Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación

Agronomia, Bioteknologia eta Elikadura Saila

Determinación de las causas de la baja productividad de las plantaciones de manzano de Gipuzkoa

INFORME final de Actividades en I+D

Sara Crespo Martínez

Ohiane Oneka Mugica

Mª Jesús Laquidain Imirizaldu

Jorge Urrestarazu Vidart

L. Gonzaga Santesteban García

Carlos Miranda Jiménez

'Determinación de las causas de la baja productividad de las plantaciones de manzano de Gipuzkoa' 3
Informe final de resultados 3
1 - Introducción 3
2 – Variedades empleadas 4
3- Determinación del grado de compatibilidad genética de las variedades 6
3.1 – Metodología 6
3.2 – Resultados 8
4 – Caracterización de las flores y los corimbos 11
4.1 – Número típico de flores por yema de flor 11
4.2 – Morfología de la flor 12
5 – Determinación de la viabilidad del polen 14
5.1 – Metodología 14
5.2 – Resultados 15
6 – Determinación de la capacidad de germinación 17
6.1 – Metodología 17
7 – Determinación del nivel de autofertilidad 20
7.1 – Metodología 20
7.2 – Resultados 23
8 - Conclusiones 27
9 – Implicaciones del estudio y perspectivas futuras 29

'Determinación de las causas de la baja productividad de las plantaciones de manzano de Gipuzkoa'

Informe final de resultados

1 - Introducción

El rendimiento final de una parcela frutal es la consecuencia de su capacidad de producción y las circunstancias climáticas y de cultivo a las que se someta. En el caso del manzano, uno de los factores clave dentro del proceso de floración-cuajado, es la presencia de polinizadores compatibles genéticamente, que florezcan en la misma época, y que estén en cantidad suficiente. De esta forma, en el periodo en que las flores son receptivas, habrá una cantidad alta de polen compatible capaz de fecundarlas y el cuajado podrá ser el suficiente para alcanzar los objetivos productivos.

A pesar de que estos aspectos son claves en la producción frutal, la mayoría de ellos son completamente desconocidos en el caso de las variedades locales y tradicionales empleadas en Gipuzkoa para la elaboración de sidra y, por tanto, pueden ser una de las causas que, en la práctica, explican la baja productividad media de estas plantaciones de manzano de sidra. Así pues, el objetivo de este trabajo ha sido determinar cuáles son las causas que explican la baja productividad media de las plantaciones de manzano de sidra en Gipuzkoa. Para ello, mediante diferentes técnicas, se ha determinado el grado de autofertilidad y de compatibilidad entre las variedades más cultivadas. Los trabajos experimentales realizados durante los años 2021 y 2022 han sido los siguientes:

1) Determinación de la compatibilidad genética entre las variedades, por medio de la determinación de sus alelos de incompatibilidad (S-alelos)
2) Caracterización morfológica de flores y corimbos
3) Evaluación de la viabilidad del polen
4) Evaluación de la capacidad de germinación del polen
5) Evaluación de la auto-compatibilidad (en laboratorio y en campo)

Así, las actividades experimentales se pueden clasificar en tres disciplinas: la genética (S-alelos), la morfológica (caracterización de flores y corimbos) y la fisiológica (autocompatibilidad y viabilidad del polen).

A continuación, se resume la metodología empleada y los resultados más relevantes encontrados para cada uno de los trabajos realizados.

2 – Variedades empleadas

Dado el alto número de variedades autorizadas para la elaboración de la sidra en la D.O., se planteó en este estudio centrarse en las variedades más representativas y recomendadas para la elaboración de sidra por parte de la Diputación Foral de Gipuzkoa y la Asociación de Sidrerías de Gipuzkoa, de diferentes épocas de floración, y complementarlo con algunas variedades importantes en la región, tanto de mesa como de sidra, o que fueran potenciales polinizadores de Errezila. La selección final de variedades se realizó en colaboración con Aitor Etxeandia, de Sagarlan, y consta de 25 variedades tradicionales de importancia en la región, que se indican en la **Tabla 1,** número superior al mínimo previsto de 21. A estas variedades tradicionales se añadieron otras ocho variedades de referencia, de mesa, para las que el perfil de alelos de incompatiblidad era conocido, y que sirvieron como muestras de verificación, tanto en la determinación de los S-alelos, como en los análisis de calidad y viabilidad del polen. Las variedades de referencia utilizadas son: Golden delicious, Starking delicious, Top red, Red chief, Gala, Granny Smith, Jonagold (triploide) y Fuji.

Tabla 1. Variedades de manzana seleccionadas para el estudio

Variedades recomendadas (15)	Otras variedades relevantes (10)	Variedades control (8)
Errezila	Bost kantoi	Golden delicious
Frantzes mikatza	Ibarra	Starking
Gezamina	Limoi	Top Red
Goikoetxe	Mikatza	Red Chief
Haritza	Mokote	Gala
Manttoni	Reina de reinetas	Granny Smith
Moko	Reineta encarnada	Jonagold
Mozolua	Saltxipi	Fuji
Patzolua	Txori sagarra	
Txalaka	Urtebete	
Udare marroi		
Urdin		
Urtebi haundi		
Urtebi txiki		
Verde agria		

En la **Tabla 2** se indica los trabajos que se han realizado en cada una de las variedades incluidas en el estudio.

Tabla 2. Estudios realizados en cada variedad incluida en el estudio. Se indica también el grado de ploidía de las variedades. En negrita se indican las variedades prioritarias del estudio.

Variedades	Ploidía	S-alelos	Morfología	Viabilidad del polen	Autopolinización	
					laboratorio	campo
Variedades DO Sidra de Gipuzkoa						
Haritza	diploide	x	x	x	x	
Errezila	diploide	x	x	x	x	x
Gezamina	triploide	x	x	x	x	x
Goikoetxe	diploide	x	x	x	x	x
Manttoni	diploide	x	x	x	x	x
Moko	diploide	x	x	x	x	x
Mozolua	triploide	x	x	x	x	x
Patzolua	triploide	x	x	x	x	x
Txalaka	diploide	x	x	x	x	x
Udaremarroi	triploide	x	x	x	x	
Urdin	diploide	x	x	x	x	x
Urtebi haundi	triploide	x	x	x	x	x
Urtebi txiki	diploide	x	x	x	x	x
Frantzes mikatza	diploide	x				
Otras variedades						
Verde agria	diploide	x	x	x	x	x
Bost Kantoi	diploide	x	x	x	x	
Ibarra		x				
Mikatza	diploide	x	x	x	x	
Txori sagarra	diploide	x	x	x	x	
Limoi	diploide	x				
Mokote	diploide	x	x	x	x	
Urtebete	diploide	x	x	x	x	
Saltxipi	diploide	x	x	x	x	x
Reineta encarnada	diploide	x	x	x	x	
Variedades de referencia						
Golden delicious	diploide	x	x	x	x	
Starking delicious	diploide	x	x	x		
Top red	diploide	x	x	x		
Red chief	diploide	x	x	x		
Galaxy	diploide	x	x	x		
Granny Smith	diploide	x	x	x		
Jonagold	triploide	x	x	x		
Fuji	diploide	x	x	x		

3- Determinación del grado de compatibilidad genética de las variedades

3.1 – Metodología

En primer lugar se realizó un exhaustivo estudio bibliográfico del estado de la cuestión y **se modernizó el protocolo** para la identificación de los alelos de incompatibilidad (S-alelos) en base a varias publicaciones recientes (De Franceschi et al., 2016, 2018; Sheick et al., 2018), para lo que además se contó con la colaboración de investigadores de la Università di Bologna, cuyos trabajos son referencia mundial. El protocolo aplicado en el estudio incluye la **amplificación de todos los S-alelos** mediante un único par de cebadores (lo que se denomina *cebadores degenerados*) para su posterior **secuenciación**. La principal diferencia, y mejora respecto al método propuesto originalmente, es que mediante la secuenciación se asegura que **todas las variantes de S-alelos pueden ser identificadas**. Si el S-alelo ya está descrito, al comparar la secuencia obtenida con las bases de datos internacionales, se obtiene una equivalencia. Si no lo está, se trata de un alelo nuevo, que no se ha descrito previamente. Dado que se ha trabajado con material tradicional local, era previsible encontrar alelos aún no descritos, ya que los trabajos a nivel internacional se han hecho hasta el momento fundamentalmente en manzano moderno de mesa.

Dentro de esta actividad, y una vez seleccionado el material vegetal tal como se indica en el apartado anterior, se han realizado las siguientes acciones, que se resumen también en la Figura 1, indicando entre paréntesis el paso correspondiente en la **Figura 1**:

- Se extrajeron los ADNs de las muestras de hoja o madera (Pasos 2,3).
- Se realizó la amplificación de los S-alelos mediante PCR utilizando unos cebadores degenerados (PycomC1f y PycomC5r) (Pasos 4, 5).
- Los S-alelos o fragmentos de ADN amplificados, que son de carga negativa, se separaron a través de carga eléctrica dependiendo de la longitud del fragmento (Pasos 6, 7, **Figura 2**).
- Esos fragmentos se cortaron, purificaron y enviaron a secuenciar (Pasos 8, 9, 10).

En un paso posterior, cuando se dispuso de la secuenciación de cada variedad analizada, se buscaron equivalencias las secuencias en la base de datos genómica internacional NCBI, lo que permitía identificar los alelos encontrados que ya estuvieran descritos. En ese caso, se realizó una confirmación adicional mediante la utilización de cebadores específicos de cada S-alelo (**Figura 3**). En los casos que no apareciera equivalencia en la base NCBI se trataba de un alelo nuevo, que hasta el momento no se había descrito en manzana.

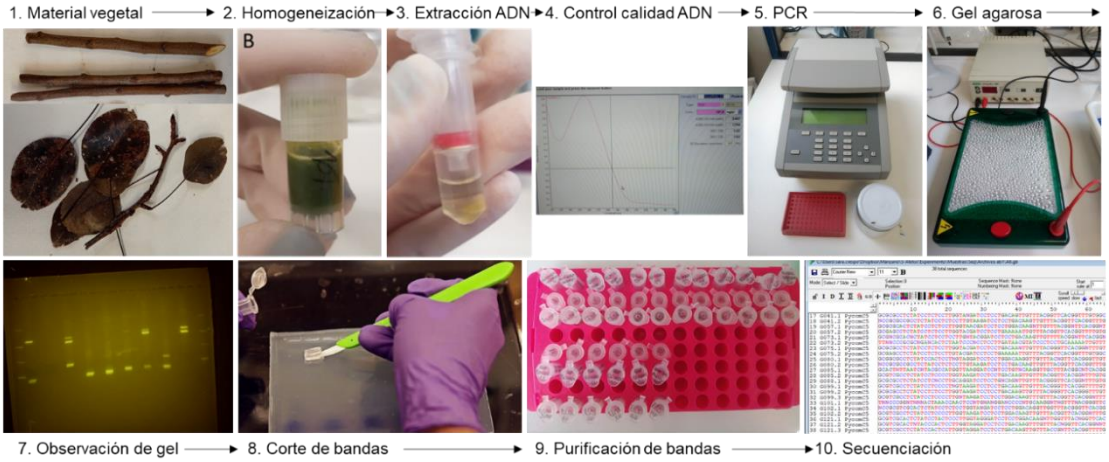


Figura 1: Proceso seguido en el laboratorio para la determinación de S-alelos

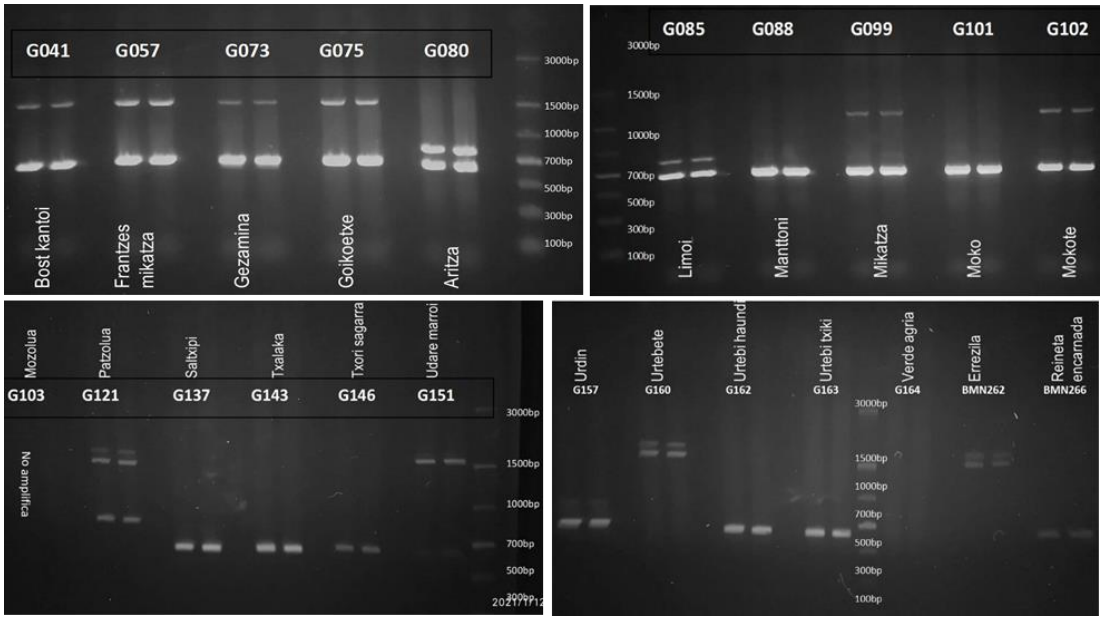


Figura 2. Fragmentos de S-alelo de las diferentes variedades amplificados con los primers degenerados Pycom y corridos en electroforesis en geles de agarosa 1%.

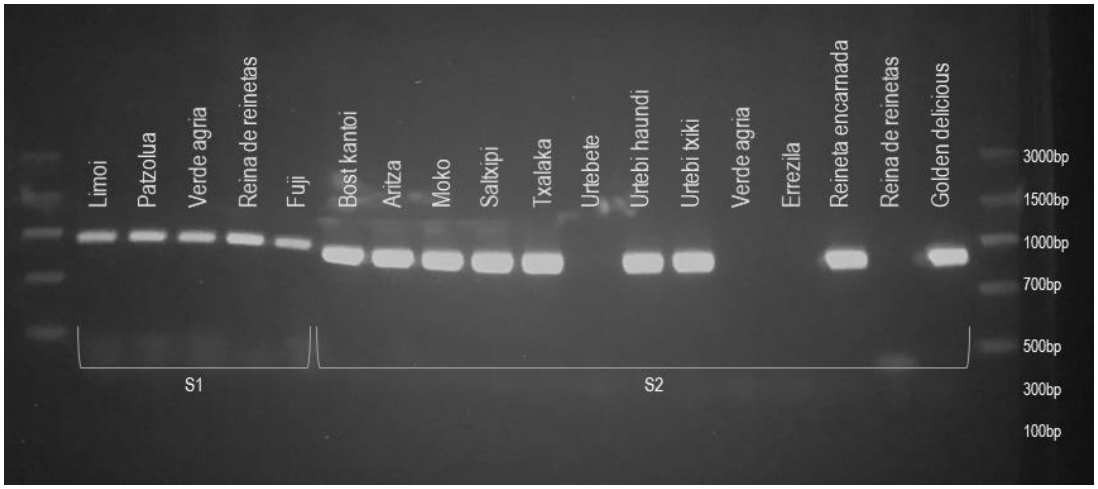


Figura 3. Gel con primers específicos de los alelos S1 y S2. Se utilizaron controles positivos de variedades comerciales (Fuji para S1 y Golden delicious para S2).

3.2 – Resultados

En total se han descrito 18 genotipos diferentes (**Tabla 3**), de los cuales 13 se han identificado entre las variedades diploides, y los cinco restantes en las triploides. Trece del total de ellos son genotipos únicos, es decir, que solo una de las variedades estudiadas tiene ese genotipo. Los otros cinco genotipos están representados por 2 o 3 variedades lo que significa que esas variedades son incompatibles entre sí.

Tabla 2: Lista de genotipos y variedades clasificadas en cada genotipo.

Variedades diploides

Grupo de incompatibilidad		Variedades		
1	S1 S3	Reina de reinetas		
2	S1 S26	Limoi		
3	S1 S*	Verde agria		
4	S2 S5	Bost kantoi	Urtebi txiki	
5	S2 S20	Haritza		
6	S2 S23	Saltxipi		
7	S2 S26	Reineta encarnada	Moko	Txalaka
8	S3 S5	Urtebete	Errezila	
9	S3 S26	Mikatza	Mokote	Ibarra
10	S3 S28	Txori sagarra		
11	S5 S28	Frantzes mikatza	Goikoetxe	
12	S23 S26	Manttoni		
13	S24 S26	Urdin		

Variedades triploides

Grupo de incompatibilidad		Variedades
1	*S1 S3 S5*	*Patzolua*
2	*S2 S3 S?*	*Urtebi haundi*
3	*S3 S5 S11*	*Udare marroi*
4	*S5 S7 S28*	*Gezamina*
5	*S7 S28 S?*	*Mozolua*

Sobre los alelos encontrados, hay que destacar que en las diploides han podido ser identificados en todos los casos menos en uno, al que denominamos S* y que se ha visto en la variedad Verde Agria. En las triploides, no se ha podido secuenciar bien uno de los alelos de Urtebi haundi. Además, se ha encontrado una alta frecuencia de aparición de alelos como S26 y S28, que en la bibliografía están descritos como muy infrecuentes, ya que apenas se encuentran en las decenas de variedades de mesa modernas que se han estudiado a nivel internacional hasta el momento. Estos resultados son de gran interés por dos motivos fundamentales:

- **Remarcan la singularidad de estas variedades** tradicionales ya que constituyen un indicio de que estas variedades tienen una diferencia genética apreciable respecto de las variedades de mesa moderna, así como del manzano tradicional de otras regiones de Europa. Estudios previos realizados por nuestro equipo en colaboración con otros centros europeos y estatales ya habían mostrado que existe una "población española" de manzanos tradicionales, diferenciada de la de otras partes de Europa. Algunas de las variedades estudiadas aquí estaban incluidas en aquellos estudios.
- **Los estudios de S-alelos se han realizado mayoritariamente en variedades modernas y de mesa, por lo que su rareza o abundancia** está hasta ahora descrita sólo en este tipo de variedades, **y no tiene por qué coincidir** para otro tipo de variedades. Por ejemplo, desde hace tiempo, una de las alternativas interesantes para la polinización del manzano es la plantación de selecciones de ***Malus*** *floribunda* u otros manzanos silvestres, porque proporcionan polen de muy alta calidad y completamente compatible con las variedades mayoritarias de mesa. La compatibilidad generalizada con las variedades de mesa se debe en buena medida a que los S-alelos de estos manzanos silvestres son distintos a los que se encuentran en la mayoría de las de mesa. De todas las selecciones comercializadas, en este momento **solo se conoce el genotipo de *Malus Evereste*®, que es S20 S26**. **Los dos alelos que porta son extremadamente raros en manzano de mesa, pero no en el manzano tradicional estudiado**: en las variedades de este estudio se ha encontrado una variedad (Haritza) con el S20, y nueve (Limoi, Moko, Txalaka, Reineta Encarnada, Manttoni, Urdin, Mikatza, Mokote e Ibarra) que portan el S26. Esto hace que *Evereste* sea una variedad parcialmente compatible con todas ellas, ya que solo la mitad del polen que produce es capaz de fecundarlas. Si coinciden en época de floración, *Evereste* sería un polinizador adecuado, pero no excelente como lo es para las variedades de mesa modernas. La situación podría ser similar **para los otros manzanos silvestres** comercializados como polinizadores, pero en ellos **se desconoce su genotipo**, y hacerlo sería un requisito indispensable a la hora de considerarlos o recomendarlos como potenciales polinizadores de las variedades de sidra en la D.O.

A la hora de analizar los resultados, se pueden establecer tres tipos de combinaciones de variedades, según el número de S-alelos que compartan las variedades:

- **Combinaciones incompatibles:** cuando las dos variedades tienen los mismos S-alelos. Por ejemplo, serían incompatibles las variedades Bost Kantoi y Urtebi Txiki, ya que las dos son S2 S5.
- **Combinaciones parcialmente compatibles:** cuando las dos variedades tienen un S-alelo común, difiriendo en el otro u otros (si es triploide). Así, por ejemplo, serían parcialmente compatibles Bost Kantoi (S2 S5) y Haritza (S2 S20). En el caso de una combinación de diploide y triploide, Patzolua (S1 S3 S5) sería parcialmente

compatible con Reina de Reinetas (S1 S3), ya que el polen S5 que produzca la primera sería capaz de fecundar a la segunda. Sin embargo, Reina de Reinetas es incompatible con Patzolua, ya que ningún polen que produzca sería capaz de fecundarla.

- **Combinaciones totalmente compatibles:** cuando las variedades no comparten ninguno de los S-alelos. Sería la combinación ideal, ya que todo el polen serviría. Por ejemplo, Bost Kantoi (S2 S5) con Limoi (S1 S26)

En la **Tabla 3** se presenta el genotipo de S-alelos de las variedades de sidra analizadas, junto al de las variedades de mesa, de forma que sea sencillo comprobar las situaciones de compatibilidad total, parcial o incompatibilidad entre variedades descritas anteriormente. Además, se han confeccionado fichas de polinización en las que se indica, para cada variedad, con qué otras variedades su polen es compatible, parcialmente compatible o incompatible, que se adjuntan en el **Anexo 1**. En la **Figura 4** se muestra un ejemplo de ficha para la variedad Bost Kantoi.

Tabla 3. Grupos de incompatibilidad encontrados entre las variedades de sidra y de mesa (en rojo) estudiadas.

Grupo	Variedad	Ploidia	Alelos	S1	S2	S3	S5	S7	S9	S11	S20	S23	S24	S26	S28	S*
1	Verde agria	2n	S1 S*	■												■
2	*Reina de reinetas*	2n	S1 S3	■		■										
3	Patzolua (3n)	3n	S1 S3 S5	■		■	■									
4	Fuji	2n	S1 S9	■					■							
5	Limoi	2n	S1 S26	■										■		
6	*Golden delicious*	2n	S2 S3		■	■										
	Urtebi haundi (3n)	3n	S2 S3		■	■										
7	*Jonagold (3n)*	3n	S2 S3 S9		■	■			■							
8	Bost kantoi	2n	S2 S5		■		■									
	Urtebi txiki	2n	S2 S5		■		■									
	Galaxy	2n	S2 S5		■		■									
9	Haritza	2n	S2 S20		■						■					
10	Saltxipi	2n	S2 S23		■							■				
11	Moko	2n	S2 S26		■									■		
	Txalaka	2n	S2 S26		■									■		
	Reineta encarnada	2n	S2 S26		■									■		
12	Errezila	2n	S3 S5			■	■									
	Urtebete	2n	S3 S5			■	■									
13	Udare marroi (3n)	3n	S3 S5 S11			■	■			■						
14	*Granny smith*	2n	S3 S23			■						■				
15	Mikatza	2n	S3 S26			■								■		
	Mokote	2n	S3 S26			■								■		
	Ibarra	2n	S3 S26			■								■		
16	Txori sagarra	2n	S3 S28			■									■	
17	Goikoetxe	2n	S5 S28				■								■	
	Frantzes	2n	S5 S28				■								■	
18	Gezamina (3n)	3n	S5 S7 S28				■	■							■	
19	Mozolua (3n)	3n	S7 S28 *S?*					■							■	
20	*Top red, R Chief, Starking*	2n	S9 S28						■						■	
21	*Malus Evereste ®*	2n	S20 S26								■			■		
22	Manttoni	2n	S23 S26									■		■		
23	Urdin	2n	S24 S26										■	■		

Figura 4. Ejemplo de ficha de polinización para la variedad Bost Kantoi, en la que se indica con qué variedades el polen que produce es compatible y con cuáles no.

Bost kantoi					
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**		S2 S5	
Autocompatible	No	**Calidad del polen**		Buena	
Compatibilidad del polen					
Totalmente compatible con					
Verde agria	*Reina de reinetas*	Fuji	Limoi	Manttoni	Urdin
Granny smith	Mikatza	Mokote	Ibarra	Txori sagarra	Mozolua (3n)
Parcialmente compatible con					
Golden delicious	Urtebi haundi (3n)	*Jonagold (3n)*	Haritza	Saltxipi	Moko
Txalaka	Reineta encarnada	Patzolua (3n)	Errezila	Urtebete	Udare marroi (3n)
Goikoetxe	Frantzes mikatza	Gezamina (3n)			
Incompatible con					
Urtebi txiki	*Galaxy*				

4 – Caracterización de las flores y los corimbos

4.1 – Número típico de flores por yema de flor

La cantidad de flores que lleva una yema de flor de manzano es una característica varietal que puede verse influida por factores nutritivos y culturales. La diferenciación de flores en la yema se realiza durante la campaña anterior a la floración, y depende mucho de la nutrición. Así, si el árbol tiene una gran cantidad de frutos y/o hay escasez de agua o nutrientes, la diferenciación será peor y las yemas tenderán a llevar menos flores que, a su vez, serán peores (menos capacidad de dar fruto). Por tanto, conocer el número típico de flores presentes en las yemas de una variedad es un indicador de gran utilidad a la hora de determinar la calidad de flor. En este estudio esta determinación se pudo llevar a cabo en la primavera de 2021, y los resultados son una base que, con más repeticiones, permitirían obtener los valores “típicos” de cada variedad.

Para estimar el número de flores por corimbo se contó el número de flores de 20 yemas por variedad que fueron elegidos al azar, y los resultados se presentan en la **Figura 5**. El número de flores por corimbo varió entre 6,57 flores/corimbo de Urdin como valor medio superior y las 5 flores por corimbo de Txalaka como valor medio inferior. Se observó que hay variedades mucho más floríferas que otras, aunque sólo existieron diferencias significativas entre la variedad Urdin (6,57 flores/corimbo) con respecto a Txalaka (5,00), Urtebi txiki (5,1) y Patzolua (5,14).

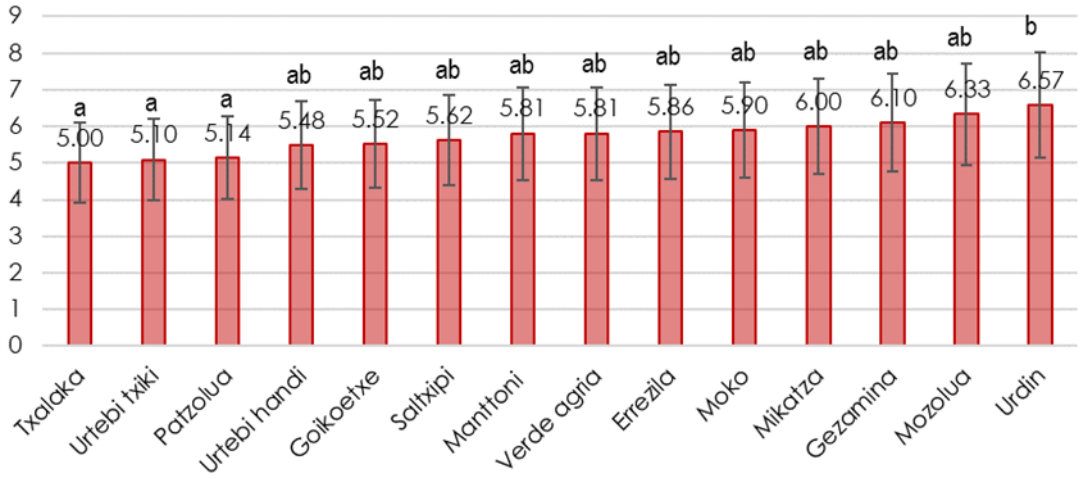


Figura 5. Número medio de flores por yema en las variedades estudiadas.

4.2 – Morfología de la flor

La morfología de la flor se analizó desde tres aspectos. El primero fue la **descripción de los corimbos** en el estado fenológico E-E2 (botón rosa o balón), ya que es una característica que permite diferenciar variedades. Para ello se tomaron **fotografías** de todas las variedades que se recogen en **el Anexo 2**, de descripción morfológica.

También se estudió el nivel de soldadura de los estilos entre sí, que se corresponde con el carácter U22b según el método armonizado para la caracterización pomológica del manzano (Royo y cols, 2017), por medio de fotos macro de dos flores escogidas al azar de cada variedad. Las posibilidades contempladas por la metodología para este carácter son tres, que la longitud soldada sea corta, media o larga (**Tabla 4**), aunque en las variedades estudiadas sólo se encontraron casos de los dos primeros tipos.

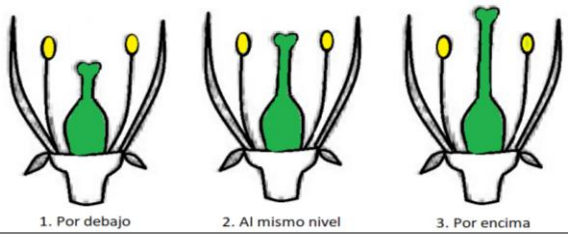
Tabla 4. Clasificación de variedades según el punto de soldadura de los estilos.

U-22b. Flor: longitud soldada de los estilos	1. Corta 2. Media 3. Larga
1	Galaxy, Goikoetxe, Golden delicious, Manttoni, Mokote, Red chief, Starking delicious, Txori sagarra, Udare marroi, Verde agria
2	Bost Kantoi, Errezila, Fuji, Gezamina, Granny smith, Haritza, Jonagold, Mikatza, Moko, Mozolua, Patzolua, Saltxipi, Top red, Txalaka, Urdin, Urtebete, Urtebi Haundi, Urtebi txiki

Desde el punto de vista de la autofecundación, resulta de gran interés la caracterización de la posición relativa de los estambres en relación con las anteras (carácter U-22). El manzano ha desarrollado varios mecanismos para asegurar que el polen que llega a los estilos de sus flores procede de otra variedad distinta, y uno de ellos es una diferenciación morfológica de sus flores por la que los estigmas estén por encima de las anteras que portan el polen. De esta manera el polen propio no puede llegar de forma directa dentro de la propia flor, lo que podría suceder si estuvieran las anteras por encima de los estigmas.

En la **Tabla 5** se muestran los resultados del estudio respecto a la posición relativa de los estigmas. La gran mayoría de variedades tienen los estigmas por encima o al nivel de los estambres, lo que establece una primera barrera física contra la autofecundación. Tan solo Mikatza y Txori Sagarra tenían los estilos por debajo de las anteras, lo que podría facilitar que el polen de la propia flor cayese en los estigmas por gravedad. Sin embargo, este resultado no garantiza que la variedad sea autocompatible.

Tabla 5. Clasificación de las variedades por la posición relativa de los estigmas en relación con las anteras

U-22. Flor: posición de los estigmas en relación con las anteras	
1	Fuji, Mikatza, Txori sagarra
2	Manttoni, Red chief, Udare marroi, Urtebete
2-3	Errezila, Gezamina. Txalaka
3	Bost Kantoi, Galaxy, Goikoetxe, Golden delicious, Granny smith, Haritza, Jonagold, Moko, Mokote, Mozolua, Patzolua, Saltxipi, Starking delicious, Top red, Urdin, Urtebi Haundi, Urtebi txiki, Verde agria

5 – Determinación de la viabilidad del polen

5.1 – Metodología

Para obtener el polen necesario para llevar a cabo las siguientes actividades, se recolectaron 100 flores en el estado E2 (yemas hinchadas, pero sin llegar a abrirse). Para su secado, se depositaron en cajas, en las cuales previamente se habían dispuesto esferas de silica-gel, y sobre un papel de filtro. Las cajas se sellaron herméticamente y se metieron en bolsas de plástico para optimizar el proceso de secado. Al cabo de aproximadamente 48h, se extrajo el polen de estas con ayuda de punzones y pinzas. El polen se guardó en botes de cristal y se conservó a -80ºC hasta su posterior uso para determinar tasa de viabilidad y tasa de germinación y para realizar las autopolinizaciones.

La viabilidad del polen se determinó con el proceso que se ilustra en la **Figura 6**. Se dispone sobre una placa de microscopía y se tiñe con una tinción que reacciona con los granos si éstos son viables: el polen viable cambia de color, mientras que el no viable se queda traslúcido. La observación se hace en un microscopio al que se conecta una cámara digital para mayor facilidad de observación. Para determinar la tasa de viabilidad del polen se utilizaron dos medios de tinción distintos: cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) y bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

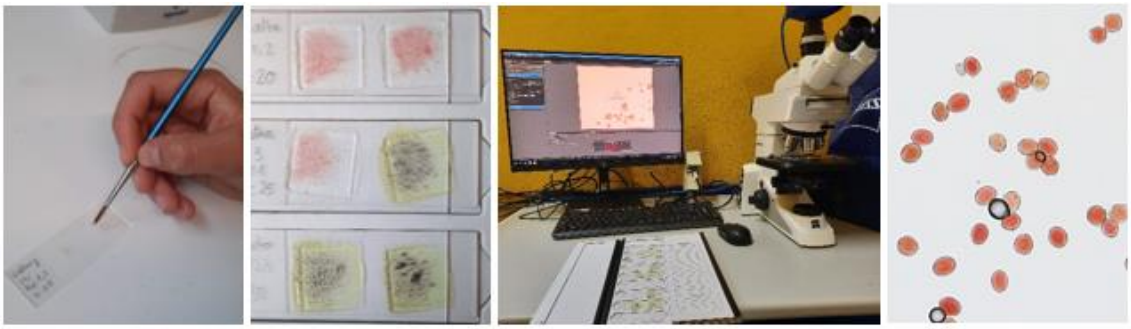


Figura 6. Proceso de tinción del polen: esparcido, tinción y observación al microscopio

Los granos de polen con un nivel intenso de tinción, tal como se muestra en la **Figura 7** para las dos tinciones empleadas, se consideran completamente viables (o “vivos”), mientras que los poco o nada teñidos se consideran poco viables o inviables, respectivamente. Para determinar

la tasa de viabilidad se contó un mínimo de 100 granos de polen por cada variedad, y se corresponde con el cociente entre granos de polen viables y el total de granos observados.

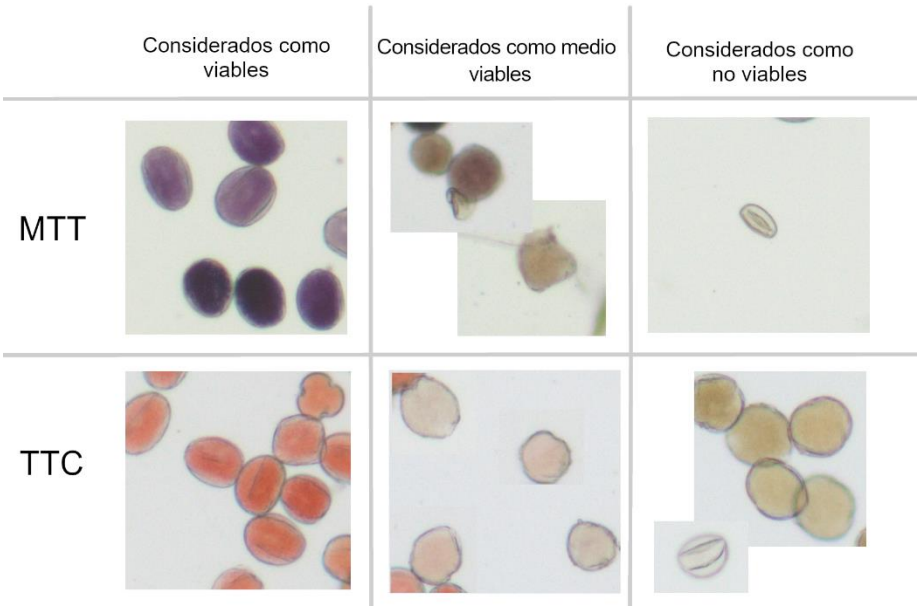


Figura 7. Ejemplos de tipos de polen encontrados tras 2h desde la tinción y clasificación de los mismos.

5.2 – Resultados

La tinción MTT resultó muy problemática, ya que en la mayoría de las variedades era muy difícil discernir entre granos muy o poco teñidos. De esta forma, era complicado diferenciar entre polen viable y escasamente viable, y los resultados obtenidos son excesivamente optimistas a la hora de clasificar la calidad. Un indicador de la escasa fiabilidad de la tinción es que la tasa de viabilidad era muy alta (>80%) incluso en las variedades triploides de referencia, en las que se sabe que la viabilidad es baja o muy baja. Lo esperable en variedades triploides es que la viabilidad sea notablemente inferior a las diploides, porque el proceso de división celular por el que se forma el polen (meiosis), está sujeto a muchos más fallos que en las diploides. La tinción MTT mostraba que la mayoría de las variedades tenían una tasa superior al 70% (que es un valor muy alto de viabilidad), y solo mostró una viabilidad inferior Urtebete, con un 55%, que es un nivel que puede considerarse moderado. Así pues, se descartó la tinción MTT por poco fiable en este material, y se pasa a analizar los resultados obtenidos con la tinción TTC, en la que los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito para las variedades de referencia, ya fueran diploides o triploides.

En la **Figura 8** se muestran los resultados de viabilidad del polen según la tinción TTC, y se observa que ésta va desde el 96% de Granny Smith y Starking hasta el 2% de Gezamina. Las variedades de referencia incluidas en el estudio mostraron viabilidades en concordancia con el conocimiento que existe de ellas. Por ejemplo, Granny Smith se incluyó en el estudio porque es una variedad muy reconocida por la alta calidad de su polen, y que en muchas plantaciones de manzano de mesa se emplea como polinizador suplementario precisamente por esta característica. En este estudio obtuvo la mayor tasa de viabilidad, un 96%. Un ejemplo de lo

contrario sería Jonagold, triploide, que se incluyó como referencia del nivel normal esperable en este tipo de variedades, y que en nuestros análisis tuvo una viabilidad del 10%.

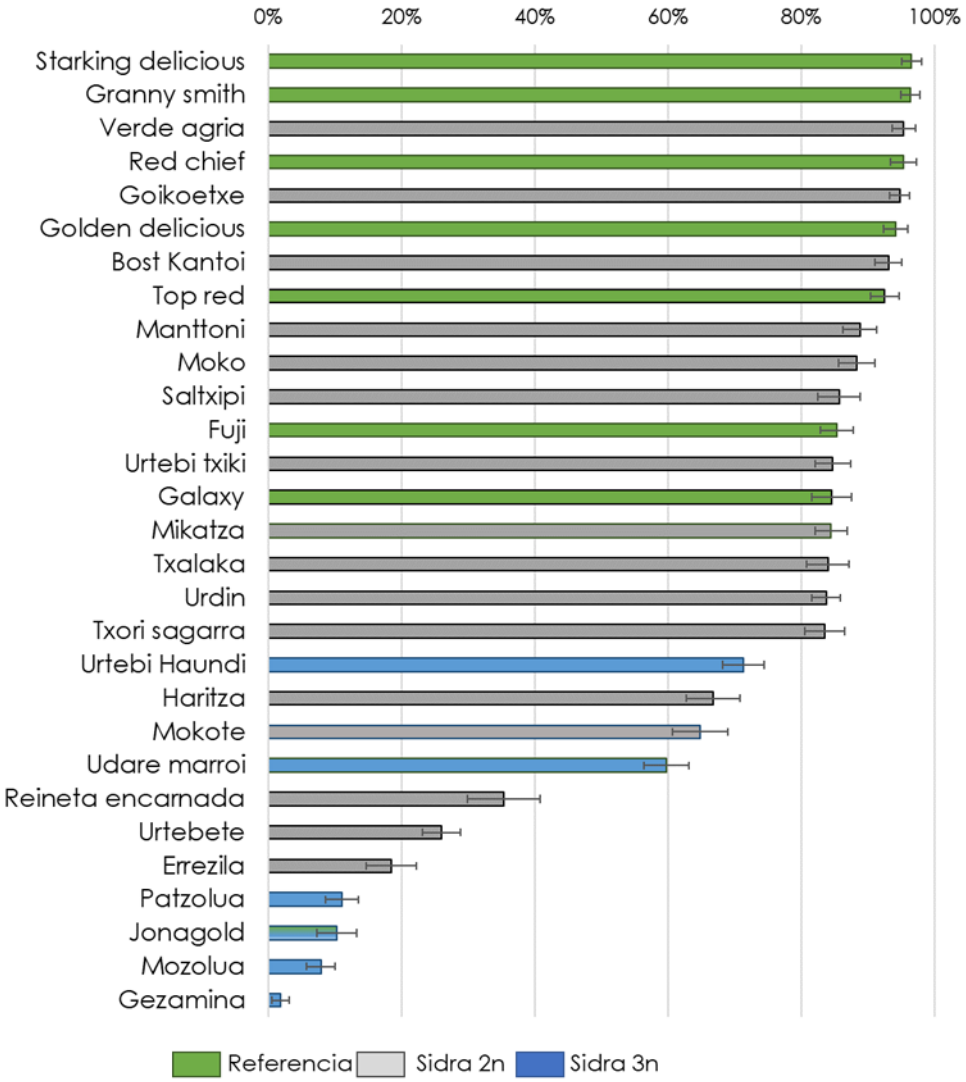


Figura 8. Viabilidad del polen (% de granos viables) según la tinción TTC.

Como se observa en la Figura 8, **las variedades de sidra de tipo diploide tuvieron en su mayoría tasas de fertilidad comparables a las de las variedades de referencia y que, además, pueden clasificarse como buenas o muy buenas**, ya que en casi todos los casos superaban el 70%. Haritza y Mokote mostraron una viabilidad algo más baja, pero en cualquier caso se puede considerar también buena al superar el 60%. Sin embargo, hay que destacar el **mal comportamiento** que mostraron Reineta encarnada (35%) y, especialmente **Urtebete (26%) y Errezila (18%), cuyas viabilidades eran bajas y similares a las de las triploides**. En el caso de las variedades triploides, la viabilidad fue baja en Patzolua, Mozolua y Gezamina. Este resultado se esperaba, pero, por el contrario, sorprende la viabilidad de Urtebi Haundi y Udare Maroi, superior al 60%, resultaba comparable a la de variedades diploides con viabilidad moderada.

6 – Determinación de la capacidad de germinación

6.1 – Metodología

En este apartado del estudio se evalúa que proporción del polen viable (o "vivo") de las variedades era realmente capaz de germinar y dar lugar a un tubo polínico. Para esta determinación se utilizó polen recogido y conservado con la misma metodología indicada en el apartado anterior. El proceso, que se describe gráficamente en la **Figura 9**, consiste en hidratar el polen y sembrarlo en un medio adecuado que reproduce las condiciones nutritivas de los estilos (10% sacarosa, 1% agar, 300ppm $Ca(NO_3)_2$ y 0.02% $H_3(BO)_3$ a pH 6.5). Las placas se incuban 48h a 25ºC en oscuridad (dentro de una estufa). Tras 48h, las placas de polen fueron observadas en el microscopio (objetivo x10). Se consideró como germinados aquellos granos de polen cuyo tubo polínico tuviese una longitud de al menos tres veces la del grano de polen, tal como se muestra en la **Figura 10**. El número de granos de polen observados fue alto, unos 250 granos de media, aunque en algunas como Goikoetxe, Bost Kantoi o Verde Agria se superaron los 500.

Figura 9. Proceso de germinación in vitro de polen: incubación y observación al microscopio.

Figura 10. Ejemplos tipos de polen encontrados tras 48h de germinación y clasificación de estos como germinados o no.

La tasa de germinación osciló entre el 88% de Starking Delicious y el 1,5% de Gezamina. En líneas generales, **el nivel de germinación del polen estuvo bien relacionado con el de viabilidad**, de forma que las variedades con viabilidad buena o muy buena tenían, además polen con alto poder germinativo. Como se ve en la **Figura 11**, la mayoría de las variedades de sidra tuvieron tasas superiores al 50%, comparables a las de las variedades de referencia de buena calidad. De entre las diploides, hay que destacar los resultados discretos que obtuvieron las variedades Urdin, Reineta Encarnada, Verde Agria y Urtebi Txiki, con germinabilidad alrededor del 40%, lo que implica que, como polinizadores, son algo peores que las demás. Aunque no se les puede considerar como malos, sus resultados indicarían que sería necesario que hubiera una mayor cantidad de polen suyo transportado a los estilos para conseguir resultados comparables a los de las variedades mejores.

Los resultados de germinación confirmarían a **Urtebete como una variedad no apta como polinizadora**, a pesar de ser diploide. Con una tasa de viabilidad en torno al 20% y de germinación del 2,5%, incluso en situaciones en las que hubiese una gran cantidad de polen de esta variedad, sería poco probable tener cuajados satisfactorios. En el caso de Errezila, su viabilidad era inferior (<20%) incluso a la de Urtebete, pero su nivel de germinación es moderado (55%). En conjunto, muestra que es una muy mala variedad polinizadora de otras, y que sólo en casos en que hubiese una muy grande cantidad de polen, su germinabilidad moderada podría compensar en parte y obtener cuajados moderados.

En el caso de las variedades triploides, como era esperable, las germinaciones fueron muy bajas, inferiores al 5%, con la excepción de Urtebi Haundi, en el que, aunque mala, en torno al 20% de los granos de polen lograron germinar y, junto con su alta tasa de viabilidad, se comportaría como un polinizador mediocre, lo que es mucho mejor de lo esperado en una variedad de este tipo (que no sirviera en absoluto para tal papel).

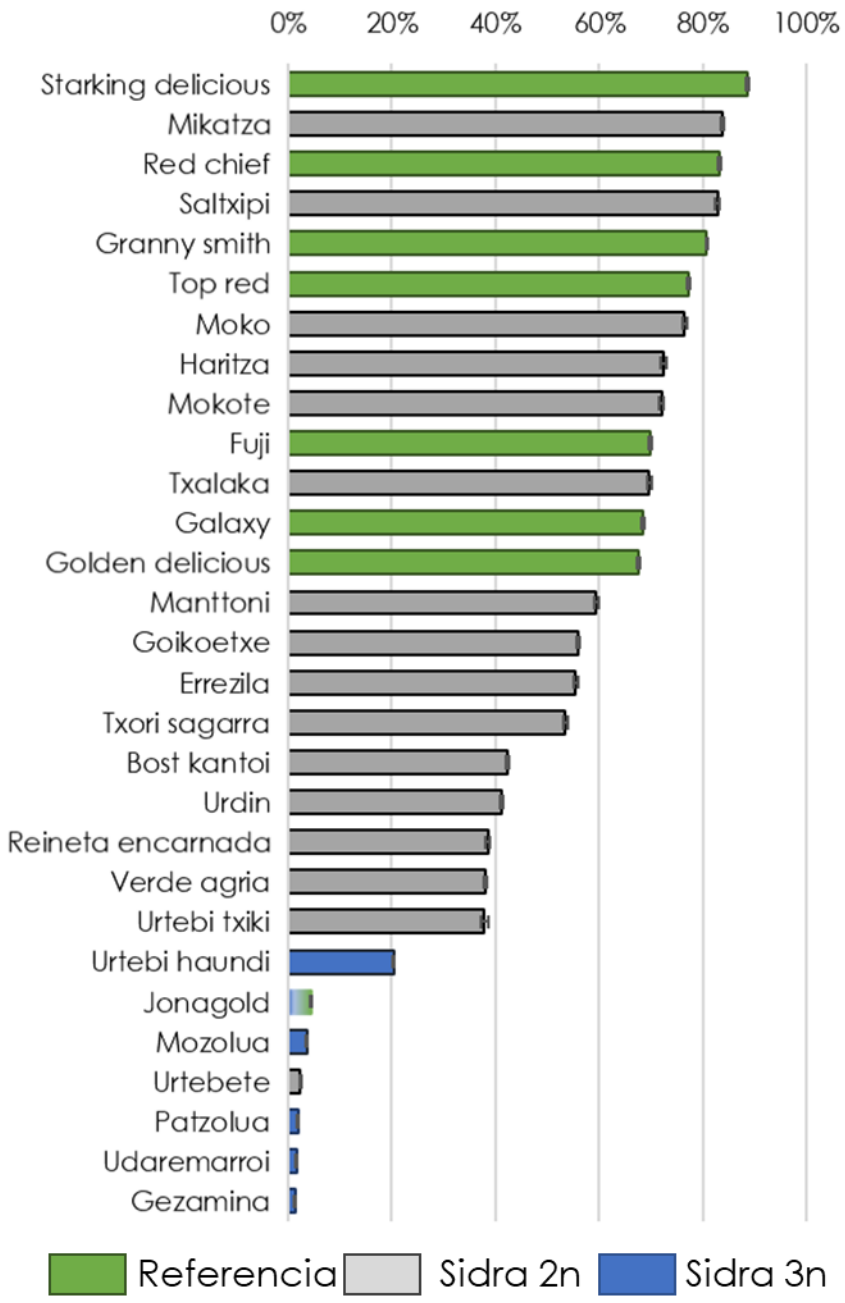


Figura 11. Tasa de germinación del polen de las variedades del estudio.

7 – Determinación del nivel de autofertilidad

7.1 – Metodología

Para realizar las autopolinizaciones en laboratorio, las flores fueron recolectadas en el estadio E2 (flores hinchadas, pero sin llegar a abrirse). En general, se utilizaron 50 flores y sólo en las variedades de las que se disponían de menos flores se tuvo que reducir este número. Las flores se dejaron 12h aprox. para que terminasen de madurar. Además de todas las variedades disponibles en Otalarrea, se recolectaron flores para autopolinizar Bost kantoi, Urtebete y Reineta encarnada del banco de germoplasma de la UPNA. Se incluyó la variedad de referencia Golden delicious como control positivo, ya que se sabe que tiene cierto grado de autocompatibilidad. Además, se realizó un cruce de Golden delicious con Fuji también como control positivo.

En primer lugar, las flores se emascularon, dejando únicamente los pistilos o gineceo. Se colocaron en una red para que se mantuvieran tiesas dentro de una bandeja con agua y se dejaron durante 24 horas para completar su maduración. Al día siguiente, se mezcló polen de la misma variedad con harina de arroz (1:1) y se autopolinizaron las flores colocando una porción de esta mezcla en los pistilos con el dedo (**Figura 12, Figura 13**). Pasadas 72h las flores emasculadas se metieron en solución FAA para fijar los tejidos. Tras 5 días en solución de fijación, las muestras se conservaron a 4º en 70% de alcohol. Durante 4h, las muestras se trataron con 8N NaOH para clarear y reblandecer los tejidos y permitir que la tinción penetrase bien. Después se tiñeron los tejidos con 0.1% solución acuosa de azul de anilina en 0.1N K3PO4 durante un mínimo de 24h y, sin lavar, se observaron bajo el microscopio junto con unas gotas de la propia tinción como medio. Suavemente se presionó el cubre para machacar los pistilos previamente ablandados con el NaOH. Los preparados se observaron a la luz ultravioleta DAPI (**Figura 14**).

Figura 12. Proceso de emasculación para la posterior autopolinización de las diferentes variedades.

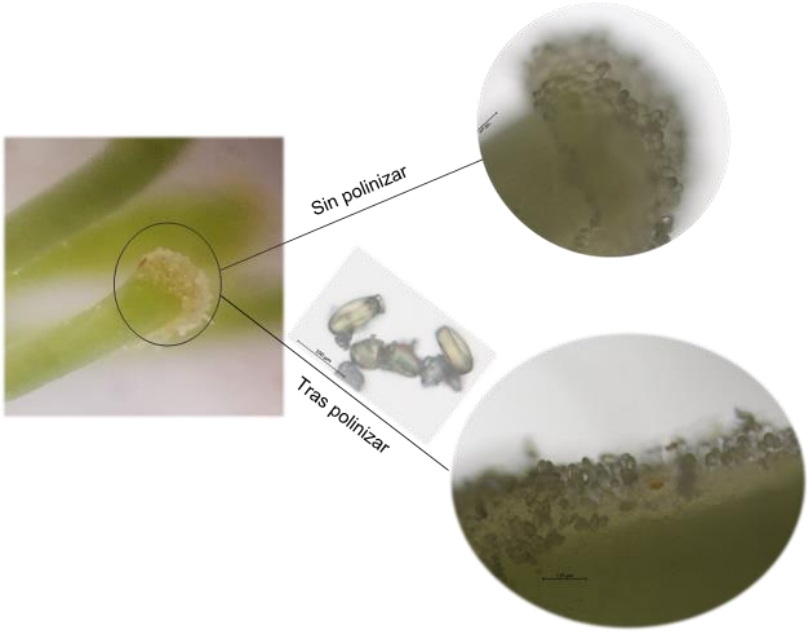


Figura 13. Polinización en laboratorio de flores emasculadas. En la parte inferior derecha se puede observar el estilo con granos de polen tras la polinización artificial.

En la **Figura 14** puede observarse el aspecto de los estigmas con polen germinado según éste sea compatible o no. En la Figura 14a se puede ver el estigma bajo luz visible, rodeado de granos de polen (azul pálido), en los que algunos ya han desarrollado el tubo polínico, que se puede apreciar como filamentos azul pálido. Es un estilo de Urdin autopolinizado y, bajo luz ultravioleta (Figura 14b), en el mismo estilo quedan resaltados en azul fluorescente tanto los granos de polen como los estilos. En la figura se observa claramente cómo los tubos polínicos van en todas direcciones, y no hacia abajo, lo que es un signo de autoincompatibilidad pues, cuando esta se expresa los granos de polen o no germinan o, si lo hacen, son incapaces de orientarse. Como ejemplo de una polinización con polen compatible se muestra la Figura 14 C y D, de nuevo bajo luz visible y ultravioleta. Especialmente en el caso de la luz ultravioleta, se observa claramente que todos los tubos polínicos van en la dirección del estigma, hacia abajo.

En las **Figuras 15** y **16** se muestran ejemplos de longitud máxima alcanzada por los tubos polínicos en condiciones de autopolinización. Las **Figura 15** corresponde a Moko, y en ellos los tubos polínicos han superado la mitad del estilo, mientras que la **Figura 16** corresponde a Urdin, y los tubos no consiguieron pasar del cuarto superior del pistilo.

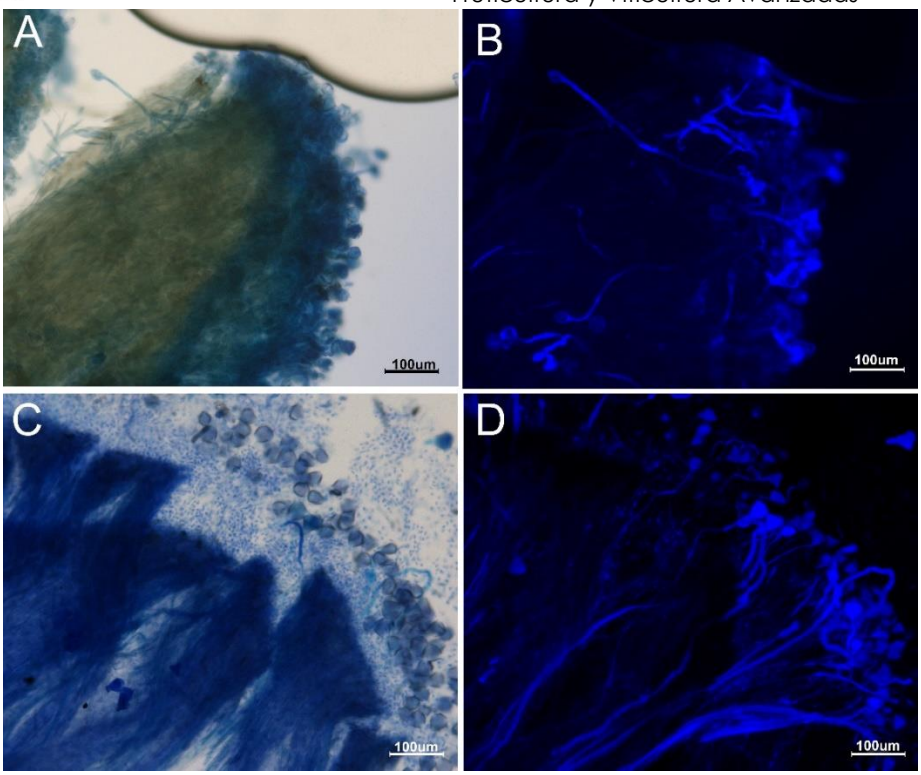


Figura 14. Estigmas con polen germinado. Variedad Urdin autopolinizada mostrando muchos granos de polen germinados bajo luz visible (A) y ultravioleta (B), donde se muestran los tejidos teñidos. Además, se muestra una flor polinizada en campo de forma natural con polen compatible (C y D).

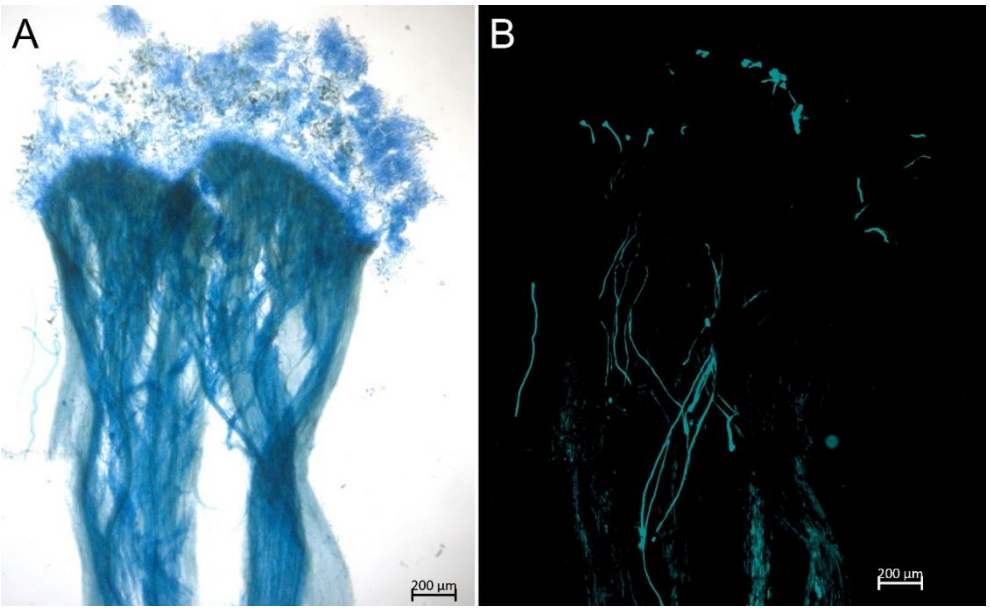


Figura 15: La longitud alcanzada por los tubos polínicos durante las 48 horas tras polinización en la variedad Moko, que en su mayoría alcanzó el 50% del pistilo.

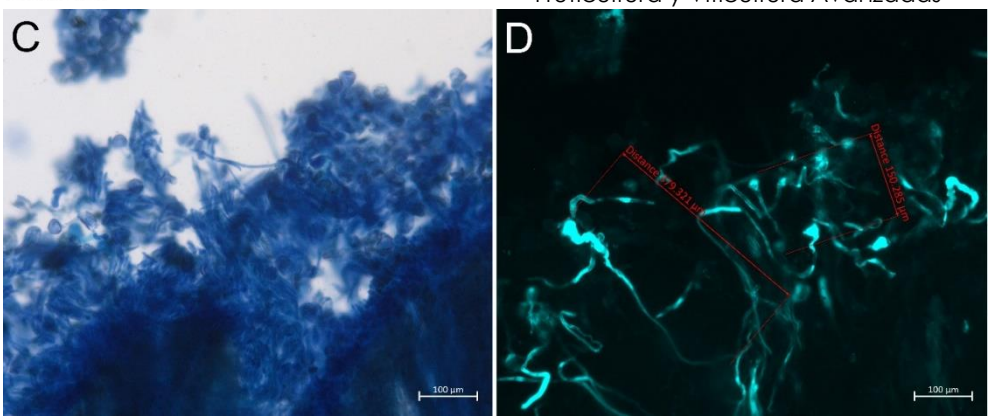


Figura 16: La longitud alcanzada por los tubos polínicos durante las 48 horas tras polinización en la variedad Urdin, que no pasó del ¼ superior.

7.2 – Resultados

En la **Tabla 6** se presentan los resultados de crecimiento de los tubos polínicos en autopolinización, indicando la proporción de estilos en los que se observaron tubos germinados, la cantidad de granos germinados, y la longitud de estigma (en %) que recorrieron como máximo. Se incluye también en la tabla los resultados sobre viabilidad del polen, ya que el resultado final será la combinación de la calidad de la variedad como polinizadora y su capacidad de autofertilidad. Así, si el polen es muy poco viable, puede ser suficiente para que la variedad sea autoestéril, independientemente de que el polen propio pudiera crecer en cierta medida en los estigmas de las flores. Por otra parte, si el polen es de buena calidad, podría darse el caso de que algunos granos fueran capaces de germinar, orientarse y llegar hasta los óvulos, y si terminaran no haciéndolo sería porque la autoincompatibilidad en el estigma es elevada. Para facilitar la comprensión de la Tabla 6, se han resaltado en verde los valores buenos o muy buenos, en verde pálido los moderados, en naranja pálido los mediocres y en rojo los malos o muy malos.

Se puede observar en la Tabla 6 que hay una **cierta relación entre la calidad del polen y la capacidad de germinación del polen propio en los estilos**. Las variedades con polen de peor calidad suelen ser las que mostraron peores proporciones de pistilos con polen germinado y cantidad de polen germinado, mientras que en las variedades con polen de alta calidad se observaron altas proporciones de pistilos en los que el polen germinaba, y además con gran cantidad de granos germinados. En general, incluso cuando la germinación era alta, los tubos polínicos no eran capaces de orientarse adecuadamente, y en la mayoría de las variedades los tubos que más crecieron apenas rebasaban la mitad del estilo a las 72 horas. Este resultado es una muestra de que la **mayoría de las variedades no presentarían ningún grado de autocompatibilidad** ya que, si en 72h ningún tubo polínico es capaz de llegar al final del estilo, es altamente improbable que, si terminan llegando a óvulo en algún momento, éste siga vivo y pueda ser fecundado. Los ensayos en laboratorio mostraron que habría alguna posibilidad de tener cuajado en Mikatza, Saltxipi, Txori Sagarra y Bost Kantoi, puesto que en ellas germinó mucho polen y a las 72h algún tubo polínico había rebasado ¾ del estigma, y en menor medida

en Txalaka, Urtebi Txiki, Manttoni y Moko, en las que se alcanzó al menos la mitad del estigma . Estas variedades potencialmente podrían mostrar un cierto nivel de autocompatibilidad en campo, mientras que todas las demás, ya con los resultados de laboratorio, pueden considerarse como completamente autoincompatibles y totalmente dependientes de la polinización cruzada con polen compatible para tener fruta.

Tabla 6. Resumen de resultados sobre calidad del polen y autofertilidad de las variedades de sidra. Se incluye Golden Delicious (en rojo), como referencia de variedad con cierta autocompatibilidad.

		Calidad polen		Autopolinización			
Tipo	**Variedad**	**Viabilidad (%)**	**Germinación (%)**	**% Pistilos con polen germinado**	**Nº granos polen germinado**	**Long max tubo polinico (%)**	**Cuajado campo (%)**
Diploides	Mokote	65	72	0	0	0	-
	Urtebete	26	2	0	0	0	-
	Reineta encarnada	35	39	8	4	10	-
	Goikoetxe	95	56	10	34	10	0.8
	Verde agria	95	37	25	17	10	0.5
	Errezila	18	55	40	19	33	0.0
	Haritza	67	72	44	71	29	-
	Txalaka	84	70	57	426	40	7.4
	Urtebi txiki	85	26	59	43	58	1.2
	Manttoni	89	59	68	231	56	0.0
	Mikatza	84	84	72	550	84	0.0
	Saltxipi	86	83	76	150	77	1.2
	Golden delicious	*94*	*67*	*79*	*201*	*35*	*-*
	Txori sagarra	84	54	88	153	75	-
	Bost kantoi	93	53	96	173	73	-
	Moko	88	77	100	366	63	6.8
	Urdin	84	41	100	723	28	0.5
Triploides	Udare marroi	60	2	4	1	3	-
	Gezamina	2	1	8	5	13	2.8
	Patzolua	11	2	12	7	5	0.0
	Urtebi haundi	71	20	72	70	38	0.0
	Mozolua	8	4	73	115	21	1.0

Los ensayos de laboratorio son muy útiles para tener una idea del potencial de autocompatibilidad, pero para confirmarlo, se realizó un ensayo de campo en el que se forzó la autopolinización, para lo cual se cubrieron un mínimo de 30 corimbos por variedad con mallas (**Figura 17**). De esta manera se evita la actividad polinizadora de los insectos y se propicia la autopolinización. Se tomaron los datos de los corimbos cubiertos y de los frutos cuajados. Por otro lado, se estimó el número de flores por corimbo contando las flores de 20 corimbos de cada variedad.

Figura 17. Ramas ensacadas. A la izquierda en el momento de colocación de la malla (estado C-D), a la derecha, la misma rama en la época de floración.

En la **Tabla 7** se muestran los resultados completos del estudio de campo, que se resumen en la **Tabla 6**, donde se muestra el cuajado final, para mejor comprensión de la situación global. En las tablas se observa que en la mayoría de las variedades el cuajado fue nulo o residual (<2%), lo que confirmaría que las variedades son estrictamente autoincompatibles y requieren de polinización cruzada. Sólo se observó un cierto cuajado en tres variedades: Gezamina, Moko y Txalaka. En ellas, entre un 10-30% de las yemas presentaban frutos al final del ensayo (uno o dos a lo sumo), lo que está muy alejado de lo que se consigue en esa misma época cuando se poliniza con polen de otras variedades. El nivel de cuajado en ellas es bajo (3-7%) e insuficiente para obtener una cosecha suficiente. Por lo tanto, los resultados combinados de los estudios en laboratorio y campo muestran que **las variedades de sidra estudiadas son mayoritariamente completamente autoincompatibles, y que sólo dos (Txalaka y Moko) presentan un cierto nivel de autocompatibilidad y pueden considerarse parcialmente autocompatibles**. En cualquier caso, la autocompatibilidad mostrada es insuficiente para obtener cosechas aceptables y en todos los casos es preciso contar con polinizadores adecuados. **La autocompatibilidad parcial de Txalaka y Moko debe considerarse como una ayuda** para obtener cuajados un poco mejores, pero no tenerse en cuenta a la hora de diseñar plantaciones y dimensionar qué y cuántos polinizadores se instalan.

Tabla 7. Resultados de los ensayos de ensacado de ramas. Los valores de la tabla son todos en proporción (%) respecto a los valores en floración.

Variedad	Corimbos fértiles respecto a los presentes en F	Nº de frutos por corimbo	Frutos respecto a las flores en F
Txalaka	28.6	36.7	7.4
Moko	22.5	40.0	6.8
Gezamina	12.2	17.1	2.8
Urtebi txiki	3.1	6.3	1.2
Saltxipi	6.7	6.7	1.2
Mozolua	4.2	6.3	1.0
Goikoetxe	2.3	4.7	0.8
Urdin	3.2	3.2	0.5
Verde agria	2.8	2.8	0.5
Manttoni	0.0	0.0	0.0
Patzolua	0.0	0.0	0.0
Errezila	0.0	0.0	0.0
Urtebi haundi	0.0	0.0	0.0
Mikatza	0.0	0.0	0.0

8 - Conclusiones

Se pueden extraer las siguientes conclusiones del estudio realizado:

- **Se ha conseguido identificar los S-alelos** o alelos de incompatibilidad genética de las 25 variedades tradicionales de sidra más relevantes de la D.O. En total, se han descrito 18 genotipos diferentes, 13 correspondientes a variedades diploides y 5 a triploides. Dado que hay menos genotipos que variedades, se han encontrado varios grupos de variedades que comparten genotipo de S-alelos y, por lo tanto, son mutuamente incompatibles. En total, **se han encontrado cinco grupos de variedades incompatibles**:
    - Bost kantoi y Urtebi txiki (S2 S5)
    - Moko, Txalaka y Reineta encarnada (S2 S6)
    - Urtebete y Errezila (S3 S5)
    - Mikatza, Mokote e Ibarra (S3 S26)
    - Goikoetxe y Frantzes mikatza (S5 S28)

  Las variedades pertenecientes al mismo grupo de incompatibilidad, a los efectos de la polinización, cuentan como una sola, por lo que, **si coincidieran en la misma plantación, sería necesario una tercera** para poder disponer de polen compatible con el que tener frutos.

- En las variedades de sidra analizadas **son muy frecuentes S-alelos (S20, S26, S28) que son raros o muy raros en las variedades modernas y de mesa**. Esto es un indicio más de la singularidad genética de este material, diferenciado de las variedades modernas y de las tradicionales de otras regiones europeas. No obstante, esos S-alelos suelen encontrarse con más facilidad en especies de manzano silvestre, como los *Malus floribunda* o los *Malus sylvestris*. Esas especies son una alternativa muy interesante para la polinización del manzano de mesa, ya que suelen ser totalmente compatibles, y producir mucho polen de calidad. Sin embargo, **las variedades de manzano silvestre comercializadas como polinizadores podrían no ser compatibles con muchas variedades de sidra**, por portar alelos comunes. Este aspecto no ha sido estudiado hasta el momento por no ser problemático en manzana de mesa, que es donde más estudios de este tipo se han realizado.

- **La viabilidad y germinación del polen de las variedades de sidra es generalmente alta** o muy alta, a niveles **comparables a las de variedades de mesa de muy buena calidad**, lo que hace que la mayoría de las variedades puedan ser consideradas como buenas polinizadoras de otras con las que sean compatibles. No obstante, existen algunas **excepciones notables**, ya que Reineta Encarnada y, especialmente**, Urtebete y Errezila**, han mostrado un **comportamiento muy malo**. Una situación similar se da para las variedades triploides (a excepción de Urtebi haundi), solo que en ellas ese comportamiento es el esperable. Esto hace que, en la práctica, no sirvan como polinizadores de otras presentes en el mismo huerto, por lo que en los manzanales en los que estén presentes debería haber al menos tres variedades (p. ej. Urtebete + otras dos), si se desea que estas otras variedades tengan un cuajado suficiente.
- **Las variedades han mostrado ser estrictamente autoincompatibles**, tanto por la morfología de sus flores, que tiende a evitar la llegada a los estilos del polen de la propia flor, como por la incapacidad de este polen para germinar y llegar a los óvulos de las flores de la misma variedad. Tan solo dos variedades (Moko y Txalaka) han mostrado una cierta capacidad autofértil, que en cualquier caso es claramente insuficiente para dar una cosecha normal, y que solo puede considerarse como una pequeña ayuda que mejora los cuajados en primaveras difíciles.

9 – Implicaciones del estudio y perspectivas futuras

Los resultados del estudio muestran que es posible identificar con precisión la compatibilidad genética entre variedades, así como la aptitud de las variedades como polinizadores. Esto nos ha permitido realizar fichas de polinización, adjuntadas en el **Anexo 1**, que pueden ser de **gran utilidad para el asesoramiento de nuevas plantaciones**, tanto a la hora de elegir variedades y densidad de polinizadores, como para encontrar **soluciones adecuadas para los ya existentes** en los que haya carencias de polen compatible. No obstante, dada la gran cantidad de variedades de manzano de sidra incluidas en la D.O., el estudio se centró en un número contenido de variedades, las más relevantes actualmente. No obstante, **sigue desconociéndose esta información para un número importante de variedades de interés tanto actual como futuro**. El hecho de que se hayan encontrado varios grupos de variedades mutuamente incompatibles (muchas de ellas muy relevantes y que se suelen encontrar juntas en los manzanales), hace prever que habrá más variedades de cierta importancia que también lo sean, y que fuera recomendable extender el estudio al menos a una segunda tanda de variedades.

A la hora de diseñar nuevas plantaciones, o de introducir medidas correctoras en manzanales ya existentes en los que haya un número insuficiente de polinizadores adecuados (por ser genéticamente incompatibles o por la mala calidad del polen), es muy interesante el recurso de las **variedades silvestres, como los *Malus floribunda***. Este recurso es frecuente en variedades modernas de mesa, porque los *floribunda* producen gran cantidad de polen compatible todos los años, ocupan poco espacio y son sencillos de manejar, y por tanto con una pequeña cantidad de árboles se puede tener muy buenos resultados. Sin embargo, los resultados de este estudio han mostrado que existe la posibilidad de que no sean igualmente apropiados para manzano de sidra. Estas variedades con frecuencia tienen S-alelos que son muy raros en las variedades de mesa, pero que son más frecuentes en las silvestres. Seguramente por este motivo, **no existe información sobre los S-alelos de las variedades silvestres comercializadas como polinizadoras**, a excepción de *Malus Evereste®*, polinizador de floración precoz, cuyo genotipo porta el alelo S26, muy frecuente en las de mesa, lo que lo hace solo parcialmente compatible. Seguiría siendo un polinizador adecuado para esas variedades si la floración coincide, pero no tan bueno como en manzana de mesa, y por tanto la cantidad de árboles de Evereste® recomendada para esas parcelas debería ser mayor. Sería necesario identificar los S-alelos de estas variedades para conocer su aptitud para la polinización del manzano de sidra.

Aunque la mayoría de las variedades estudiadas producen **polen de buena calidad**, se ha encontrado que **algunas como Urtebete y Errezila** son mucho peores de lo que podría esperarse, y en la práctica **no sirven como polinizadores**. Este aspecto es también muy relevante en el diseño y gestión de las plantaciones, y **sería recomendable abordarlo en otras variedades que se consideren interesantes** como polinizadoras, así como aquellas en las que se estudiasen sus S-alelos. También sería interesante confirmar la calidad observada en las variedades ya analizadas, especialmente para Urtebete y Errezila, tomando polen de otras parcelas

.

ANEXO 1

Fichas varietales de compatibilidad del polen

A continuación, se muestran las fichas varietales de compatibilidad para las variedades de sidra estudiadas. Para cada variedad se indica:

- **Nivel de ploidía:** si es diploide o triploide
- **Grupo de incompatibilidad:** Los alelos de incompatibilidad (S-alelos) que tiene
- **Autocompatibilidad:** si ha mostrado tener alguna capacidad de dar fruta con su propio polen o no.
- **Calidad del polen:** se valora conjuntamente la viabilidad y la capacidad de germinación del polen.
- **Polen totalmente compatible:** se detallan las variedades con las que el polen de la variedad de la ficha es totalmente compatible, es decir, no comparten ningún S-alelo, y cualquier grano de polen viable que produzca la variedad será capaz de germinar en las variedades de la lista.
- **Polen parcialmente compatible:** se detallan las variedades con las que el polen de la variedad de la ficha es parcialmente compatible, es decir, alguno de sus S-alelos es igual a alguno de los de la variedad que recibe el polen. Sólo los granos de polen que no coincidan en S-alelos con los de la variedad receptora serán capaces de germinar.
- **Polen incompatible:** se detallan las variedades que comparten todos los S-alelos con la variedad de la ficha y que, por lo tanto, no sirven como polinizadoras ya que no serán capaces de fecundarlas y dar fruto en cantidad suficiente.

En las fichas se resaltan en rojo y cursiva a las variedades modernas de mesa usadas como referencia en el estudio, mientras que las tradicionales de sidra se muestran en negro.

Verde agria			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S1 S*
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Media
Polen totalmente compatible con			
Bost kantoi	Errezila	Frantzes mikatza	*Galaxy*
Gezamina (3n)	Goikoetxe	*Golden delicious*	*Granny smith*
Haritza	Ibarra	*Jonagold (3n)*	Manttoni
Mikatza	Moko	Mokote	Mozolua (3n)
Reineta encarnada	Saltxipi	*Top red, R Chief, Starking*	Txalaka
Txori sagarra	Udare marroi (3n)	Urdin	Urtebete
Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki		
Polen parcialmente compatible con			
Fuji	Limoi	Patzolua (3n)	*Reina de reinetas*

Reina de reinetas			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S1 S3
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Media
Polen totalmente compatible con			
Bost kantoi	Frantzes mikatza	*Galaxy*	Gezamina (3n)
Goikoetxe	Haritza	Manttoni	Moko
Mozolua (3n)	Reineta encarnada	Saltxipi	*Top red, R Chief, Starking*
Txalaka	Urdin	Urtebi txiki	
Polen parcialmente compatible con			
Errezila	Fuji	*Golden delicious*	*Granny smith*
Ibarra	*Jonagold (3n)*	Limoi	Mikatza
Mokote	Txori sagarra	Udare marroi (3n)	Urtebete
Urtebi haundi (3n)	Verde agria		
Polen incompatible con			
Patzolua (3n)			

Patzolua			
Ploidia	Triploide (3n)	**Grupo incompatibilidad**	S1 S3 S5
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Baja
Polen totalmente compatible con			
Haritza	Manttoni	Moko	Mozolua (3n)
Reineta encarnada	Saltxipi	*Top red, R Chief, Starking*	Txalaka
Urdin			
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	Errezila	Frantzes mikatza	Fuji
Galaxy	Gezamina (3n)	Goikoetxe	*Golden delicious*
Granny smith	Ibarra	*Jonagold (3n)*	Limoi
Mikatza	Mokote	*Reina de reinetas*	Txori sagarra
Udare marroi (3n)	Urtebete	Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki
Verde agria			

Limoi			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S1 S26
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	-
Polen totalmente compatible con			
Bost kantoi	Errezila	Frantzes mikatza	*Galaxy*
Gezamina (3n)	Goikoetxe	*Golden delicious*	*Granny smith*
Haritza	*Jonagold (3n)*	Mozolua (3n)	Saltxipi
Top red, R Chief, Starking	Txori sagarra	Udare marroi (3n)	Urtebete
Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki	Limoi	
Polen parcialmente compatible con			
Fuji	Ibarra	Manttoni	Mikatza
Moko	Mokote	Patzolua (3n)	*Reina de reinetas*
Reineta encarnada	Txalaka	Urdin	Verde agria

Urtebi haundi			
Ploidia	Triploide (3n)	**Grupo incompatibilidad**	S2 S3 S?
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Media
Polen totalmente compatible con			
Frantzes mikatza	Fuji	Gezamina (3n)	Goikoetxe
Limoi	Manttoni	Mozolua (3n)	*Top red, R Chief, Starking*
Urdin	Verde agria	*Golden delicious*	Urtebi haundi (3n)
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	Errezila	*Galaxy*	*Granny smith*
Haritza	Ibarra	Mikatza	Moko
Mokote	Patzolua (3n)	*Reina de reinetas*	Reineta encarnada
Saltxipi	Txalaka	Txori sagarra	Udare marroi (3n)
Urtebete	Urtebi txiki		
Polen incompatible con			
Golden delicious	*Jonagold (3n)*		

Bost kantoi			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S2 S5
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Buena
Polen totalmente compatible con			
Fuji	*Granny smith*	Ibarra	Limoi
Manttoni	Mikatza	Mokote	Mozolua (3n)
Reina de reinetas	*Top red, R Chief, Starking*	Txori sagarra	Urdin
Verde agria			
Polen parcialmente compatible con			
Errezila	Frantzes mikatza	Gezamina (3n)	Goikoetxe
Golden delicious	Haritza	*Jonagold (3n)*	Moko
Patzolua (3n)	Reineta encarnada	Saltxipi	Txalaka
Udare marroi (3n)	Urtebete	Urtebi haundi (3n)	
Polen incompatible con			
Urtebi txiki	*Galaxy*		

Urtebi txiki			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S2 S5
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Media-buena
Polen totalmente compatible con			
Fuji	*Granny smith*	Ibarra	Limoi
Manttoni	Mikatza	Mokote	Mozolua (3n)
Reina de reinetas	*Top red, R Chief, Starking*	Txori sagarra	Urdin
Verde agria			
Polen parcialmente compatible con			
Errezila	Frantzes mikatza	Gezamina (3n)	Goikoetxe
Golden delicious	Haritza	*Jonagold (3n)*	Moko
Patzolua (3n)	Reineta encarnada	Saltxipi	Txalaka
Udare marroi (3n)	Urtebete	Urtebi haundi (3n)	
Polen incompatible con			
Bost kantoi	*Galaxy*		

Haritza			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S2 S20
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Buena
Polen totalmente compatible con			
Errezila	Frantzes mikatza	Fuji	Gezamina (3n)
Goikoetxe	*Granny smith*	Ibarra	Limoi
Manttoni	Mikatza	Mokote	Mozolua (3n)
Patzolua (3n)	*Reina de reinetas*	*Top red, R Chief, Starking*	Txori sagarra
Udare marroi (3n)	Urdin	Urtebete	Verde agria
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	*Galaxy*	*Golden delicious*	*Jonagold (3n)*
Moko	Reineta encarnada	Saltxipi	Txalaka
Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki		

Saltxipi			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S2 S23
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Muy buena
Polen totalmente compatible con			
Errezila	Frantzes mikatza	Fuji	Gezamina (3n)
Goikoetxe	Ibarra	Limoi	Mikatza
Mokote	Mozolua (3n)	Patzolua (3n)	*Reina de reinetas*
Top red, R Chief, Starking	Txori sagarra	Udare marroi (3n)	Urdin
Urtebete	Verde agria		
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	*Galaxy*	*Golden delicious*	*Granny smith*
Haritza	*Jonagold (3n)*	Manttoni	Moko
Reineta encarnada	Txalaka	Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki

Moko			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S2 S26
Autocompatible	Parcialmente	**Calidad del polen**	Muy buena
Polen totalmente compatible con			
Errezila	Frantzes mikatza	Fuji	Gezamina (3n)
Goikoetxe	*Granny smith*	Mozolua (3n)	Patzolua (3n)
Reina de reinetas	*Top red, R Chief, Starking*	Txori sagarra	Udare marroi (3n)
Urtebete	Verde agria		
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	*Galaxy*	*Golden delicious*	Haritza
Ibarra	*Jonagold (3n)*	Limoi	Manttoni
Mikatza	Mokote	Saltxipi	Urdin
Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki		
Polen incompatible con			
Txalaka	Reineta encarnada		

Txalaka			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S2 S26
Autocompatible	Parcialmente	**Calidad del polen**	Muy buena
Polen totalmente compatible con			
Errezila	Frantzes mikatza	Fuji	Gezamina (3n)
Goikoetxe	*Granny smith*	Mozolua (3n)	Patzolua (3n)
Reina de reinetas	*Top red, R Chief, Starking*	Txori sagarra	Udare marroi (3n)
Urtebete	Verde agria		
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	*Galaxy*	*Golden delicious*	Haritza
Ibarra	*Jonagold (3n)*	Limoi	Manttoni
Mikatza	Mokote	Saltxipi	Urdin
Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki		
Polen incompatible con			
Moko	Reineta encarnada		

Reineta encarnada			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S2 S26
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Regular
Polen totalmente compatible con			
Errezila	Frantzes mikatza	Fuji	Gezamina (3n)
Goikoetxe	*Granny smith*	Mozolua (3n)	Patzolua (3n)
Reina de reinetas	*Top red, R Chief, Starking*	Txori sagarra	Udare marroi (3n)
Urtebete	Verde agria		
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	*Galaxy*	*Golden delicious*	Haritza
Ibarra	*Jonagold (3n)*	Limoi	Manttoni
Mikatza	Mokote	Saltxipi	Urdin
Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki		
Polen incompatible con			
Moko	Txalaka		

Errezila			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S3 S5
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Regular
Polen totalmente compatible con			
Fuji	Haritza	Limoi	Manttoni
Moko	Mozolua (3n)	Reineta encarnada	Saltxipi
Top red, R Chief, Starking	Txalaka	Urdin	Verde agria
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	Frantzes mikatza	*Galaxy*	Gezamina (3n)
Goikoetxe	*Golden delicious*	*Granny smith*	Ibarra
Jonagold (3n)	Mikatza	Mokote	*Reina de reinetas*
Txori sagarra	Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki	
Polen incompatible con			
Patzolua (3n)	Udare marroi (3n)	Urtebete	

Urtebete			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S3 S5
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Mala
Polen totalmente compatible con			
Fuji	Haritza	Limoi	Manttoni
Moko	Mozolua (3n)	Reineta encarnada	Saltxipi
Top red, R Chief, Starking	Txalaka	Urdin	Verde agria
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	Frantzes mikatza	*Galaxy*	Gezamina (3n)
Goikoetxe	*Golden delicious*	*Granny smith*	Ibarra
Jonagold (3n)	Mikatza	Mokote	*Reina de reinetas*
Txori sagarra	Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki	
Polen incompatible con			
Errezila	Patzolua (3n)	Udare marroi (3n)	

Udare marroi			
Ploidia	Triploide (3n)	**Grupo incompatibilidad**	S3 S5 S11
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Mala
Polen totalmente compatible con			
Fuji	Haritza	Limoi	Manttoni
Moko	Mozolua (3n)	Reineta encarnada	Saltxipi
Top red, R Chief, Starking	Txalaka	Urdin	Verde agria
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	Errezila	Frantzes mikatza	*Galaxy*
Gezamina (3n)	Goikoetxe	*Golden delicious*	*Granny smith*
Ibarra	*Jonagold (3n)*	Mikatza	Mokote
Patzolua (3n)	*Reina de reinetas*	Txori sagarra	Urtebete
Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki		

Mikatza			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S3 S26
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Muy buena
Polen totalmente compatible con			
Bost kantoi	Frantzes mikatza	*Fuji*	*Galaxy*
Gezamina (3n)	Goikoetxe	Haritza	Mozolua (3n)
Saltxipi	*Top red, R Chief, Starking*	Urtebi txiki	Verde agria
Polen parcialmente compatible con			
Errezila	*Golden delicious*	*Granny smith*	*Jonagold (3n)*
Limoi	Manttoni	Moko	Patzolua (3n)
Reina de reinetas	Reineta encarnada	Txalaka	Txori sagarra
Udare marroi (3n)	Urdin	Urtebete	Urtebi haundi (3n)
Polen incompatible con			
Ibarra	Mokote		

Mokote			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S3 S26
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Buena
Polen totalmente compatible con			
Bost kantoi	Frantzes mikatza	*Fuji*	*Galaxy*
Gezamina (3n)	Goikoetxe	Haritza	Mozolua (3n)
Saltxipi	*Top red, R Chief, Starking*	Urtebi txiki	Verde agria
Polen parcialmente compatible con			
Errezila	*Golden delicious*	*Granny smith*	*Jonagold (3n)*
Limoi	Manttoni	Moko	Patzolua (3n)
Reina de reinetas	Reineta encarnada	Txalaka	Txori sagarra
Udare marroi (3n)	Urdin	Urtebete	Urtebi haundi (3n)
Polen incompatible con			
Mikatza	Ibarra		

Ibarra			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S3 S26
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	-
Polen totalmente compatible con			
Bost kantoi	Frantzes mikatza	*Fuji*	*Galaxy*
Gezamina (3n)	Goikoetxe	Haritza	Mozolua (3n)
Saltxipi	*Top red, R Chief, Starking*	Urtebi txiki	Verde agria
Polen parcialmente compatible con			
Errezila	*Golden delicious*	*Granny smith*	*Jonagold (3n)*
Limoi	Manttoni	Moko	Patzolua (3n)
Reina de reinetas	Reineta encarnada	Txalaka	Txori sagarra
Udare marroi (3n)	Urdin	Urtebete	Urtebi haundi (3n)
Polen incompatible con			
Mikatza	Mokote		

Txori sagarra			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S3 S28
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Buena
Polen totalmente compatible con			
Bost kantoi	Fuji	*Galaxy*	Haritza
Limoi	Manttoni	Moko	Reineta encarnada
Saltxipi	Txalaka	Urdin	Urtebi txiki
Verde agria			
Polen parcialmente compatible con			
Errezila	Frantzes mikatza	Gezamina (3n)	Goikoetxe
Golden delicious	*Granny smith*	Ibarra	*Jonagold (3n)*
Mikatza	Mokote	Mozolua (3n)	Patzolua (3n)
Reina de reinetas	*Top red, R Chief, Starking*	Udare marroi (3n)	Urtebete
Urtebi haundi (3n)			

Goikoetxe			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S5 S28
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Buena
Polen totalmente compatible con			
Fuji	*Golden delicious*	*Granny smith*	Haritza
Ibarra	*Jonagold (3n)*	Limoi	Manttoni
Mikatza	Moko	Mokote	*Reina de reinetas*
Reineta encarnada	Saltxipi	Txalaka	Urdin
Urtebi haundi (3n)	Verde agria		
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	Errezila	*Galaxy*	Mozolua (3n)
Patzolua (3n)	*Top red, R Chief, Starking*	Txori sagarra	Udare marroi (3n)
Urtebete	Urtebi txiki		
Polen incompatible con			
Frantzes mikatza	Gezamina (3n)		

Frantzes mikatza			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S5 S28
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	-
Polen totalmente compatible con			
Fuji	*Golden delicious*	*Granny smith*	Haritza
Ibarra	*Jonagold (3n)*	Limoi	Manttoni
Mikatza	Moko	Mokote	*Reina de reinetas*
Reineta encarnada	Saltxipi	Txalaka	Urdin
Urtebi haundi (3n)	Verde agria		
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	Errezila	*Galaxy*	Mozolua (3n)
Patzolua (3n)	*Top red, R Chief, Starking*	Txori sagarra	Udare marroi (3n)
Urtebete	Urtebi txiki		
Polen incompatible con			
Goikoetxe	Gezamina (3n)		

Gezamina			
Ploidia	Triploide (3n)	**Grupo incompatibilidad**	S5 S7 S28
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Mala
Polen totalmente compatible con			
Fuji	*Golden delicious*	*Granny smith*	Haritza
Ibarra	*Jonagold (3n)*	Limoi	Manttoni
Mikatza	Moko	Mokote	*Reina de reinetas*
Reineta encarnada	Saltxipi	Txalaka	Urdin
Urtebi haundi (3n)	Verde agria		
Polen parcialmente compatible con			
Bost kantoi	Errezila	Frantzes mikatza	*Galaxy*
Goikoetxe	Mozolua (3n)	Patzolua (3n)	*Top red, R Chief, Starking*
Txori sagarra	Udare marroi (3n)	Urtebete	Urtebi txiki

Mozolua			
Ploidia	Triploide (3n)	**Grupo incompatibilidad**	S7 S28 *S?*
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Mala
Polen totalmente compatible con			
Bost kantoi	Errezila	Fuji	*Galaxy*
Golden delicious	*Granny smith*	Haritza	Ibarra
Jonagold (3n)	Limoi	Manttoni	Mikatza
Moko	Mokote	Patzolua (3n)	*Reina de reinetas*
Reineta encarnada	Saltxipi	Txalaka	Udare marroi (3n)
Urdin	Urtebete	Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki
Verde agria	Gezamina (3n)	Mozolua (3n)	
Polen parcialmente compatible con			
Frantzes mikatza	Goikoetxe	*Top red, R Chief, Starking*	Txori sagarra
Polen incompatible con			
Gezamina (3n)			

Manttoni			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S23 S26
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Buena
Polen totalmente compatible con			
Bost kantoi	Errezila	Frantzes mikatza	Fuji
Galaxy	Gezamina (3n)	Goikoetxe	*Golden delicious*
Haritza	*Jonagold (3n)*	Mozolua (3n)	Patzolua (3n)
Reina de reinetas	*Top red, R Chief, Starking*	Txori sagarra	Udare marroi (3n)
Urtebete	Urtebi haundi (3n)	Urtebi txiki	Verde agria
Polen parcialmente compatible con			
Granny smith	Ibarra	Limoi	Mikatza
Moko	Mokote	Reineta encarnada	Saltxipi
Txalaka	Urdin		

Urdin			
Ploidia	Diploide (2n)	**Grupo incompatibilidad**	S24 S26
Autocompatible	No	**Calidad del polen**	Media-buena
Polen totalmente compatible con			
Bost kantoi	Errezila	Frantzes mikatza	Fuji
Galaxy	Gezamina (3n)	Goikoetxe	*Golden delicious*
Granny smith	Haritza	*Jonagold (3n)*	Mozolua (3n)
Patzolua (3n)	*Reina de reinetas*	Saltxipi	*Top red, R Chief, Starking*
Txori sagarra	Udare marroi (3n)	Urtebete	Urtebi haundi (3n)
Urtebi txiki	Verde agria		
Polen parcialmente compatible con			
Ibarra	Limoi	Manttoni	Mikatza
Moko	Mokote	Reineta encarnada	Txalaka

ANEXO 2

Morfología del corimbo y de las flores

Gezamina

Errezila

Manttoni

Mikatza

Moko

Mozolua

Patzolua

Saltxipi

Txalaka

Udare Marroi

Urdin

Urtebi Handi

Urtebi Txiki

Verde Agria

Bost Kantoi (UPNA)

Golden (UPNA)

Reineta Encanada (UPNA)

Txori Sagarra (UPNA)

Urtebete (UPNA)

Variedades D.O. Gipuzkoa

Otras variedades locales

ANEXO 3

Perfiles genéticos de las variedades

| ID muestra | Nombre muestra | Origen (1) | CH02D08 | | | CH02D08 | | | CH02D08 | | | CH01f02-1 | | | CH01f02-2 | | | CH01f02-3 | | | CH01h02 | | | CH01h02 | | | CH01h02 | | | CH01h10 | | | CH01h10 | | | CH01h10 | | | CH04E05 | | | CH04E05 | | | CH04E05 | | | CH04c07 | | | CH04c07 | | | CH04c07 | | | CH02c09 | | | CH02c09 | | | CH02c09 | | | CH01h01 | | | CH01h01 | | | CH01h01 | | | CH05f06 | | | CH05f06 | | | CH05f06 | | | CH02c11 | | | CH02c11 | | | CH02c11 | | | Hi02c07 | | | Hi02c07 | | | Hi02c07 | | | CH03d07 | | | CH03d07 | | | CH03d07 | | | CH04f10 | | | CH04f10 | | | CH04f10 | | | GD12 | | | GD12 | | | GD12 | | | GD147 | | | GD147 | | | GD147 | | | CH02c06 | | | CH02c06 | | | CH02c06 | | |
|---|---|---