190	190	235	300	175	152	256	292	105	133	190	030	166	202	110	162	106	179	292	242	301	000	103	005	005	142
P19	357	343	410	205	064	064	077	160	030	079	126	115	051	162	220	064	121	103	025	070	106	092	214	226	296	062	103	005	005	142
P20	431	417	445	371	100	100	195	226	150	206	216	204	190	230	362	100	220	192	165	190	233	154	203	266	271	204	223	227	227	299
P22	369	393	462	297	130	130	150	217	150	195	223	211	145	235	312	130	209	170	130	174	230	176	304	206	324	154	199	177	177	241
P23	245	231	402	101	279	279	240	279	279	259	340	336	235	235	217	217	273	260	217	117	355	206	370	254	393	272	260	235	235	336
P25	277	263	320	200	079	079	107	165	093	112	115	145	053	137	100	065	156	091	052	123	124	154	251	201	339	117	105	113	113	145
P26	344	367	395	274	114	114	142	229	007	117	206	194	075	129	199	061	103	154	061	075	102	075	194	203	272	036	074	059	059	112
P27	257	276	340	193	229	229	259	350	199	176	327	315	129	129	199	036	190	211	170	157	173	234	302	265	479	006	154	059	059	194
P29	295	310	346	242	079	079	121	150	093	097	115	145	000	100	195	065	141	091	065	123	067	001	145	105	223	090	070	113	113	117
P33	303	369	370	300	192	192	134	223	134	110	259	217	121	210	223	070	153	205	070	150	197	167	346	262	405	102	146	099	099	217
P34	320	343	371	267	051	051	090	090	110	152	007	115	105	177	251	146	151	063	104	140	164	135	105	226	240	170	150	194	194	199
P35	301	206	333	264	100	100	122	152	000	099	116	104	124	124	246	000	207	065	122	139	126	141	206	220	291	132	149	127	127	222
P38	410	404	412	350	122	122	100	137	100	114	130	161	124	105	279	137	190	135	052	105	141	060	191	204	242	161	120	105	105	191
P39	345	330	340	290	092	092	119	140	070	125	101	130	093	121	192	134	130	104	065	093	094	066	116	152	190	130	064	153	153	130
P40	351	336	402	279	050	050	063	144	050	091	112	100	063	145	202	102	133	000	037	063	132	090	197	206	276	100	115	123	123	154
P41	357	301	299	302	064	064	090	146	110	122	126	115	133	192	300	110	197	076	110	162	210	120	170	242	240	142	150	194	194	170
P42	332	355	303	279	009	009	130	116	150	195	125	154	145	219	279	107	163	101	144	174	206	176	211	254	260	211	199	235	235	241
P43	351	374	402	297	050	050	076	130	076	105	112	100	090	174	279	076	170	062	076	145	147	110	211	254	292	100	142	123	123	102
P44	400	306	453	326	007	007	061	142	007	009	150	139	101	106	229	142	160	126	036	101	173	000	223	234	303	139	154	162	162	194
	AA	AP	AG	JOY	CA	CM	PI	MA	ME	PC	PB	PAN	BA	BO	BE	CH	CE	LO	PI	BA	OP	WE	BI	BZ	B3	BS	CL	CO	CH	CR

	AA	AP	AS	JOK	CA	CM	PI	MA	ME	PC	PÉ	PAE	BA	BO	BE	CH	CE	LO	PI	BA	OP	WE	BI	B2	B3	BO	CL	CO	CH	CH
P45	260	201	256	192	107	107	150	210	121	150	171	204	053	100	165	039	111	119	065	100	124	110	204	154	207	063	025	060	060	090
P46	320	343	247	250	251	251	300	369	235	247	320	350	133	133	190	110	136	232	175	162	210	164	229	149	312	000	076	005	005	000
P47	300	293	322	230	070	070	092	177	070	125	142	130	065	100	239	051	169	090	065	121	102	167	296	246	307	102	110	099	099	107
P48	300	293	359	255	105	105	119	177	105	155	142	130	093	065	177	134	169	064	119	093	197	122	232	122	203	130	146	099	099	107
P49	423	409	479	364	105	105	119	163	070	125	142	130	121	242	357	105	200	110	092	195	167	152	279	296	317	130	205	153	153	240
P50	350	305	333	301	094	094	100	100	000	114	075	104	095	169	213	197	113	070	094	110	156	126	147	156	210	161	179	105	105	161
P51	362	340	414	291	036	036	040	120	061	103	090	006	075	106	244	114	175	074	040	101	173	130	230	249	320	139	154	162	162	194
P52	326	350	252	255	163	163	192	200	163	110	259	240	121	150	223	070	124	175	134	135	102	122	107	197	267	050	146	099	099	076
P53	326	312	359	272	030	030	092	065	105	155	049	102	079	210	255	163	169	051	092	100	152	152	202	246	203	217	146	240	240	217
P54	416	401	371	339	160	160	190	251	090	100	196	229	070	192	235	090	093	202	051	133	070	070	156	194	232	037	076	005	005	062
P55	403	430	340	345	177	177	223	239	163	125	213	240	150	242	339	119	130	190	140	210	137	122	150	262	235	076	175	153	153	102
P56	351	299	365	295	093	093	093	150	039	097	101	090	000	167	242	093	172	070	065	100	139	139	235	217	321	117	133	113	113	204
P57	290	275	304	221	070	070	092	177	070	125	142	130	065	121	177	070	130	090	065	065	167	122	232	102	317	102	090	099	099	150
P58	301	324	270	247	152	152	229	197	167	177	100	254	001	169	213	100	003	135	122	201	126	126	147	156	210	077	092	100	100	077
P59	411	396	291	351	107	107	165	135	150	142	115	174	123	296	344	100	156	119	135	262	105	154	160	266	239	174	192	250	250	145
P60	345	330	340	290	092	092	119	140	070	125	101	130	093	121	192	134	130	104	065	093	094	066	116	152	190	130	064	153	153	130
P61	300	355	421	314	050	050	050	102	076	105	073	100	076	204	232	150	170	000	024	131	161	110	211	222	292	102	142	206	206	102
P62	279	300	320	213	063	063	102	144	130	164	125	154	063	131	107	102	133	075	009	117	176	147	241	191	324	127	115	123	123	154
P64	411	376	467	332	093	093	093	121	093	127	115	145	094	246	292	150	156	133	052	167	169	139	203	266	321	174	192	190	190	235
P66	396	362	450	320	077	077	064	146	030	065	126	115	064	192	235	090	136	116	012	091	120	092	229	242	312	000	130	111	111	170
P67	300	330	322	230	092	092	134	177	105	140	156	107	065	165	223	051	109	132	065	121	100	100	217	229	300	076	064	099	099	130
P68	300	330	322	230	092	092	134	177	105	140	156	107	065	165	223	051	109	132	065	121	100	100	217	229	300	076	064	099	099	130
P69	423	309	359	364	177	177	163	223	134	140	199	107	165	100	255	192	104	160	134	135	213	122	107	197	267	150	175	101	101	107
P71	351	337	320	295	107	107	135	150	093	142	115	145	100	214	292	093	172	119	093	167	124	139	219	266	304	145	105	169	169	204
P72	262	202	276	213	130	130	107	107	107	227	139	211	090	063	130	150	140	000	130	145	161	132	154	077	229	154	062	123	123	100
P73	364	350	370	306	095	095	109	153	066	116	131	119	111	172	203	095	161	107	000	126	143	090	209	223	245	119	136	142	142	209
P74	501	445	474	439	142	142	142	199	007	117	150	139	157	216	291	229	190	154	114	129	173	116	166	234	241	166	211	217	217	194
P75	300	374	422	314	009	009	116	172	076	120	125	154	063	235	279	076	163	120	037	174	110	147	256	270	341	100	115	123	123	154
P76	332	310	346	277	121	121	135	195	065	112	157	145	000	167	250	039	156	105	079	137	124	139	251	233	339	063	105	060	060	174
P77	303	369	417	326	092	092	119	134	070	125	101	130	093	242	304	105	169	104	065	195	122	152	217	262	203	130	146	153	153	107
P78	351	376	291	295	093	093	121	100	093	097	157	145	100	167	275	065	141	105	093	137	139	001	145	217	223	063	105	113	113	117
P79	330	324	372	264	094	094	152	152	100	161	130	191	053	105	229	100	113	135	066	154	111	111	230	220	291	132	092	156	156	161
P80	320	343	299	250	132	132	175	220	146	103	196	229	105	207	267	064	151	173	104	162	149	149	260	274	346	115	076	130	130	170
P81	272	293	304	221	065	065	105	134	105	140	101	130	065	065	140	105	124	051	070	093	122	000	130	100	205	102	064	099	099	102
P83	301	324	243	247	100	100	137	197	100	114	173	161	095	124	229	052	120	092	100	124	156	097	161	172	242	050	092	073	073	104
P84	314	336	365	245	130	130	150	240	102	134	223	211	063	145	217	024	119	142	076	117	132	132	272	222	350	024	000	023	023	127
P85	369	393	422	332	076	076	102	130	076	105	112	100	117	145	279	102	170	062	102	145	110	090	154	222	229	100	142	123	123	102
P86	297	310	346	245	150	150	107	240	130	164	223	211	090	117	217	050	140	115	130	145	161	161	272	191	350	049	115	023	023	154
P87	302	200	353	233	064	064	077	160	064	100	126	115	051	105	160	090	121	076	051	051	149	106	214	164	296	000	103	005	005	142
P88	357	301	371	302	110	110	146	205	090	122	102	170	105	192	300	030	166	130	090	162	120	120	229	274	312	062	103	005	005	170
P89	295	299	291	242	100	100	195	226	150	174	201	235	094	137	210	065	156	133	107	102	154	154	251	169	339	090	070	060	060	145
P90	314	337	309	260	079	079	121	135	121	150	115	145	100	190	275	093	172	091	093	102	154	139	109	233	255	145	105	169	169	174
P91	251	273	213	102	130	130	216	200	104	196	205	273	060	172	104	095	056	151	124	156	159	143	193	174	261	091	079	114	114	091
P92	511	454	403	420	172	172	107	232	130	164	100	211	145	219	279	240	163	214	116	145	176	110	211	222	260	102	199	235	235	102
P93	325	311	370	269	000	000	109	124	066	116	009	119	054	096	200	095	114	065	066	111	090	093	193	143	245	091	107	007	007	140

282 Anexos

	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	LPL	LPP	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
M5	217	202	312	329	264	244	229	292	206	115	000																							
M7	255	208	255	271	271	190	267	235	167	118	024	000																						
M10	137	137	229	262	245	218	149	218	141	179	077	000	000																					
M14	092	105	255	271	181	190	104	235	102	090	050	070	000	000																				
M16	160	160	267	300	252	217	173	200	179	150	062	064	065	030	000																			
M17	279	279	312	346	264	260	292	300	254	142	049	037	104	102	000	000																		
M19	240	107	279	279	295	199	260	229	161	115	024	024	104	076	000	100	000																	
M23	217	202	312	329	264	244	229	292	206	115	000	024	077	050	062	049	024	000																
M25	217	150	240	279	360	229	229	260	161	199	100	076	050	102	037	127	100	100	000															
LPL	217	107	240	217	150	142	199	199	147	260	304	240	254	217	229	320	272	304	272	000														
LPP	134	070	105	105	153	064	146	077	152	064	217	177	197	105	175	232	107	217	217	172	000													
E1	107	121	165	150	060	105	105	091	001	133	203	242	105	165	223	203	267	203	267	131	065	000												
E2	107	065	107	093	113	070	105	051	110	105	203	250	105	165	223	203	267	203	235	174	052	039	000											
E3	100	242	300	344	169	255	162	207	105	321	267	275	217	210	223	333	267	267	299	174	275	167	230	000										
E4	100	121	100	150	140	105	162	133	110	223	299	242	217	210	223	316	267	299	235	063	135	094	100	137	000									
E5	105	070	163	134	153	090	090	110	100	235	240	223	137	163	175	312	217	240	107	102	134	093	093	121	065	000								
E6	140	119	140	140	210	104	146	110	152	267	232	200	100	177	175	279	217	232	107	150	163	135	135	150	121	025	000							
E8	144	116	172	172	123	120	142	115	063	229	256	232	132	172	170	304	241	256	102	100	150	076	103	145	063	050	076	000						
E9	110	064	175	146	194	103	103	150	149	217	260	235	179	146	150	324	229	260	170	115	110	133	105	162	051	030	090	000	000					
E10	064	090	235	205	085	130	050	107	120	107	199	205	149	090	130	260	199	199	199	000	110	070	105	105	070	030	090	062	050	000				
E11	079	093	165	150	060	105	070	105	139	070	219	226	105	107	192	219	235	219	267	174	052	039	026	190	137	121	165	131	133	070				
E12	132	064	132	110	130	076	130	076	065	150	214	190	149	132	150	292	170	214	170	000	090	070	070	162	051	030	077	024	050	050				
E13	150	093	150	121	190	070	133	119	169	207	267	195	105	195	207	235	235	267	204	131	107	123	094	230	094	065	093	145	070	105				
E14	146	146	205	175	111	130	130	116	092	240	350	203	210	235	240	324	324	350	260	101	132	030	064	162	064	064	110	062	103	076				
E15	105	070	134	105	099	064	090	104	000	175	279	239	167	163	175	312	240	279	107	009	092	052	052	150	052	025	070	050	030	030				
E16	163	134	163	134	153	090	146	090	137	235	312	255	197	223	235	279	279	312	240	130	134	093	065	100	093	051	070	102	090	090				
E17	192	092	051	065	101	025	205	051	122	110	107	140	137	134	146	217	150	107	150	144	065	121	093	242	107	070	065	009	090	110				
E18	090	064	175	146	130	103	076	130	092	217	260	235	149	146	150	324	229	260	170	000	110	070	070	133	051	012	064	037	025	025				
E19	092	025	092	070	153	064	090	077	137	090	232	223	167	119	175	279	217	232	107	172	030	079	026	242	107	070	119	116	064	090				
E21	160	064	077	064	130	025	150	063	092	103	214	175	179	132	150	260	170	214	170	101	051	091	064	223	064	064	104	075	050	076				
E22	122	100	122	100	127	065	120	070	141	149	206	197	141	152	210	254	191	206	254	176	094	001	001	154	139	052	039	110	120	092				
E23	110	110	205	175	060	130	103	144	149	130	229	220	210	146	217	199	260	229	292	120	104	064	064	192	091	110	175	115	130	076				
E24	100	150	210	100	140	105	162	162	110	223	204	150	169	100	177	219	174	204	204	090	165	123	167	137	000	065	093	090	105	070				
E25	110	110	205	175	130	103	103	150	120	240	229	205	149	146	150	292	199	229	199	000	146	105	133	105	070	012	030	062	050	025				
E26	104	030	132	110	194	076	103	103	120	150	214	190	149	104	130	292	170	214	142	115	064	105	070	192	070	030	077	075	025	050				
E27	146	064	110	090	130	050	130	116	106	144	229	190	179	160	173	260	199	229	170	101	104	119	091	223	064	064	110	000	050	076				
E28	130	102	107	150	150	000	115	170	147	199	241	107	191	130	142	256	211	241	102	074	009	103	117	174	063	050	102	100	037	037				
E29	079	039	165	150	169	105	070	105	001	177	219	195	124	121	140	299	174	219	145	117	093	000	000	167	000	039	079	050	051	051				
E30	116	024	116	102	235	000	115	000	132	170	256	232	161	144	170	336	211	256	154	154	076	117	063	235	090	050	009	007	037	000				
E31	102	102	217	107	072	115	000	170	104	170	102	107	161	102	142	241	102	102	211	074	130	090	117	117	063	050	102	049	062	012				
E32	177	119	223	192	303	175	160	175	152	203	217	192	100	239	220	279	107	217	150	240	255	210	100	210	100	070	070	150	146	175				
E33	093	093	150	121	060	070	070	105	110	133	267	242	105	150	192	251	267	267	235	117	079	039	026	167	000	065	121	090	070	051				
E34	132	030	077	064	194	050	130	063	120	130	276	235	179	160	107	324	229	276	170	156	051	091	030	255	091	064	104	101	050	103				
E35	205	175	235	205	194	130	107	232	210	232	324	251	274	220	232	300	292	324	260	049	146	162	177	255	119	146	205	199	130	130				
E36	170	007	114	114	276	100	102	007	100	154	340	275	234	199	241	365	204	340	223	230	036	101	062	345	171	142	170	194	126	102				

E11 E12 E13 E14 E15 E16 E17 E18 E20 E21 E22 E23 E24 E25 E26 E27 E28 E29 E30 E31 E32 E33 E34 E35 E36 E37 E38 E39 410 604
E18 105 025 078 050 012 064 090 000
E19 052 064 093 118 051 105 065 064 000
E21 091 025 078 103 038 090 025 050 038 000
E22 001 092 095 120 000 000 066 092 000 092 000
E23 038 103 105 076 090 090 146 103 090 103 120 000
E24 167 078 066 091 079 093 107 078 165 091 110 119 000
E25 133 050 078 076 038 064 090 025 118 076 065 130 051 000
E26 105 025 078 103 038 090 051 025 038 025 092 130 105 050 000
E27 119 050 051 103 038 090 064 050 064 025 120 103 064 076 050 000
E28 117 062 050 075 037 076 009 037 009 049 110 101 063 037 037 049 000
E29 100 025 000 078 039 093 079 025 065 051 095 133 000 051 025 051 063 000
E30 117 037 090 115 050 102 063 037 024 037 104 142 145 000 012 062 074 037 000
E31 090 037 117 000 050 102 102 037 102 062 104 062 063 037 062 062 049 063 100 000
E32 242 146 107 175 134 134 163 110 163 175 100 235 121 110 146 132 107 107 130 107 000
E33 026 078 066 038 026 039 107 051 052 064 001 038 100 078 078 064 063 000 090 063 100 000
E34 091 050 078 103 038 090 051 050 012 025 092 130 140 103 025 050 075 051 012 115 146 064 000
E35 177 150 091 144 104 146 160 130 160 116 194 173 119 130 130 009 075 133 170 142 251 119 144 000
E36 115 126 115 140 101 142 101 126 049 007 130 196 231 102 074 140 125 101 061 223 229 115 036 102 000
E37 103 037 145 062 050 102 009 062 076 062 104 115 131 115 000 000 140 063 074 100 150 076 062 214 125 000
E38 079 012 093 064 025 078 038 038 051 012 000 090 079 064 038 038 063 039 050 050 163 052 038 132 101 024 000
E39 066 025 000 051 013 065 052 025 039 025 067 105 094 051 025 051 050 026 037 063 150 039 025 119 062 037 013 000
F410 100 146 150 205 134 163 065 175 105 090 137 205 210 205 146 118 107 100 130 217 223 150 090 235 142 130 105 121 000
F604 121 064 100 146 105 163 092 090 134 090 137 118 121 090 090 118 102 093 130 050 255 121 146 205 229 130 078 093 192 000
F606 165 132 150 205 134 163 065 175 092 077 122 205 210 205 132 110 107 165 116 217 223 150 077 235 114 116 092 107 013 200
C1 117 062 090 142 076 130 102 062 102 062 132 000 063 062 062 037 049 063 100 024 172 090 115 115 223 154 076 090 217 076
C2 052 038 093 064 025 078 078 038 051 038 000 038 079 064 064 038 063 065 076 024 163 026 064 132 156 050 025 039 134 078
C200 064 076 105 025 064 064 146 076 110 103 120 025 091 103 130 103 101 105 142 062 205 038 130 173 196 062 064 078 205 118
C202 079 064 079 077 065 078 119 064 119 077 122 051 052 064 090 051 063 065 130 024 177 052 132 118 229 116 065 079 223 078
C4 110 120 110 120 000 137 167 092 137 120 141 120 001 092 120 078 090 001 161 077 137 001 149 120 210 161 100 095 262 137
C5 079 064 079 077 065 078 119 064 119 077 122 051 052 064 090 051 063 065 130 024 177 052 132 118 229 116 065 079 223 078
F6 001 106 139 120 000 137 094 120 094 078 126 092 124 149 135 078 132 124 147 104 102 067 106 164 173 090 066 001 122 122
0077 107 064 052 051 038 051 119 038 065 077 122 104 107 090 064 051 009 039 050 102 092 052 051 146 114 063 065 052 163 163
0078 053 106 095 092 052 000 066 092 066 078 040 092 124 092 106 092 104 110 118 104 167 040 078 149 116 090 066 053 094 122
F1 093 090 065 064 025 078 105 064 078 064 100 118 093 090 090 038 076 065 102 102 140 039 064 090 114 076 051 039 134 163
F2 064 050 105 076 038 090 090 050 090 090 092 050 064 050 076 050 049 078 115 012 205 038 103 116 196 000 038 051 175 064
F3 101 100 075 100 036 007 007 074 036 049 116 126 157 126 074 049 006 101 061 139 170 049 024 126 072 006 061 049 007 199
F4 066 025 000 051 013 065 052 025 039 025 067 105 094 051 025 051 050 026 037 063 150 039 025 119 062 037 013 000 121 093
F5 065 175 226 146 134 192 200 175 105 175 137 118 242 235 205 190 240 165 107 107 200 093 146 203 170 102 134 121 223 223
F6 117 125 117 062 050 102 150 000 102 115 132 142 145 142 142 000 154 090 127 154 144 063 000 170 139 049 076 063 150 217
F7 039 090 093 064 025 078 105 064 051 064 000 064 121 090 090 064 076 093 102 076 192 013 064 118 114 076 051 039 134 134
F8 090 000 117 037 024 076 130 062 102 000 104 115 117 000 115 000 100 090 127 100 107 037 000 142 139 049 050 037 150 150
F10 039 146 135 110 070 134 163 118 070 110 100 064 165 146 146 104 130 115 150 102 200 039 118 160 170 130 105 093 192 163
F11 174 199 174 229 150 217 107 199 150 142 222 170 174 229 199 115 102 204 211 102 107 145 170 199 253 211 150 174 217 240
F12 053 120 139 120 000 137 167 092 000 120 111 065 139 120 120 106 110 110 132 077 152 053 120 179 100 132 100 095 229 137
F13 174 000 174 000 076 130 107 062 150 142 161 170 145 000 115 142 127 090 127 100 107 117 142 170 223 100 102 090 279 150
E11 E12 E13 E14 E15 E16 E17 E18 E20 E21 E22 E23 E24 E25 E26 E27 E28 E29 E30 E31 E32 E33 E34 E35 E36 E37 E38 E39 410 604

	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R20	R21	R22	R23	R24	R25	R26	R27	R30	R32	R33	R34	R35	R36	R37	R38	R39	A10	604			
F15	090	080	090	062	024	076	102	062	050	062	104	115	145	115	088	062	100	090	074	127	150	037	037	142	086	049	050	037	102	107
F17	076	115	204	115	102	150	107	115	150	142	132	062	131	115	170	142	140	145	211	049	279	076	199	105	299	127	102	117	279	102
F18	119	103	133	103	090	146	175	103	146	130	149	103	091	130	150	076	156	070	170	088	146	091	150	173	256	088	090	105	235	146
F19	070	050	105	076	030	090	051	076	064	025	092	103	105	103	076	050	080	070	080	080	205	051	050	130	100	037	012	025	090	110
F20	190	192	190	192	150	100	165	192	100	162	154	255	167	192	192	192	204	190	204	235	242	167	162	255	106	174	150	137	210	210
F22	174	142	174	142	102	150	150	142	130	115	191	170	174	199	170	115	182	174	154	102	217	117	115	229	194	100	102	117	150	217
F23	174	292	267	324	240	312	217	292	187	229	254	229	299	324	260	229	272	267	272	272	279	204	229	292	253	304	240	235	240	240
F25	066	051	100	105	065	121	079	070	039	051	095	070	123	133	070	051	131	053	063	090	135	066	051	177	115	037	039	053	121	121
F26	101	074	101	074	036	087	087	074	114	049	116	100	075	074	100	049	061	101	139	061	229	049	100	100	170	086	036	049	142	114
F27	101	102	106	154	142	199	229	102	170	102	173	100	157	211	241	126	223	157	253	139	229	101	211	211	295	139	142	157	259	199
F28	123	051	053	070	039	065	065	051	093	051	067	105	039	051	070	025	076	053	090	063	079	066	070	119	171	063	039	053	121	121
F33	093	146	210	110	105	163	134	146	134	146	137	146	210	175	175	175	197	150	187	150	200	093	146	235	170	102	105	093	134	134
F34	140	103	064	116	077	090	077	103	077	063	106	116	091	130	103	063	101	133	080	142	132	091	063	150	126	101	077	091	090	205
F35	095	149	095	149	100	100	094	149	100	120	027	149	124	120	149	120	161	124	161	161	122	095	120	179	144	132	100	095	137	197
F38	139	092	124	120	080	100	052	092	100	092	082	179	139	092	092	120	110	095	104	132	167	110	092	194	130	104	080	067	100	080
F39	107	064	065	110	051	070	030	064	070	030	052	146	079	030	030	064	037	065	076	076	163	079	064	104	101	130	051	039	134	105
F40	090	062	090	115	050	102	037	080	050	012	104	115	117	115	062	037	074	090	074	100	217	063	037	115	086	074	024	037	076	130
F41	133	130	070	130	064	090	090	103	064	076	092	150	162	130	103	076	115	133	088	170	146	070	050	130	100	115	090	070	090	235
F42	109	142	103	156	116	130	116	142	116	101	147	156	103	170	142	101	140	174	127	102	150	131	101	199	166	140	116	131	130	240
F43	117	080	090	080	050	076	076	080	076	062	077	115	117	115	115	062	127	117	100	127	130	063	062	170	139	049	050	063	076	107
F44	129	100	129	154	087	142	036	126	087	049	144	154	157	154	100	074	112	129	112	139	259	101	074	154	124	112	061	075	061	114
F45	039	051	080	051	013	065	093	025	039	051	067	051	094	051	051	051	050	053	063	037	150	013	051	119	115	063	039	026	150	093
F46	091	150	192	150	110	175	205	130	146	150	149	103	177	130	150	150	120	162	199	080	300	091	107	089	256	199	146	133	300	146
F47	039	090	121	090	051	105	092	090	025	064	080	090	100	146	090	090	130	093	076	130	192	039	030	175	061	050	051	039	105	163
F48	065	146	150	205	134	163	092	175	070	090	080	090	100	175	146	110	150	100	150	130	255	093	110	205	170	150	105	121	134	134
F49	150	110	100	110	105	134	119	146	134	110	100	175	150	175	175	146	217	150	150	107	177	121	110	267	170	050	070	093	134	192
F50	110	120	139	194	152	167	066	179	094	070	097	135	139	179	120	135	147	154	132	161	246	139	106	179	116	147	094	110	137	167
F51	101	074	101	126	061	114	049	100	036	024	116	126	157	154	074	049	112	101	061	139	199	075	024	154	072	061	036	049	061	170
F52	121	146	150	146	105	163	163	146	134	110	167	110	150	175	175	090	150	150	107	130	239	093	146	110	229	130	105	121	192	192
F53	107	090	039	090	070	051	065	090	051	064	080	110	135	110	064	090	089	093	050	150	134	079	030	160	049	102	070	065	105	192
F54	119	050	162	076	064	110	104	076	146	076	120	130	091	076	103	103	101	070	142	062	235	091	130	144	196	062	030	051	205	090
F55	195	146	150	104	119	134	177	146	200	160	152	160	121	146	205	146	172	165	217	150	177	135	190	160	259	116	119	135	223	223
F56	053	105	137	133	093	121	065	133	065	070	040	133	167	133	105	133	145	100	117	145	210	080	070	192	075	090	065	053	121	150
F57	039	090	093	110	051	105	065	090	025	030	080	090	150	110	064	064	076	093	076	102	223	039	030	110	061	102	051	039	105	134
F58	110	092	139	070	094	080	152	092	152	135	097	070	081	092	149	135	147	124	161	077	152	081	164	210	265	090	094	110	229	137
F59	152	133	100	105	121	093	135	133	121	133	124	162	102	162	133	162	160	137	117	204	100	123	105	177	115	117	121	100	100	242
F60	107	064	065	110	051	070	030	064	070	030	052	146	079	030	030	064	037	065	076	076	163	079	064	104	101	130	051	039	134	105
F61	117	049	117	142	076	130	024	080	037	024	110	142	160	142	049	062	113	076	036	127	107	103	024	105	073	061	037	050	063	116
F62	076	080	076	101	063	102	080	080	037	049	110	049	131	142	080	049	087	117	074	100	107	050	049	142	112	087	063	076	102	150
F64	137	091	152	119	107	150	079	133	093	070	154	140	152	192	119	110	160	123	103	174	226	123	070	223	101	063	065	080	107	135
F66	091	063	133	103	064	110	030	103	077	037	106	130	133	130	089	076	115	091	101	115	235	070	063	150	100	049	025	030	077	104
F67	079	064	052	025	013	051	092	030	065	051	094	077	079	064	064	051	037	065	076	076	163	026	051	090	087	063	030	026	134	134
F68	079	064	052	025	013	051	092	030	065	051	094	077	079	064	064	051	037	065	076	076	163	026	051	090	087	063	030	026	134	134
F69	135	190	100	235	163	192	105	205	140	132	122	205	210	175	160	175	150	195	202	107	322	150	160	090	170	232	140	135	177	177
F71	094	105	066	064	052	065	093	070	079	091	053	140	123	070	070	119	076	080	090	145	150	066	064	133	049	103	079	039	150	100

R11 R12 R13 R14 R15 R16 R17 R18 R20 R21 R22 R23 R24 R25 R26 R27 R28 R29 R30 R31 R32 R33 R34 R35 R36 R37 R38 R39 A10 604

	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	410	604
F72	090	088	117	178	102	130	102	088	076	088	077	062	117	088	088	088	100	117	100	049	158	090	115	199	223	154	102	117	107	102
F73	111	107	111	107	066	095	088	107	095	079	069	166	111	107	107	107	119	111	119	148	169	082	079	166	103	091	066	054	124	153
F74	186	154	186	241	170	199	087	211	170	100	144	241	186	182	154	154	166	186	194	194	324	186	154	100	178	194	114	129	170	199
F75	103	037	145	062	050	102	089	062	076	062	104	115	131	115	088	088	140	063	074	100	150	076	062	214	125	088	024	037	130	130
F76	053	105	137	078	065	093	107	105	093	105	040	105	137	105	133	133	145	108	145	117	100	053	105	192	129	063	065	053	150	150
F77	135	064	158	090	078	105	092	090	105	090	088	146	107	118	118	118	172	093	102	130	119	107	090	251	156	024	051	065	134	163
F78	108	105	088	078	039	065	093	078	093	078	067	133	108	078	105	078	098	108	117	117	150	053	078	105	129	088	065	053	121	188
F79	081	065	067	038	052	052	094	065	088	065	111	092	110	092	065	092	063	067	077	104	197	053	065	135	075	077	052	048	167	188
F80	091	103	064	037	025	064	132	050	077	089	106	116	119	076	076	089	049	078	088	115	175	038	063	103	074	101	077	038	175	175
F81	079	064	065	118	051	078	051	064	051	038	052	064	079	064	064	038	063	093	076	050	134	052	064	132	156	102	051	065	105	105
F83	067	120	095	092	052	088	108	092	088	092	054	092	124	092	120	092	104	124	132	104	167	048	092	120	144	104	088	067	137	167
F84	063	088	145	062	050	102	130	088	102	088	104	062	117	115	142	088	127	117	154	074	217	037	115	170	194	049	050	063	158	130
F85	145	115	090	115	076	076	076	115	130	088	050	142	090	088	142	088	127	145	154	127	130	090	115	170	194	100	076	090	102	107
F86	063	142	174	115	102	130	158	142	130	142	077	062	145	142	199	142	102	174	211	100	217	063	170	229	253	100	102	117	107	158
F87	051	076	105	130	064	118	051	103	038	025	092	076	133	130	076	050	088	105	088	088	235	051	050	130	100	088	038	051	090	118
F88	105	103	105	050	038	064	118	076	118	103	065	130	105	076	130	103	115	105	142	115	146	051	103	158	154	062	064	051	146	175
F89	053	119	167	105	093	121	135	105	107	140	053	078	152	105	140	162	160	123	160	090	100	066	148	239	201	103	107	094	195	107
F90	123	078	088	078	039	065	093	051	065	078	067	133	094	078	078	078	103	088	063	117	079	066	051	177	115	063	065	053	121	188
F91	068	107	082	051	066	066	153	079	095	107	128	051	096	107	107	107	077	111	119	091	208	048	107	121	145	119	095	082	216	153
F92	109	142	189	214	172	217	116	199	172	101	206	214	189	199	142	156	140	174	182	182	301	109	156	088	166	197	116	131	217	158
F93	068	079	096	093	088	095	066	107	088	065	055	065	096	107	107	093	105	111	119	091	104	068	093	166	131	077	053	068	124	095
F94	108	091	039	091	052	065	039	078	065	051	067	119	094	078	064	064	050	094	076	117	150	066	051	105	075	117	065	053	079	135
F95	119	050	162	076	064	118	104	076	146	076	120	130	064	076	103	103	101	078	142	062	220	091	130	173	196	062	038	051	205	090
F96	216	241	278	182	170	229	275	211	199	241	234	303	345	272	241	272	284	216	223	315	324	186	182	272	178	166	199	157	291	291
F102	091	116	105	076	038	090	104	076	077	089	106	158	162	103	089	103	088	091	101	142	205	051	063	130	074	101	077	038	132	160
F104	119	089	162	076	064	118	104	103	132	089	135	130	105	130	144	103	142	119	156	115	220	078	116	107	182	049	051	064	132	132
F105	157	126	129	154	087	142	114	126	114	074	173	154	101	154	126	074	112	157	139	139	229	101	108	154	170	139	087	101	142	199
F106	117	199	145	115	102	102	107	142	158	199	050	170	174	115	199	199	102	174	211	182	158	090	170	229	194	154	150	117	217	240
F107	117	088	117	088	050	102	102	088	076	062	132	115	145	142	115	062	127	117	108	127	187	063	062	142	139	049	050	063	102	107
F108	154	120	139	149	108	167	197	092	108	149	172	149	154	149	118	106	161	081	104	132	088	124	120	194	203	132	137	124	262	197
F114	107	098	165	090	078	134	163	090	163	118	137	098	079	090	146	104	116	107	187	058	177	079	175	175	275	102	078	093	255	105
F115	081	065	124	128	088	137	094	092	108	065	111	092	081	092	092	065	090	067	132	050	213	081	120	106	188	104	052	067	197	088
F116	157	241	278	336	259	324	199	303	170	182	234	211	278	336	241	211	284	247	253	253	291	216	211	303	235	253	199	216	259	259
F117	052	118	210	118	105	163	177	118	078	146	108	090	226	175	146	175	202	121	130	130	223	079	118	251	156	076	105	093	223	163
F118	093	205	165	175	134	192	223	175	163	175	167	118	150	175	205	132	158	165	248	130	223	093	205	168	259	217	163	158	288	192
F119	086	085	198	111	099	153	181	085	153	138	127	068	113	085	138	138	123	113	177	023	248	086	194	223	307	123	099	113	303	073
F120	091	025	105	076	038	090	051	058	090	025	092	103	064	058	058	058	049	051	088	037	205	064	076	116	148	062	012	025	146	064
F121	135	175	242	175	163	223	255	175	192	205	197	118	188	205	235	175	232	188	248	138	192	135	235	251	341	158	163	188	322	192
F122	133	130	287	158	146	205	235	138	175	187	179	103	133	158	187	144	199	119	199	088	146	133	217	264	336	142	146	162	334	146
F123	133	103	078	138	064	098	064	103	098	058	092	138	105	103	103	058	088	133	115	115	175	078	076	138	154	115	064	078	064	175
F125	174	248	243	229	217	279	312	268	279	268	254	178	284	268	324	214	272	251	378	182	312	174	324	214	417	241	217	235	381	248
F126	123	105	188	148	107	121	135	105	135	091	169	091	094	105	105	078	076	123	145	063	195	094	148	119	247	189	107	123	242	121
F127	214	162	198	148	165	188	242	162	258	287	233	239	137	162	192	192	189	123	235	174	188	182	239	287	278	189	165	152	388	218
F128	098	115	145	088	076	102	138	115	158	115	077	088	098	088	178	115	127	145	211	074	217	063	178	178	253	188	076	098	187	138
F129	078	103	105	103	064	118	118	103	118	076	128	076	078	103	138	058	088	105	178	062	228	051	138	103	211	115	064	078	175	118
	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	410	604

H11 H12 H13 H14 H15 H16 H17 H18 H20 H21 H22 H23 H24 H25 H26 H27 H28 H29 H30 H31 H32 H33 H34 H35 H36 H37 H38 H39 410 604
 P130 169 138 086 165 099 153 126 138 153 085 185 165 086 138 138 035 097 113 177 123 210 113 138 085 217 177 099 113 161 181
 P131 091 076 064 116 077 090 104 076 104 063 135 063 064 076 076 037 049 078 115 037 190 064 116 103 211 156 077 091 205 090
 P132 105 130 105 150 090 118 090 130 064 076 092 103 148 158 130 076 142 162 115 142 146 078 076 107 154 115 090 105 090 205
 P133 111 065 082 065 053 066 095 051 095 079 120 121 111 079 065 079 077 054 077 091 138 068 079 121 131 091 066 054 169 109
 P135 051 150 133 130 090 146 175 130 118 130 120 076 133 130 150 163 115 133 199 080 251 051 150 130 211 170 110 105 235 146
 P136 129 154 157 126 114 170 199 154 142 154 173 126 157 211 211 100 223 129 194 166 170 101 154 211 235 086 114 129 199 229
 P137 065 090 093 090 051 105 105 090 078 064 100 064 093 118 118 038 102 093 130 076 177 039 090 118 170 076 051 065 134 134
 P138 105 103 078 076 038 090 118 076 064 076 120 130 133 130 103 050 115 078 080 142 132 051 050 130 100 062 064 051 118 205
 H11 H12 H13 H14 H15 H16 H17 H18 H20 H21 H22 H23 H24 H25 H26 H27 H28 H29 H30 H31 H32 H33 H34 H35 H36 H37 H38 H39 410 604

606 C1 C2 C3D C3E C4 CU PE H77 H78 1 2 3 4 5 6 7 8 10 11 12 13 15 17 18 19 20 22 23 25
 P606 000
 C1 217 000
 C2 134 050 000
 C3D 205 115 038 000
 C3E 223 024 038 051 000
 C4 262 063 080 120 052 000
 CU 223 024 038 051 000 052 000
 PE 137 118 052 092 094 068 094 000
 H77 163 102 065 077 078 108 078 122 000
 H78 108 132 052 092 108 111 108 054 108 000
 P1 134 102 051 090 078 066 078 066 051 052 000
 P2 175 037 012 050 025 065 025 065 104 065 064 000
 P3 087 139 061 126 142 144 142 088 061 062 036 100 000
 P4 107 090 039 078 079 095 079 081 052 053 039 051 049 000
 P5 200 232 105 118 177 122 177 066 148 094 119 146 142 121 000
 P6 158 102 076 088 130 118 130 090 050 077 024 115 061 063 089 000
 P7 134 102 025 064 078 080 078 052 078 026 025 038 036 039 078 050 000
 P8 158 154 050 062 102 104 102 077 076 050 024 062 061 037 102 024 024 000
 P10 192 116 051 090 092 066 092 052 119 052 065 064 087 093 051 089 025 076 000
 P11 217 154 130 199 150 077 150 050 107 161 130 142 139 174 130 102 130 102 102 000
 P12 229 090 052 092 080 040 080 054 100 082 094 065 116 095 052 118 052 104 026 077 000
 P13 279 154 102 115 130 161 130 191 102 161 130 115 166 090 217 127 130 100 107 304 161 000
 P15 102 154 050 088 130 132 130 077 050 050 024 088 012 037 102 024 024 024 076 154 104 127 000
 P17 279 100 050 062 063 104 063 104 172 104 130 037 194 117 130 154 076 100 076 211 077 100 154 000
 P18 235 088 064 076 051 065 051 092 077 120 064 076 154 105 118 062 090 088 090 170 092 142 115 088 000
 P19 077 115 038 076 090 120 090 051 090 051 038 050 049 025 118 062 038 037 090 142 120 142 037 115 103 000
 P20 195 267 180 223 242 217 242 169 210 139 150 192 157 137 210 174 150 145 210 235 217 267 145 267 255 133 000
 P22 150 211 102 142 107 191 107 104 130 132 102 142 086 117 158 100 102 100 158 154 161 211 074 211 170 088 117 000
 P23 279 241 217 292 240 132 240 077 279 161 217 229 223 235 130 272 107 272 130 074 104 405 241 272 260 229 299 272 000
 P25 107 090 039 078 079 110 079 067 052 081 065 078 075 053 079 063 065 090 079 145 081 145 063 117 051 051 190 117 204 000
 P26 142 086 036 074 061 088 061 062 114 062 036 024 072 049 170 086 036 036 087 139 116 139 061 086 100 024 157 112 253 101
 P27 259 139 087 100 087 088 087 088 142 116 087 100 170 157 087 086 087 112 061 166 088 223 139 086 024 126 270 194 223 075
 P29 121 063 039 078 052 081 052 081 052 067 039 051 075 053 165 063 065 063 107 145 110 117 063 117 051 051 167 117 267 053
 P33 163 217 105 110 163 167 163 080 163 052 105 110 142 093 105 102 078 076 105 240 137 107 102 130 146 090 210 107 107 121
 606 C1 C2 C3D C3E C4 CU PE H77 H78 1 2 3 4 5 6 7 8 10 11 12 13 15 17 18 19 20 22 23 25

606 C1 C2 C30 C38 C4 C9 P8 877 878 1 2 3 4 5 6 7 8 10 11 12 13 15 17 18 19 20 22 23 25

P34 090 142 077 116 146 179 146 106 090 092 090 116 049 091 190 115 090 115 146 142 149 199 062 214 173 076 133 008 260 091

P35 122 161 100 149 137 126 137 111 137 040 080 120 116 095 122 104 080 104 094 191 126 222 104 161 120 092 154 191 222 095

P38 137 161 100 149 152 172 152 111 122 054 100 120 116 067 197 132 100 104 167 254 172 161 104 191 179 092 124 161 222 124

P39 119 076 070 146 092 100 092 122 119 066 070 064 087 039 223 150 078 102 134 107 137 150 102 150 175 064 150 107 240 121

P40 063 100 050 115 102 132 102 063 102 063 050 062 036 037 150 100 050 074 102 127 132 102 049 154 142 012 145 100 211 063

P41 090 170 090 150 175 179 175 120 090 065 064 130 024 078 175 080 064 080 118 170 149 142 037 199 107 076 162 115 260 105

P42 130 102 116 156 107 206 107 132 130 132 130 156 086 131 217 154 130 154 107 154 176 241 100 256 214 135 117 100 272 131

P43 076 154 050 080 130 161 130 077 076 050 050 080 036 063 130 049 050 049 102 154 132 154 024 154 135 037 145 074 272 063

P44 007 139 007 154 142 173 142 062 142 062 087 100 072 075 199 139 007 112 142 166 173 223 086 194 102 049 106 139 166 101

P45 150 063 013 051 052 067 052 067 052 040 039 025 049 026 093 063 013 037 039 145 040 090 037 063 070 051 167 117 204 053

P46 300 115 090 130 104 120 104 149 190 120 146 076 102 133 175 199 090 142 090 229 092 142 170 062 150 150 207 260 260 162

P47 092 150 051 090 134 137 134 066 070 039 051 090 036 039 051 050 025 050 051 150 080 150 024 130 110 030 150 102 107 039

P48 119 130 070 146 134 167 134 094 192 066 134 090 114 121 134 107 070 150 070 150 100 279 130 130 175 090 150 150 107 093

P49 119 240 105 110 192 213 192 100 134 094 105 146 114 093 119 076 105 076 163 217 102 107 076 107 146 064 065 076 312 093

P50 100 161 122 164 167 204 167 126 197 111 167 135 144 110 102 222 137 191 167 191 172 222 161 176 226 092 154 191 222 110

P51 049 139 061 126 142 173 142 075 087 075 061 100 024 049 142 086 061 086 114 139 144 194 036 194 154 024 157 086 223 049

P52 192 130 070 110 105 122 105 094 134 100 070 090 114 121 140 102 070 102 092 150 122 102 102 076 090 090 242 150 240 093

P53 092 150 105 110 140 197 140 152 065 094 105 146 061 065 192 130 105 130 163 217 167 107 076 240 205 090 100 150 279 093

P54 190 115 064 076 077 120 077 106 132 106 090 050 154 051 175 115 090 062 146 229 149 062 115 062 103 050 192 170 324 105

P55 223 202 119 104 140 167 140 137 140 137 119 132 170 135 192 116 134 102 163 217 102 076 130 116 132 110 242 107 346 150

P56 093 174 093 133 150 154 150 095 150 040 093 105 101 053 093 117 065 090 093 204 124 204 090 145 162 051 137 174 204 000

P57 092 102 051 110 105 100 105 066 105 039 051 064 036 039 105 102 025 076 051 130 000 107 050 130 146 030 150 130 150 065

P58 229 132 066 051 080 141 080 126 100 111 137 070 173 110 152 132 100 104 137 222 111 077 132 063 106 120 105 161 320 110

P59 165 235 150 133 195 249 195 201 107 139 150 192 129 100 210 145 150 145 210 299 217 090 117 204 223 133 230 204 360 137

P60 119 076 070 146 092 100 092 122 119 066 070 064 087 039 223 150 070 102 134 107 137 150 102 150 175 064 150 107 240 121

P61 063 127 076 142 144 191 144 090 089 090 102 115 061 050 172 127 102 127 150 102 161 102 074 211 170 049 109 127 211 050

P62 102 100 037 075 102 147 102 077 076 077 076 075 036 076 130 100 050 100 076 127 090 102 049 140 120 062 204 100 211 050

P64 107 204 107 119 100 217 100 095 121 110 121 140 101 080 150 117 121 117 100 204 105 204 090 219 177 064 094 090 235 000

P66 077 142 064 103 118 149 110 051 110 051 064 076 074 030 132 080 064 062 110 170 149 170 062 142 130 012 140 115 199 064

P67 134 102 030 051 070 094 070 080 051 052 025 051 036 026 134 050 025 024 070 150 094 102 024 116 104 030 150 102 240 079

P68 134 102 030 051 070 094 070 080 051 052 025 051 036 026 134 050 025 024 070 150 094 102 024 116 104 030 150 102 240 079

P69 177 107 163 225 192 197 192 152 255 094 163 146 170 135 239 240 134 107 163 240 197 240 107 107 267 132 226 279 217 195

P71 135 174 107 119 150 139 150 139 093 053 065 119 075 039 150 090 065 063 121 235 139 145 063 109 177 070 137 174 267 123

P72 107 049 050 115 076 132 076 132 130 104 150 062 139 117 107 211 102 102 102 102 077 102 154 100 142 142 267 211 241 090

P73 109 170 095 136 153 143 153 090 124 055 066 107 075 054 130 091 066 063 124 170 143 170 063 170 166 051 026 091 240 111

P74 142 194 170 241 199 234 199 173 259 144 170 154 170 129 291 253 170 194 229 253 265 253 194 223 272 100 216 253 315 106

P75 116 154 050 062 116 161 116 090 063 090 076 080 086 037 102 049 076 049 130 211 132 100 049 127 080 037 174 100 304 037

P76 135 174 065 070 121 124 121 081 121 026 065 070 101 053 065 063 039 037 065 204 095 145 063 090 105 051 137 145 235 000

P77 119 107 070 090 140 102 140 100 092 094 105 110 114 065 119 076 105 076 163 217 152 130 076 150 110 064 121 102 312 065

P78 121 145 065 105 121 124 121 095 093 040 039 070 049 053 150 063 039 037 093 174 124 090 037 117 133 051 137 117 267 100

P79 152 132 080 065 094 141 094 126 066 097 080 092 080 040 167 104 080 077 137 222 141 132 077 161 149 065 124 132 206 095

P80 175 142 077 089 110 106 110 120 064 065 030 089 049 030 146 062 030 037 090 199 106 115 037 156 144 076 162 142 260 119

P81 105 050 025 090 065 100 065 080 092 052 070 030 061 065 163 130 051 102 070 130 080 150 076 102 110 064 100 130 217 065

P83 137 132 052 092 100 111 100 082 100 027 052 065 062 067 100 077 026 050 052 161 082 104 050 077 120 065 154 132 222 095

P84 150 127 024 037 076 104 076 050 102 050 050 037 086 063 076 049 024 024 050 154 077 127 049 049 062 037 174 100 241 063

606 C1 C2 C30 C38 C4 C9 P8 877 878 1 2 3 4 5 6 7 8 10 11 12 13 15 17 18 19 20 22 23 25

	606	C1	C2	C30	C38	C4	CW	FE	077	070	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	15	17	18	19	20	22	23	25
P05	182	154	076	115	130	161	130	104	130	050	076	080	086	090	107	100	076	074	130	102	162	102	074	154	142	062	105	127	304	117
P06	187	154	050	062	102	132	102	077	150	050	102	062	139	117	076	100	050	074	050	102	077	102	100	049	000	000	204	154	241	090
P07	077	000	030	103	090	120	090	051	118	051	064	050	049	051	118	115	030	000	064	115	092	199	062	115	130	025	162	115	170	051
P08	146	170	064	076	118	130	118	092	090	030	030	076	074	051	118	037	030	012	090	199	120	115	037	115	103	050	133	115	292	105
P09	210	145	065	070	107	124	107	095	135	040	121	070	157	094	079	117	065	090	065	235	067	145	117	063	105	119	214	204	204	094
P90	121	145	065	105	135	139	135	110	052	067	065	105	049	053	135	063	065	063	121	174	110	117	037	174	133	070	100	090	267	000
P91	216	119	066	051	000	113	000	113	000	090	095	079	103	002	130	119	066	091	095	170	003	091	091	091	136	107	172	140	240	111
P92	187	182	172	214	107	230	107	191	240	191	107	156	194	131	312	272	107	211	240	272	270	241	211	226	276	115	204	241	336	109
P93	109	119	053	065	095	143	095	003	124	055	095	065	103	060	124	119	066	091	095	170	113	170	091	105	121	051	111	119	240	060
P94	093	117	079	119	121	139	121	095	093	040	065	091	049	053	195	117	065	090	121	174	139	174	063	109	177	064	152	145	204	100
P95	190	115	064	076	077	106	077	092	132	106	090	050	154	051	160	115	090	062	146	199	135	115	115	000	103	050	133	142	292	105
P96	275	302	229	241	324	290	324	249	199	100	170	272	170	157	199	139	170	139	229	302	265	139	139	253	272	102	157	194	417	216
P102	146	170	090	130	146	120	146	092	090	030	030	103	049	030	132	062	030	037	090	199	120	142	037	170	150	063	140	142	199	119
P104	146	170	064	076	118	135	118	051	118	065	064	076	100	064	118	062	064	037	118	170	135	142	062	115	103	037	119	000	229	091
P105	142	139	007	154	142	144	142	000	142	116	007	100	072	101	199	139	007	112	142	112	144	223	006	194	102	074	101	006	223	129
P106	217	241	130	142	107	161	107	161	150	050	102	142	139	117	130	100	076	074	102	272	132	102	100	154	170	142	174	211	304	174
P107	102	154	050	000	130	161	130	077	076	077	050	000	036	063	130	049	050	049	102	154	132	100	024	127	115	037	174	074	272	063
P100	262	110	100	149	122	002	122	126	066	172	122	149	144	124	122	110	137	161	122	132	060	104	132	161	092	179	203	191	191	001
P114	255	009	051	064	051	039	051	052	134	100	092	030	170	093	105	116	070	076	070	102	052	130	130	050	064	090	210	150	107	107
P115	102	050	052	092	039	060	039	002	122	097	000	030	144	067	152	132	000	104	094	161	097	104	132	050	065	065	217	191	222	067
P116	229	223	199	272	229	144	229	000	291	203	229	211	235	216	114	204	199	204	142	061	116	417	253	253	241	102	270	253	061	157
P117	200	107	070	090	140	167	140	122	119	094	134	110	142	093	051	102	070	102	070	240	000	102	102	076	110	110	242	107	240	065
P110	200	116	105	146	092	026	092	066	177	100	092	090	170	150	092	144	070	130	030	076	039	240	150	102	090	146	242	217	102	135
P119	303	072	040	060	040	100	040	127	153	127	153	035	217	113	153	177	099	123	099	235	073	123	177	023	005	130	290	235	295	113
P120	132	062	030	076	051	092	051	070	104	070	064	025	100	025	175	115	064	062	110	170	120	115	000	000	103	025	162	142	260	070
P121	322	150	105	110	119	000	119	000	177	167	163	118	229	100	070	150	134	150	070	102	052	150	107	076	090	175	309	217	150	121
P122	334	101	090	103	077	065	077	106	132	179	160	103	241	162	104	156	146	170	104	142	051	170	199	000	050	107	321	229	199	091
P123	064	115	064	130	118	149	118	092	118	065	064	076	049	070	205	115	064	000	118	142	149	199	062	170	150	050	162	115	260	105
P125	301	197	150	170	144	104	144	118	263	191	172	142	204	235	144	197	150	102	116	154	110	102	241	074	115	199	333	272	211	109
P126	242	050	079	119	052	067	052	095	135	154	135	064	157	123	210	219	121	174	121	090	001	145	174	103	140	133	262	204	174	137
P127	362	109	195	177	135	001	135	154	165	233	165	177	270	152	195	109	210	174	226	174	154	145	235	109	140	192	262	267	235	190
P128	107	127	050	062	076	104	076	077	150	050	076	037	139	090	130	100	050	049	076	102	104	154	100	049	000	062	174	154	272	117
P129	175	062	030	076	030	051	030	051	118	065	030	025	100	070	132	000	030	062	051	115	070	170	000	062	050	050	192	142	199	070
P130	101	072	099	165	073	073	073	100	126	127	040	005	109	113	240	123	099	123	126	123	156	235	123	177	005	005	227	177	235	113
P131	205	012	051	009	012	065	012	106	090	120	090	037	126	091	220	170	090	142	104	142	092	170	142	101	009	103	255	199	229	091
P132	090	142	064	130	146	149	146	065	118	065	090	103	049	105	118	115	064	115	090	000	092	229	062	170	150	076	162	000	170	070
P133	104	105	000	093	000	090	000	090	053	090	000	091	103	054	169	105	095	091	124	170	113	063	091	133	121	093	220	170	209	096
P135	235	000	064	103	064	051	064	070	146	065	064	050	126	105	104	115	030	000	025	142	051	199	115	062	076	103	223	199	170	105
P136	199	166	007	100	114	116	114	000	007	116	061	126	124	129	007	036	007	006	007	166	116	194	006	139	024	100	247	139	253	049
P137	134	076	025	064	051	066	051	039	070	052	025	030	061	065	092	050	025	050	030	102	066	150	050	076	030	030	100	102	107	039
P130	110	142	064	103	110	106	110	070	030	065	012	103	024	051	104	012	030	037	077	142	106	142	012	170	076	050	162	000	229	051

292 Anexos

26 27 29 33 34 35 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61

F26 000

F27 124 000

F29 049 101 000

F32 114 142 150 000

F34 100 211 064 205 000

F35 115 115 067 137 120 000

F38 115 234 095 000 135 111 000

F39 061 229 065 163 104 000 000 000

F40 036 166 063 130 062 104 104 050 000

F41 100 211 070 175 050 092 120 090 062 000

F42 139 253 103 240 012 161 176 144 100 000 000

F43 061 139 037 130 037 077 104 102 049 037 074 000

F44 072 206 101 007 100 144 062 007 036 100 139 006 000

F45 049 101 053 093 091 095 095 065 063 070 131 063 101 000

F46 126 154 162 175 232 179 210 146 170 107 276 199 211 070 000

F47 007 114 093 070 090 000 100 105 050 064 130 050 007 039 146 000

F48 114 142 121 163 110 000 137 105 076 110 150 102 114 093 146 070 000

F49 114 170 093 134 090 100 100 163 102 110 102 050 142 121 267 070 134 000

F50 144 234 139 197 092 111 156 094 077 120 104 132 116 139 194 100 000 137 000

F51 072 170 075 142 049 116 116 007 012 049 006 036 040 075 211 036 007 007 000 000

F52 007 007 093 163 146 137 197 163 102 090 107 102 142 093 110 105 134 163 137 114 000

F53 142 259 093 192 051 100 100 070 076 064 009 076 114 093 235 070 134 134 094 061 192 000

F54 049 154 070 110 173 149 120 090 000 150 214 115 126 070 130 110 175 110 135 126 090 175 000

F55 114 170 093 192 146 152 102 177 150 110 107 102 199 135 190 163 223 134 167 170 065 177 077 000

F56 101 157 100 093 133 040 095 065 063 105 174 090 101 000 162 039 065 093 067 075 150 093 105 100 000

F57 061 142 093 105 090 000 100 051 024 064 130 076 061 039 110 025 051 134 000 036 105 070 110 192 039 000

F58 116 144 001 167 120 141 156 152 161 149 132 104 203 001 135 137 167 100 141 173 100 152 070 000 154 167 000

F59 106 270 137 210 119 154 154 150 145 070 160 117 106 137 223 121 210 150 110 129 121 065 133 079 137 150 110 000

F60 061 229 065 163 104 000 000 000 050 090 144 102 007 065 146 105 105 163 094 007 163 070 090 177 065 051 152 150 000

F61 112 223 090 130 075 147 077 009 036 000 113 074 036 090 229 063 116 116 090 024 150 063 120 202 090 063 176 131 009 000

F62 006 139 076 150 037 132 147 116 049 062 074 049 006 050 156 050 076 130 104 036 102 063 156 150 117 050 132 131 116 061

F64 129 216 123 121 070 169 001 150 076 133 090 090 075 123 271 079 135 052 095 062 100 093 133 100 100 107 154 137 150 050

F65 049 154 070 064 103 106 065 077 024 103 142 062 024 070 107 051 104 077 092 036 110 104 063 146 051 051 149 140 077 037

F67 036 142 052 105 064 100 094 065 050 064 102 050 007 026 132 051 134 105 137 061 105 065 077 105 093 051 100 107 065 009

F68 036 142 052 105 064 100 094 065 050 064 102 050 007 026 132 051 134 105 137 061 105 065 077 105 093 051 100 107 065 009

F69 142 259 100 163 205 122 137 092 116 146 240 107 114 150 090 140 119 239 100 156 163 177 160 223 093 092 229 195 092 150

F71 101 216 094 131 105 067 001 052 090 070 145 090 129 066 177 065 150 121 124 101 100 052 119 150 053 065 154 094 052 117

F72 139 166 090 217 115 132 161 102 127 142 154 127 166 063 115 130 076 217 132 139 150 130 170 217 105 102 104 204 102 127

F73 075 190 002 124 079 069 069 066 063 079 091 063 103 002 197 066 095 039 090 075 153 095 107 153 054 066 120 141 066 105

F74 124 295 157 229 102 144 173 007 006 154 223 166 124 106 154 170 142 199 000 124 170 170 126 199 101 114 234 106 007 139

F75 006 139 063 102 101 132 104 130 074 115 140 049 112 063 199 050 150 050 147 061 130 102 062 116 090 102 090 117 130 061

F76 075 101 000 065 133 040 095 093 090 105 174 063 129 053 133 039 093 065 124 101 121 121 070 121 026 065 095 137 093 131

F77 114 170 065 134 077 100 100 134 102 110 009 050 142 093 235 070 163 025 122 007 163 105 090 119 093 134 066 121 134 009

F78 049 157 053 121 070 067 095 065 063 025 117 037 101 053 133 065 121 093 124 075 065 093 070 065 000 065 095 000 065 117

F79 000 203 095 137 106 141 002 000 077 120 147 104 116 067 179 000 137 100 126 000 167 052 092 152 095 000 126 095 000 090

26 27 29 33 34 35 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61

	26	27	29	33	34	35	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
P00	074	182	091	118	103	120	106	077	080	076	142	088	126	030	144	064	175	146	179	100	146	077	116	146	105	064	149	119	077	120
P01	061	142	039	163	051	080	100	051	050	064	089	050	087	039	118	078	051	134	094	061	105	078	118	140	093	051	094	150	051	076
P02	062	116	067	108	092	054	111	080	077	038	132	050	116	040	092	052	080	100	111	080	052	100	092	080	067	052	082	095	080	132
P04	036	061	063	076	115	104	132	130	074	115	154	049	112	037	115	050	102	076	161	066	076	150	062	102	090	076	077	174	130	127
P05	061	166	037	150	062	050	104	076	074	062	100	024	112	090	199	102	102	076	132	086	130	102	115	102	090	102	104	145	076	127
P06	086	061	090	102	142	077	161	150	127	142	182	074	166	063	115	076	076	102	161	139	102	107	115	130	090	102	077	204	150	102
P07	049	126	078	118	076	092	120	064	012	076	115	062	049	051	130	030	030	110	065	024	090	090	103	175	051	012	149	162	064	049
P08	049	126	051	090	103	065	092	090	080	076	142	037	126	051	150	064	146	064	179	100	110	110	076	090	078	090	092	133	090	142
P09	129	101	100	065	177	081	095	135	160	162	219	117	157	053	105	079	107	135	169	171	150	165	119	165	080	107	081	182	135	160
P00	101	106	053	150	030	095	095	093	090	051	050	037	129	053	192	065	150	065	139	075	150	065	133	135	100	093	081	100	093	090
P01	103	160	121	153	093	159	159	124	119	107	105	119	160	054	107	095	153	153	113	131	095	095	107	109	141	095	055	082	124	100
P02	139	315	109	240	199	222	176	116	100	199	241	211	139	109	156	107	150	217	104	139	107	172	120	217	145	130	254	109	116	140
P03	075	131	068	124	079	069	083	080	063	107	119	063	103	060	151	066	039	066	069	075	124	080	093	124	054	066	090	126	080	091
P04	075	216	066	121	051	081	053	039	050	051	090	063	049	066	177	079	107	135	095	062	150	039	133	150	080	052	154	100	039	063
P05	049	154	078	118	144	149	120	090	080	107	156	115	126	078	150	118	175	090	135	126	146	175	025	132	105	110	078	192	090	120
P06	235	295	247	199	272	234	173	259	223	154	315	194	265	186	272	142	259	142	265	206	170	229	102	170	186	199	234	129	259	230
P102	074	182	105	064	130	106	065	077	075	076	170	080	074	051	150	051	160	132	179	087	146	104	116	175	070	051	179	140	077	101
P104	049	126	078	064	103	135	092	132	075	130	115	062	074	078	107	077	160	051	149	087	110	160	063	110	105	104	092	177	132	101
P105	072	206	101	199	049	173	173	114	061	100	036	086	090	101	211	114	142	116	116	072	142	142	154	199	157	087	144	216	114	112
P106	139	166	117	130	170	050	132	130	102	115	211	100	223	090	170	102	150	130	222	194	107	150	170	150	090	130	132	174	130	241
P107	061	139	063	130	062	132	132	130	049	037	100	024	086	063	170	050	130	076	132	036	050	102	080	076	117	076	104	090	130	074
P100	203	144	110	229	164	108	204	197	191	149	191	161	234	095	179	137	229	213	220	173	122	167	179	152	217	167	126	154	197	161
P114	061	087	079	134	175	152	167	134	130	205	202	130	170	065	118	134	163	140	197	170	119	223	064	119	150	134	080	242	134	107
P115	062	080	067	137	164	111	141	080	077	149	206	132	116	067	092	108	100	167	097	116	052	167	030	100	095	080	097	154	080	110
P116	235	206	247	259	241	203	290	229	166	272	253	253	206	216	272	170	142	259	144	170	229	259	272	324	157	142	290	345	229	194
P117	170	114	150	105	190	137	167	192	150	146	232	130	199	065	110	051	134	134	152	142	105	163	110	140	093	105	094	121	192	144
P118	114	061	135	163	220	122	229	163	150	205	240	107	199	093	118	134	134	239	213	199	119	255	175	200	150	105	182	309	163	240
P119	109	109	113	153	223	105	105	153	177	252	264	177	217	060	085	153	153	210	214	217	153	240	085	101	169	153	073	250	153	206
P120	024	154	051	118	116	120	092	038	037	130	156	080	074	051	130	090	118	110	106	074	118	118	025	132	070	064	106	162	030	075
P121	170	087	150	192	235	197	262	255	217	235	263	187	259	121	146	163	192	200	229	229	105	200	146	119	210	192	100	242	255	240
P122	102	074	119	205	232	194	242	235	229	200	260	199	272	105	150	175	205	220	250	241	160	267	150	190	223	205	106	207	235	229
P123	049	102	051	175	050	092	120	064	037	050	088	037	074	078	107	090	090	118	120	049	110	090	130	146	105	064	149	162	064	080
P125	166	086	109	217	300	206	320	279	241	260	336	241	204	174	142	217	217	263	230	204	063	301	142	116	235	217	147	267	279	336
P126	101	106	100	242	140	201	201	107	117	162	174	174	157	094	119	100	150	250	139	157	107	165	119	150	190	121	110	102	107	160
P127	106	216	167	242	207	233	233	195	235	207	299	267	270	102	239	242	344	242	249	270	195	250	119	165	230	242	154	214	195	267
P128	036	086	063	102	142	077	132	102	100	142	102	074	139	063	115	102	102	102	161	139	102	107	062	102	090	102	077	204	102	102
P129	024	049	051	118	130	092	149	090	062	130	170	080	100	051	103	090	090	146	149	100	064	175	076	132	105	064	120	223	090	142
P130	059	109	060	210	130	127	105	099	072	130	177	123	109	113	194	153	153	210	185	109	099	101	130	101	169	099	214	250	099	150
P131	074	126	064	205	130	149	164	077	080	150	170	142	126	064	116	146	118	235	149	126	110	132	116	190	162	090	120	207	077	120
P132	100	154	070	175	037	092	149	110	062	050	062	037	100	070	107	064	064	104	106	049	110	090	107	175	105	064	135	162	110	080
P133	103	190	082	124	136	159	083	095	105	107	178	119	103	060	151	109	200	169	159	117	109	095	079	095	141	109	090	082	095	091
P135	074	049	105	118	107	092	179	110	115	150	229	142	154	051	076	090	090	205	179	154	090	205	130	190	105	064	149	255	110	199
P136	124	024	075	142	154	116	203	229	139	154	194	086	170	101	211	087	170	114	234	124	087	199	154	142	157	142	144	216	229	166
P137	036	036	039	105	090	080	117	105	050	090	130	050	087	039	110	051	070	105	137	061	051	134	090	119	093	051	100	100	105	102
P138	074	100	051	118	076	092	120	110	062	050	115	037	100	051	107	030	146	090	179	049	090	090	130	132	105	064	149	133	110	080
	26	27	29	33	34	35	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61

294 Anexos

62 64 66 67 68 69 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95
P62 000
P64 090 000
P66 000 051 000
P67 050 033 064 000
P68 050 033 064 000 000
P69 107 210 110 163 163 000
P71 117 123 031 039 039 135 000
P72 074 204 170 130 130 107 174 000
P73 119 060 065 066 066 130 054 170 000
P74 194 186 100 170 170 036 157 223 131 000
P75 007 063 049 063 063 232 103 154 091 194 000
P76 117 123 064 065 065 135 053 145 054 157 063 000
P77 116 065 077 092 092 239 107 150 066 199 024 065 000
P78 090 137 078 039 039 121 053 145 054 129 090 053 093 000
P79 090 067 078 039 039 102 053 161 069 173 077 095 100 095 000
P80 000 133 103 012 012 175 025 170 079 211 101 070 132 051 051 000
P81 037 135 090 065 065 134 107 024 095 142 102 093 105 065 100 104 000
P83 077 154 092 052 052 100 067 104 069 144 104 040 100 013 111 065 052 000
P84 074 117 062 050 050 107 117 127 091 194 049 037 076 063 104 000 076 050 000
P85 100 145 000 076 076 150 090 127 063 139 100 063 076 037 132 115 050 050 074 000
P86 100 174 115 102 102 107 145 100 119 223 100 037 102 090 161 142 076 050 024 074 000
P87 037 091 037 064 064 104 105 000 079 100 000 070 110 070 092 103 030 065 062 000 000 000
P88 115 133 076 030 030 175 051 170 051 102 062 025 064 025 092 050 090 030 037 037 062 103 000
P89 131 167 119 107 107 165 100 090 126 247 103 039 107 100 139 119 093 067 063 117 037 119 070 000
P90 076 094 105 052 052 210 066 117 054 216 063 000 039 053 095 064 065 067 090 063 117 105 051 100 000
P91 077 126 136 053 053 104 096 119 114 220 119 111 124 002 069 065 095 069 091 140 119 107 107 111 002 000
P92 102 145 115 150 150 076 174 241 140 036 197 204 232 174 110 199 172 191 211 211 272 115 229 203 251 193 000
P93 063 060 065 066 066 130 002 091 056 131 077 054 000 002 055 107 053 069 063 063 063 051 079 002 096 099 119 000
P94 063 094 064 039 039 107 039 117 060 129 117 094 121 053 067 051 052 067 117 063 145 064 070 123 066 096 145 060 000
P95 156 105 063 077 077 190 119 170 079 154 062 070 064 105 092 116 110 120 062 115 115 103 076 119 105 107 156 093 133 000
P96 253 171 196 170 170 275 157 302 131 295 166 157 199 129 144 154 291 144 194 253 253 241 154 231 106 190 253 190 211 241
P102 115 119 063 030 030 132 030 199 065 102 101 064 132 051 070 025 110 065 000 115 142 009 050 105 070 107 199 121 051 116
P104 115 064 037 064 064 190 119 199 065 102 049 064 051 070 106 103 110 092 037 000 000 009 050 105 070 107 199 093 105 037
P105 006 101 100 007 007 199 157 166 075 170 139 157 116 101 144 126 007 116 112 112 166 074 126 216 075 103 194 131 101 100
P106 102 235 170 102 102 107 063 102 091 253 154 037 130 063 161 000 130 050 100 074 074 170 037 063 090 140 336 119 117 170
P107 049 090 062 050 050 107 117 154 091 166 049 090 076 037 104 000 076 050 049 074 100 062 062 145 063 091 102 091 090 115
P108 132 201 210 137 137 296 105 132 207 332 132 105 152 154 172 149 137 141 161 222 191 179 179 154 110 113 320 190 105 194
P114 144 100 110 092 092 223 165 130 130 229 102 093 119 121 137 132 105 100 050 130 076 110 090 093 135 109 232 109 165 051
P115 110 154 070 094 094 122 139 104 120 116 104 095 137 095 111 135 000 002 077 132 104 065 120 110 154 090 110 003 124 065
P116 194 216 102 259 259 229 270 223 220 235 253 216 259 270 265 303 199 234 223 204 223 126 303 247 270 252 253 190 247 241
P117 116 150 132 119 119 200 135 130 153 259 076 065 105 121 137 132 134 000 076 107 076 110 110 052 121 095 263 109 100 146
P118 150 250 175 134 134 192 100 150 169 259 217 121 239 150 197 146 134 100 102 107 102 110 146 121 195 130 279 153 100 160
P119 150 227 165 126 126 240 190 072 201 276 123 113 153 169 156 165 099 127 072 177 072 130 130 060 169 114 264 114 190 005
P120 101 105 037 051 051 132 091 115 079 100 062 070 090 070 065 009 064 092 062 000 115 050 076 119 105 107 101 065 070 025
P121 172 242 205 177 177 200 250 150 232 324 150 150 177 100 229 220 163 137 102 217 102 175 175 121 195 130 329 169 250 160
62 64 66 67 68 69 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95

62 64 66 67 68 69 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95
F122 170 239 217 175 175 334 255 115 245 370 142 162 160 223 210 217 146 179 115 229 115 187 187 105 177 151 350 166 255 144
F123 062 133 076 064 064 146 105 115 079 126 115 105 118 051 120 103 030 065 080 037 115 050 076 162 070 136 170 079 051 130
F125 241 316 229 217 217 240 299 241 257 204 241 174 263 174 206 260 217 132 127 241 127 199 199 174 203 163 304 209 299 105
F126 117 214 162 121 121 100 190 090 107 106 109 190 210 137 139 162 079 124 145 174 174 105 192 182 167 082 174 141 137 133
F127 299 246 207 100 100 292 190 299 203 270 109 190 195 190 169 192 250 217 204 267 267 255 192 230 214 156 267 236 246 119
F128 127 174 080 076 076 150 117 127 091 166 100 037 102 063 132 115 076 050 024 049 024 080 037 063 117 119 211 063 117 062
F129 080 162 076 064 064 146 133 115 107 150 115 070 146 070 120 103 064 065 037 080 062 050 076 105 133 107 170 079 105 076
F130 123 190 111 099 099 101 169 177 142 162 177 169 210 113 156 130 099 127 123 123 177 005 130 227 169 171 177 142 113 130
F131 000 192 130 090 090 175 162 062 166 102 156 162 190 133 106 130 051 120 115 142 142 076 150 140 140 093 170 107 105 116
F132 037 119 103 090 090 175 133 000 093 102 115 105 104 070 149 130 030 065 000 062 080 050 103 133 064 121 229 079 070 173
F133 119 126 093 066 066 169 096 140 130 190 091 126 124 082 069 079 109 090 119 140 170 121 107 126 096 070 170 130 082 107
F135 115 223 130 090 090 146 133 115 136 211 170 070 205 105 149 103 090 065 062 142 062 076 103 070 162 107 229 107 133 130
F136 112 157 126 114 114 291 106 194 160 295 086 101 114 129 173 154 142 116 061 139 006 126 100 129 129 160 315 131 106 154
F137 050 121 064 051 051 163 121 102 095 170 076 065 105 065 100 090 051 052 024 076 050 030 064 093 093 095 187 066 093 090
F138 062 105 076 030 030 205 070 170 079 211 062 070 090 051 092 050 090 065 062 000 115 076 050 133 051 107 229 107 070 130
62 64 66 67 68 69 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95

96 102 104 105 106 107 100 114 115 116 117 110 119 120 121 122 123 125 126 127 120 129 130 131 132 133 135 136 137 130
F96 000
F102 140 000
F104 196 076 000
F105 295 126 074 000
F106 194 000 142 223 000
F107 139 000 062 006 154 000
F100 234 179 194 203 222 132 000
F114 291 146 077 142 150 130 122 000
F115 234 135 106 144 191 104 126 066 000
F116 429 272 241 206 340 253 203 170 173 000
F117 142 132 132 229 130 102 100 134 100 229 000
F118 324 146 160 170 150 107 137 065 094 114 163 000
F119 339 194 130 217 177 177 156 040 073 276 099 126 000
F120 241 009 063 100 170 000 179 064 030 211 146 146 005 000
F121 291 235 160 229 217 150 000 051 100 142 105 070 099 175 000
F122 370 240 173 241 229 199 065 051 106 102 110 090 060 150 030 000
F123 272 103 103 074 142 062 210 146 120 241 205 175 194 076 235 240 000
F125 204 260 105 253 241 102 161 009 090 194 150 076 150 199 050 115 260 000
F126 345 192 177 129 267 145 110 079 067 157 195 107 113 091 107 119 133 131 000
F127 270 207 177 247 267 235 124 093 124 216 226 150 190 140 135 133 207 145 123 000
F128 253 115 062 139 074 100 222 050 077 253 130 102 072 062 130 142 000 127 145 204 000
F129 272 103 076 100 142 000 164 051 030 102 146 051 005 050 110 116 076 101 091 177 037 000
F130 339 130 130 109 235 123 105 126 073 217 271 099 201 005 210 194 005 177 113 190 123 035 000
F131 370 150 150 126 229 142 135 090 051 211 190 104 005 063 160 116 103 185 030 177 115 050 060 000
F132 272 130 116 074 142 062 149 146 149 154 146 146 194 130 175 107 050 229 133 207 115 103 130 130 000
F133 175 079 107 160 170 091 003 109 003 252 124 169 142 079 130 151 136 193 002 111 140 121 142 093 166 000
F135 272 103 130 154 115 142 164 077 065 102 110 025 005 103 110 116 130 101 119 207 062 025 005 076 130 151 000
96 102 104 105 106 107 100 114 115 116 117 110 119 120 121 122 123 125 126 127 120 129 130 131 132 133 135 136 137 130

296 Anexos

96 102 104 105 106 107 108 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 125 126 127 128 129 130 131 132 133 135 136 137 138
F136 235 154 188 178 166 086 116 114 115 235 114 114 162 154 114 100 154 139 215 215 112 074 109 154 126 160 188 088
F137 229 090 064 087 130 050 122 065 052 170 105 065 099 064 105 104 064 115 107 195 050 012 048 064 064 109 038 036 088
F138 154 050 076 100 115 037 106 132 120 241 118 132 194 103 175 173 076 214 177 207 115 076 085 130 076 093 103 049 038 088
96 102 104 105 106 107 108 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 125 126 127 128 129 130 131 132 133 135 136 137 138

ANEXO V. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DISCRIMINANTE.

Clasificación de los cultivares de chirimoyo según las funciones de clasificación proporcionadas por el análisis discriminante. Se muestra para cada cv. (agrupados por zonas de origen) bajo el epígrafe *clasificaciones incorrectas* el país incorrecto en el que ha sido reunido, la distancia de Mahalanobis para cada centro (país) y la probabilidad de que pertenezca a ese país.

CLASIFICACIONES INCORRECTAS	JACKKNIFED MAHALANOBIS D ² Y PROBABILIDAD POSTERIOR PARA CADA GRUPO:						
	ESPAÑA	USA	BOLIVIA	CHILE	MADEIRA	ECUADOR	PERU
ESPAÑA							
CA	20.5 1.000	101.6 0.000	152.0 0.000	43.4 0.000	71.6 0.000	51.0 0.000	54.6 0.000
CM	20.5 1.000	101.6 0.000	152.0 0.000	43.4 0.000	71.6 0.000	51.0 0.000	54.6 0.000
FI	9.9 1.000	61.8 0.000	152.0 0.000	36.8 0.000	70.0 0.000	48.8 0.000	49.2 0.000
MA	87.1 0.000	40.5 0.988	87.8 0.000	55.9 0.000	58.0 0.000	49.6 0.011	55.6 0.001
NE	19.8 1.000	102.1 0.000	151.2 0.000	44.6 0.000	68.2 0.000	54.2 0.000	53.4 0.000
PC	16.2 1.000	69.1 0.000	140.8 0.000	41.9 0.000	81.1 0.000	57.9 0.000	55.4 0.000
FW	39.9 0.000	31.4 0.000	99.3 0.000	13.8 0.020	21.0 0.001	6.1 0.922	11.6 0.058
FAE	9.9 1.000	61.8 0.000	152.0 0.000	36.8 0.000	70.0 0.000	48.8 0.000	49.2 0.000
ESTADOS UNIDOS							
BA	**** 0.000	**** 1.000	**** 0.000	**** 0.000	**** 0.000	**** 0.000	**** 0.000
BO	57.7 0.000	27.6 0.732	127.5 0.000	30.6 0.159	70.4 0.000	32.3 0.070	33.4 0.040
BE	192.7 0.000	110.3 0.000	84.4 1.000	145.1 0.000	181.8 0.000	154.5 0.000	153.2 0.000
CH	35.7 0.000	32.9 0.000	87.6 0.000	4.4 0.243	38.9 0.000	7.0 0.066	2.3 0.691
CT	113.4 0.000	52.7 0.634	54.2 0.292	57.4 0.061	99.5 0.000	64.8 0.001	60.6 0.012
LO	25.3 0.000	30.8 0.000	88.8 0.000	3.3 0.150	24.4 0.000	1.0 0.459	1.4 0.381
PI	25.8 0.000	39.8 0.000	94.4 0.000	9.6 0.077	21.6 0.000	6.6 0.581	6.6 0.341
SA	59.8 0.000	30.8 0.729	121.8 0.000	35.8 0.061	44.9 0.001	39.2 0.011	33.4 0.199
SP	239.8 0.949	245.7 0.051	371.4 0.000	267.1 0.000	290.7 0.000	272.6 0.000	282.3 0.000
WH	446.3 0.000	245.7 1.000	357.2 0.000	348.2 0.000	378.9 0.000	346.5 0.000	332.3 0.000
BOLIVIA							
B1	125.9 0.000	105.0 0.000	32.0 1.000	84.3 0.000	109.8 0.000	92.9 0.000	84.2 0.000
B2	99.3 0.000	46.8 0.000	24.8 1.000	58.2 0.000	87.4 0.000	65.9 0.000	60.8 0.000
B3	163.3 0.000	125.1 0.000	27.5 1.000	133.2 0.000	157.2 0.000	146.1 0.000	136.8 0.000
CHILE							
BS	38.9 0.000	28.0 0.000	73.6 0.000	8.5 0.186	46.7 0.000	13.0 0.020	5.6 0.795
CL	29.2 0.000	24.5 0.000	91.3 0.000	6.5 0.058	30.3 0.000	1.2 0.849	5.6 0.093
CO	36.2 0.000	23.2 0.000	86.2 0.000	5.4 0.159	38.8 0.000	6.9 0.074	2.3 0.767
CM	36.2 0.000	23.2 0.000	86.2 0.000	5.4 0.159	38.8 0.000	6.9 0.074	2.3 0.767
CR	41.1 0.000	40.9 0.000	71.7 0.000	20.8 0.197	52.6 0.000	19.7 0.334	19.0 0.479
EM	130.6 0.000	73.0 0.001	60.1 0.763	81.2 0.000	88.6 0.000	65.4 0.053	62.9 0.183
EW	25.1 0.000	25.6 0.000	93.1 0.000	8.4 0.023	23.1 0.000	1.1 0.904	6.1 0.073
HY	8.3 1.000	72.0 0.000	170.3 0.000	55.7 0.000	77.8 0.000	59.1 0.000	60.2 0.000
SE	11.1 1.000	68.4 0.000	145.0 0.000	50.6 0.000	84.5 0.000	56.7 0.000	57.0 0.000
AE	36.2 0.000	23.2 0.000	86.2 0.000	5.4 0.159	38.8 0.000	6.9 0.074	2.3 0.767
OTROS							
IA	30.6 0.000	23.0 0.000	86.9 0.000	4.6 0.162	30.4 0.000	5.6 0.096	1.5 0.742
BRON	29.0 0.000	24.5 0.000	91.3 0.000	5.2 0.108	30.5 0.000	1.2 0.801	5.5 0.091
BUR	25.9 0.000	27.4 0.000	93.7 0.000	9.2 0.085	21.7 0.000	5.4 0.565	6.4 0.350
MOS	22.9 1.000	104.2 0.000	150.8 0.000	50.9 0.000	54.8 0.000	58.3 0.000	59.4 0.000
MADEIRA							
M4	36.6 0.000	33.4 0.000	91.6 0.000	17.3 0.029	13.7 0.181	16.7 0.041	10.8 0.749
M5	51.4 0.000	55.6 0.000	111.1 0.000	40.8 0.000	0.9 1.000	33.4 0.000	34.2 0.000
M7	51.4 0.000	55.6 0.000	111.1 0.000	40.8 0.000	0.9 1.000	33.4 0.000	34.2 0.000
M10	75.7 0.000	65.1 0.000	187.4 0.000	54.3 0.000	30.2 0.999	45.5 0.000	47.8 0.000
M14	31.5 0.000	36.3 0.000	97.9 0.000	19.8 0.000	4.6 0.977	12.6 0.018	15.6 0.004
M16	50.6 0.000	70.0 0.000	73.7 0.000	49.4 0.000	30.0 0.998	43.4 0.001	45.4 0.000
M17	51.4 0.000	55.6 0.000	111.1 0.000	40.8 0.000	0.9 1.000	33.4 0.000	34.2 0.000
M19	51.4 0.000	55.6 0.000	111.1 0.000	40.8 0.000	0.9 1.000	33.4 0.000	34.2 0.000
M23	51.4 0.000	55.6 0.000	111.1 0.000	40.8 0.000	0.9 1.000	33.4 0.000	34.2 0.000
M25	51.4 0.000	55.6 0.000	111.1 0.000	40.8 0.000	0.9 1.000	33.4 0.000	34.2 0.000
ECUADOR							
LPL	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093
LPP	25.8 0.000	27.4 0.000	93.4 0.000	9.3 0.091	21.6 0.000	5.8 0.523	6.5 0.385
E1	25.3 0.000	21.8 0.000	87.2 0.000	3.3 0.154	24.4 0.000	1.1 0.459	1.4 0.387
E2	25.3 0.000	21.8 0.000	87.2 0.000	3.3 0.154	24.4 0.000	1.1 0.459	1.4 0.387
E3	29.1 0.000	26.9 0.000	76.3 0.000	5.4 0.374	35.9 0.000	5.2 0.425	6.7 0.201
E4	29.1 0.000	26.9 0.000	76.3 0.000	5.4 0.374	35.9 0.000	5.2 0.425	6.7 0.201
E5	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093
E6	24.8 0.000	25.4 0.000	92.5 0.000	6.6 0.056	23.1 0.000	1.1 0.867	6.0 0.077
E8	24.8 0.000	25.4 0.000	92.5 0.000	6.6 0.056	23.1 0.000	1.1 0.867	6.0 0.077
E9	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093
E10	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093
E11	25.3 0.000	21.8 0.000	87.2 0.000	3.3 0.154	24.4 0.000	1.1 0.459	1.4 0.387
E12	24.8 0.000	25.4 0.000	92.5 0.000	6.6 0.056	23.1 0.000	1.1 0.867	6.0 0.077
E13	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093
E14	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093
E15	30.0 0.000	21.5 0.000	86.1 0.000	2.4 0.258	32.3 0.000	1.8 0.347	1.6 0.395
E16	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093
E17	25.8 0.000	27.4 0.000	93.4 0.000	9.3 0.091	21.6 0.000	5.8 0.523	6.5 0.385
E18	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093

CLASIFICACIONES INCORRECTAS	JACKKNIFED MAHALANOBIS D' Y PROBABILIDAD POSTERIOR PARA CADA GRUPO:							
	ESPAÑA	USA	BOLIVIA	CHILE	MADERIRA	ECUADOR	PERU	
E20	25.3 0.000	21.8 0.000	87.2 0.000	3.3 0.154	24.4 0.000	1.1 0.459	1.4 0.387	
E21	25.3 0.000	21.8 0.000	87.2 0.000	3.3 0.154	24.4 0.000	1.1 0.459	1.4 0.387	
E22	25.3 0.000	21.8 0.000	87.2 0.000	3.3 0.154	24.4 0.000	1.1 0.459	1.4 0.387	
E23	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093	
E24	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093	
E25	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093	
E26	24.8 0.000	25.4 0.000	92.5 0.000	6.6 0.056	23.1 0.000	1.1 0.867	6.0 0.077	
E27	PERU	30.0 0.000	21.5 0.000	86.1 0.000	2.4 0.258	32.3 0.000	1.8 0.347	
E28	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093	
E29	24.8 0.000	25.4 0.000	92.5 0.000	6.6 0.056	23.1 0.000	1.1 0.867	6.0 0.077	
E30	24.8 0.000	25.4 0.000	92.5 0.000	6.6 0.056	23.1 0.000	1.1 0.867	6.0 0.077	
E31	28.9 0.000	24.4 0.000	90.9 0.000	5.2 0.111	30.4 0.000	1.2 0.795	5.5 0.093	
E32	35.1 0.000	29.9 0.000	90.1 0.000	12.4 0.090	13.3 0.057	8.7 0.583	10.2 0.269	
E33	PERU	30.0 0.000	21.5 0.000	86.1 0.000	2.4 0.258	32.3 0.000	1.8 0.347	
E34	25.3 0.000	21.8 0.000	87.2 0.000	3.3 0.154	24.4 0.000	1.1 0.459	1.4 0.387	
E35	PERU	30.0 0.000	21.5 0.000	86.1 0.000	2.4 0.258	32.3 0.000	1.8 0.347	
E36	25.8 0.000	27.4 0.000	93.4 0.000	9.3 0.091	21.6 0.000	5.8 0.523	6.5 0.385	
E37	25.3 0.000	21.8 0.000	87.2 0.000	3.3 0.154	24.4 0.000	1.1 0.459	1.4 0.387	
E38	25.3 0.000	21.8 0.000	87.2 0.000	3.3 0.154	24.4 0.000	1.1 0.459	1.4 0.387	
E39	25.3 0.000	21.8 0.000	87.2 0.000	3.3 0.154	24.4 0.000	1.1 0.459	1.4 0.387	
PERU								
F410	ESPAÑA	54.1 0.760	73.3 0.000	84.6 0.000	56.4 0.239	103.9 0.000	80.4 0.000	
P604	BOLIVIA	119.1 0.000	73.9 0.002	62.8 0.535	66.5 0.085	80.7 0.000	65.0 0.175	
P606	ESPAÑA	54.1 0.760	73.3 0.000	84.6 0.000	56.4 0.239	103.9 0.000	80.4 0.000	
C1	ECUADOR	28.9 0.000	24.5 0.000	91.2 0.000	5.2 0.106	30.4 0.000	1.2 0.811	
C2		29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	
C3Td	ECUADOR	28.9 0.000	24.5 0.000	91.2 0.000	5.2 0.106	30.4 0.000	1.2 0.811	
C3Te		29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	
C4		36.5 0.000	27.3 0.000	85.8 0.000	10.0 0.129	15.6 0.008	9.1 0.203	
CU	ECUADOR	28.9 0.000	24.5 0.000	91.2 0.000	5.2 0.106	30.4 0.000	1.2 0.811	
FE		37.3 0.000	29.1 0.000	86.4 0.000	12.5 0.055	13.9 0.027	13.4 0.035	
SP77	ECUADOR	28.9 0.000	24.5 0.000	91.2 0.000	5.2 0.106	30.4 0.000	1.2 0.811	
SP78		30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	
F1		35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	
F2		29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	
F3		35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	
F4	ECUADOR	25.3 0.000	21.8 0.000	87.3 0.000	3.3 0.153	24.4 0.000	1.0 0.470	
F5		37.3 0.000	29.1 0.000	86.4 0.000	12.5 0.055	13.9 0.027	13.4 0.035	
F6		35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	
F7		35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	
F8		35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	
F10		73.7 0.000	44.5 0.000	167.8 0.000	31.5 0.098	51.3 0.000	32.9 0.050	
F11	MADERIRA	69.2 0.000	54.3 0.000	103.5 0.000	39.4 0.000	21.3 0.395	42.0 0.000	
F12		36.5 0.000	27.3 0.000	85.8 0.000	10.0 0.129	15.6 0.008	9.1 0.203	
F13	CHILE	40.3 0.000	40.9 0.000	71.7 0.000	16.8 0.679	53.3 0.000	19.8 0.148	
F15		35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	
F17	CHILE	31.3 0.000	25.1 0.000	72.7 0.000	3.7 0.454	38.9 0.000	6.5 0.115	
F18		29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	
F19		30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	
F20		30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	
F22		35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	
F23	MADERIRA	62.9 0.000	59.7 0.000	110.3 0.000	46.0 0.000	8.5 1.000	45.0 0.000	
F25	ECUADOR	25.3 0.000	21.8 0.000	87.3 0.000	3.3 0.153	24.4 0.000	1.0 0.470	
F26		35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	
F27		35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	
F29		29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	
F33	USA	58.0 0.000	23.7 0.999	131.6 0.000	38.8 0.001	65.0 0.000	40.9 0.000	
F34		29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	
F35		30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	
F38	ECUADOR	25.8 0.000	27.4 0.000	93.8 0.000	9.4 0.083	21.6 0.000	5.5 0.588	
F39	ECUADOR	25.3 0.000	21.8 0.000	87.3 0.000	3.3 0.153	24.4 0.000	1.0 0.470	
F40		30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	
F41		38.3 0.000	27.9 0.000	73.6 0.000	6.8 0.363	46.9 0.000	13.0 0.016	
F42		29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	
F43		35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	
F44		30.4 0.000	27.9 0.000	92.4 0.000	10.1 0.104	26.9 0.000	9.6 0.135	
F45		29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	
F46		29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	
F47		30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	
F48		30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	
F49		30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	
F50		28.5 0.000	32.5 0.000	81.2 0.000	12.2 0.214	29.5 0.000	11.8 0.262	
F51		30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	
F52	CHILE	52.6 0.000	44.4 0.000	71.2 0.000	20.7 0.520	67.9 0.000	31.1 0.003	
F53	ECUADOR	24.8 0.000	25.5 0.000	92.9 0.000	6.7 0.052	23.1 0.000	1.1 0.881	
F54		27.3 0.000	26.0 0.000	74.3 0.000	5.2 0.322	31.5 0.000	6.4 0.177	
F55		76.0 0.000	56.1 0.000	140.6 0.000	37.9 0.389	64.2 0.000	43.5 0.024	
F56		30.4 0.000	27.9 0.000	92.4 0.000	10.1 0.104	26.9 0.000	9.6 0.135	
F57		30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	
F58	ECUADOR	29.1 0.000	27.0 0.000	76.3 0.000	5.5 0.351	36.0 0.000	4.9 0.475	
F59	CHILE	37.5 0.000	43.5 0.000	74.7 0.000	19.9 0.520	46.9 0.000	21.2 0.262	
F60	ECUADOR	25.3 0.000	21.8 0.000	87.3 0.000	3.3 0.153	24.4 0.000	1.0 0.470	
F61	ECUADOR	25.8 0.000	27.4 0.000	93.8 0.000	9.4 0.083	21.6 0.000	5.5 0.588	
F62		29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	
F64	ECUADOR	25.8 0.000	27.4 0.000	93.8 0.000	9.4 0.083	21.6 0.000	5.5 0.588	
F66		30.4 0.000	27.9 0.000	92.4 0.000	10.1 0.104	26.9 0.000	9.6 0.135	
F67		29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	
F68		29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	
F69		30.4 0.000	27.9 0.000	92.4 0.000	10.1 0.104	26.9 0.000	9.6 0.135	
F71	ECUADOR	25.3 0.000	21.8 0.000	87.3 0.000	3.3 0.153	24.4 0.000	1.0 0.470	
F72	ECUADOR	28.9 0.000	24.5 0.000	91.2 0.000	5.2 0.106	30.4 0.000	1.2 0.811	

CLASIFICACIONES INCORRECTAS	JACKKNIFED MAHALANOBIS D ² Y PROBABILIDAD POSTERIOR PARA CADA GRUPO:								
	ESPAÑA	USA	BOLIVIA	CHILE	MADEIRA	ECUADOR	PERU		
P73	30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	1.5 0.739		
P74	30.4 0.000	27.9 0.000	92.4 0.000	10.1 0.104	26.9 0.000	9.6 0.135	6.1 0.761		
P75	ECUADOR 25.3 0.000	21.8 0.000	87.3 0.000	3.3 0.153	24.4 0.000	1.0 0.470	1.5 0.378		
P76	30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	1.5 0.739		
P77	ECUADOR 25.3 0.000	21.8 0.000	87.3 0.000	3.3 0.153	24.4 0.000	1.0 0.470	1.5 0.378		
P78	38.3 0.000	27.9 0.000	73.6 0.000	6.8 0.363	46.9 0.000	13.0 0.016	5.7 0.621		
P79	ECUADOR 24.8 0.000	25.5 0.000	92.9 0.000	6.7 0.052	23.1 0.000	1.1 0.881	6.2 0.067		
P80	29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	1.6 0.383		
P81	29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	1.6 0.383		
P83	38.3 0.000	27.9 0.000	73.6 0.000	6.8 0.363	46.9 0.000	13.0 0.016	5.7 0.621		
P84	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P85	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P86	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P87	30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	1.5 0.739		
P88	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P89	ECUADOR 25.3 0.000	21.8 0.000	87.3 0.000	3.3 0.153	24.4 0.000	1.0 0.470	1.5 0.378		
P90	29.9 0.000	21.5 0.000	86.2 0.000	2.4 0.254	32.2 0.000	1.7 0.362	1.6 0.383		
P91	ECUADOR 29.1 0.000	27.0 0.000	76.3 0.000	5.5 0.351	36.0 0.000	4.9 0.475	6.9 0.174		
P92	ECUADOR 25.8 0.000	27.4 0.000	93.8 0.000	9.4 0.083	21.6 0.000	5.5 0.588	6.7 0.329		
P93	ECUADOR 25.3 0.000	21.8 0.000	87.3 0.000	3.3 0.153	24.4 0.000	1.0 0.470	1.5 0.378		
P94	ECUADOR 25.3 0.000	21.8 0.000	87.3 0.000	3.3 0.153	24.4 0.000	1.0 0.470	1.5 0.378		
P95	ECUADOR 25.3 0.000	21.8 0.000	87.3 0.000	3.3 0.153	24.4 0.000	1.0 0.470	1.5 0.378		
P96	48.3 0.000	45.6 0.000	72.9 0.000	22.4 0.387	59.7 0.000	31.1 0.005	21.5 0.608		
P102	30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	1.5 0.739		
P104	30.4 0.000	22.9 0.000	86.5 0.000	4.6 0.164	30.3 0.000	5.6 0.097	1.5 0.739		
P105	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P106	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P107	38.3 0.000	27.9 0.000	73.6 0.000	6.8 0.363	46.9 0.000	13.0 0.016	5.7 0.621		
P108	34.2 0.000	31.5 0.000	74.3 0.000	11.7 0.235	17.5 0.013	10.9 0.350	10.6 0.402		
P114	36.5 0.000	27.3 0.000	85.8 0.000	10.0 0.129	15.6 0.008	9.1 0.203	6.7 0.660		
P115	27.3 0.000	26.0 0.000	74.3 0.000	5.2 0.322	31.5 0.000	6.4 0.177	4.4 0.501		
P116	MADEIRA 62.9 0.000	59.7 0.000	110.3 0.000	46.0 0.000	8.5 1.000	45.0 0.000	36.3 0.000		
P117	27.3 0.000	26.0 0.000	74.3 0.000	5.2 0.322	31.5 0.000	6.4 0.177	4.4 0.501		
P118	42.9 0.000	29.5 0.000	86.1 0.000	12.4 0.093	22.4 0.001	14.9 0.026	7.9 0.881		
P119	ECUADOR 28.9 0.000	24.5 0.000	91.2 0.000	5.2 0.106	30.4 0.000	1.2 0.811	5.7 0.083		
P120	ECUADOR 25.3 0.000	21.8 0.000	87.3 0.000	3.3 0.153	24.4 0.000	1.0 0.470	1.5 0.378		
P121	MADEIRA 82.5 0.000	58.9 0.000	157.8 0.000	45.5 0.016	37.6 0.801	46.8 0.008	40.7 0.175		
P122	ECUADOR 35.1 0.000	30.1 0.000	90.5 0.000	12.6 0.075	13.3 0.053	8.2 0.670	10.6 0.202		
P123	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P125	58.2 0.000	49.2 0.000	69.0 0.000	27.3 0.221	47.5 0.000	37.8 0.001	24.8 0.778		
P126	34.2 0.000	31.5 0.000	74.3 0.000	11.7 0.235	17.5 0.013	10.9 0.350	10.6 0.402		
P127	MADEIRA 57.4 0.000	78.1 0.000	54.8 0.000	54.1 0.000	34.4 1.000	52.6 0.000	52.5 0.000		
P128	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P129	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P130	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P131	ECUADOR 28.9 0.000	24.5 0.000	91.2 0.000	5.2 0.106	30.4 0.000	1.2 0.811	5.7 0.083		
P132	51.6 0.000	53.4 0.000	56.6 0.000	30.4 0.286	55.0 0.000	34.7 0.034	28.7 0.680		
P133	ECUADOR 59.6 0.000	48.0 0.000	155.9 0.000	32.7 0.090	38.1 0.006	28.6 0.693	31.0 0.211		
P135	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P136	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P137	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		
P138	35.7 0.000	23.2 0.000	86.1 0.000	4.3 0.250	38.9 0.000	6.9 0.068	2.3 0.683		