



Compatibilidad y viabilidad del polen de variedades de manzano de sidra en Gipuzkoa

upna

Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

Carlos Miranda (carlos.miranda@unavarra.es)

Grupo de Investigación **FRUTICULTURA Y VITICULTURA AVANZADAS**
Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y Biociencias (ETSIAB)
Campus de Arrosadia, 31006 Pamplona

Problemas del cultivo del manzano de sidra en Gipuzkoa

- Comportamiento errático de las producciones (vecería)

2019: 5500 T 2020: 2000 T

- Escasas posibilidades de mecanización
 - Marcos estrechos
 - Pendientes elevadas
- Poda insuficiente o inexistente
- Escasa regulación de la carga
- Envejecimiento acelerado de las plantaciones
- Problemas de cuajado
 - Meteorología desfavorable en floración
 - Control del vigor problemático
 - **Polinización insuficiente**



Problemática de la polinización del manzano de sidra en Gipuzkoa

Se utilizan variedades tradicionales de las que se desconoce

- El grado de **autocompatibilidad** e **intercompatibilidad** de las variedades empleadas
- El grado de **viabilidad** del polen
- El nivel de **coincidencia** de sus periodos de floración-fecundación
- La **densidad** de polinizadores necesaria

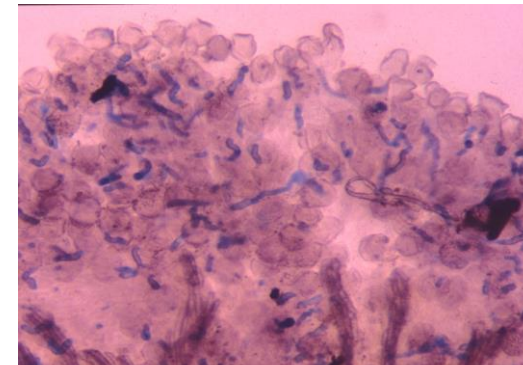
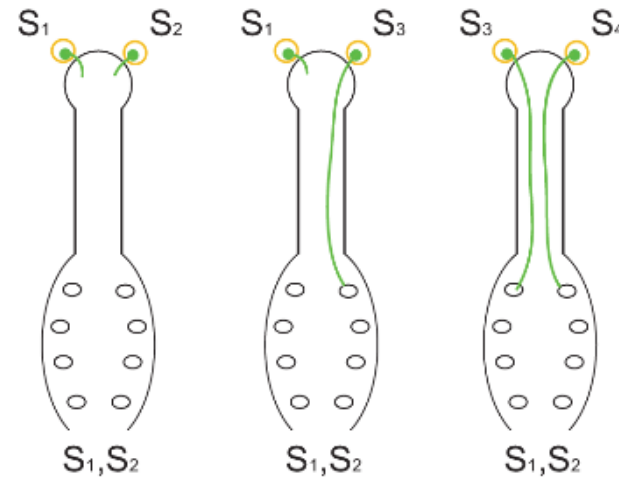


Compatibilidad. Capacidad para que el polen de una variedad fecunde a sus óvulos

Causas de incompatibilidad

Genética o factorial: incompatibilidad polen-estigma (alelos S).

Los S-alelos determinan la compatibilidad genética entre variedades.



Granos de polen que, aunque germinados, no avanzan por el estilo (incompatibilidad)

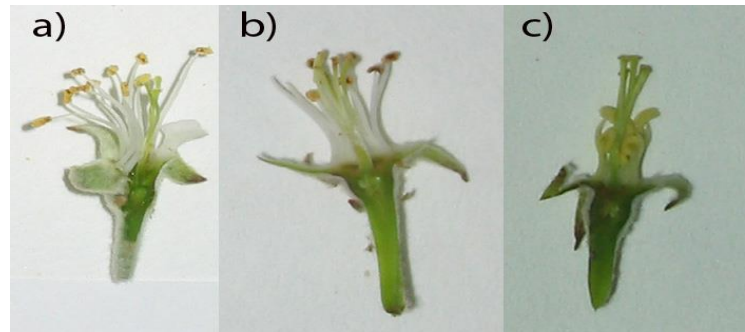
- **Variedades compatibles:** Si los S-alelos de los dos parentales son distintos
Si uno de los S-alelos es coincidente entre los dos parentales
- **Variedades incompatibles:** Si los S-alelos de los dos parentales son iguales, las variedades son ***incompatibles***

Compatibilidad. Capacidad para que el polen de una variedad fecunde a sus óvulos

Causas de incompatibilidad

Diferencias en la fecha de maduración de las piezas florales: Protandia (masc. antes que fem) y protoginia (fem antes que masc.)

Morfológica: mala formación, atrofia o aborto de los órganos sexuales.
Muy influida por factores ambientales y nutritivos



Longitud del estilo en relación a los estambres: a) más cortos, b) iguales, c) más largos.

Citológica: defectos en la formación del polen o los óvulos -> poca capacidad germinativa o abortos. Muy frecuente en variedades triploides: Germinación polen manzano triploide <10%. Diploide >50%



**Gipuzkoako
Foru Aldundia**
Diputación Foral
de Gipuzkoa

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

Ejecución 2020-2021

Objetivo del proyecto

Determinar cuáles son las causas que explican la baja productividad media de las plantaciones de manzano de sidra en Gipuzkoa.

Para ello, en las variedades más cultivadas se evaluó la compatibilidad y la viabilidad del polen por medio de:

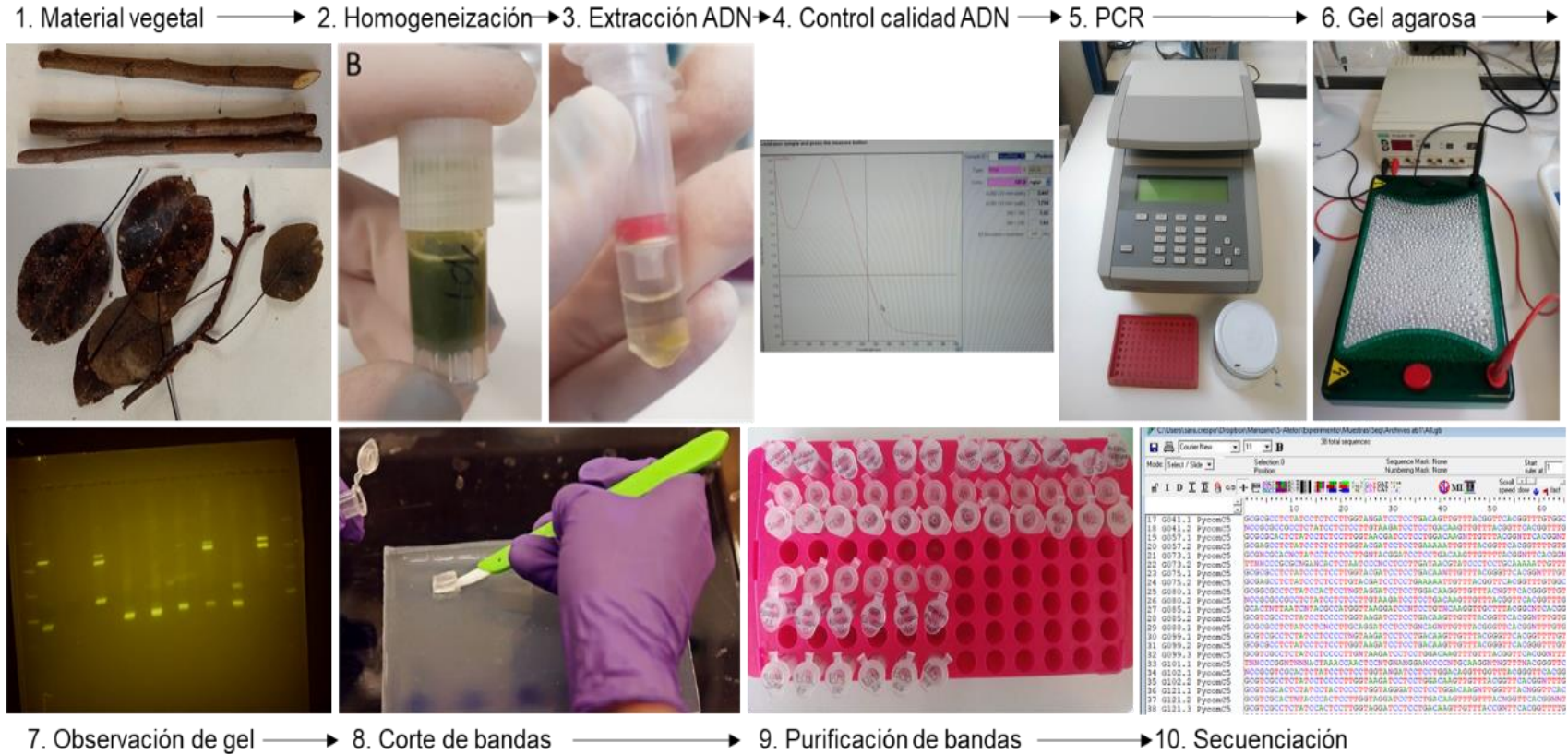
1. Determinación de los S-alelos
2. Caracterización morfológica de flores y corimbos
3. Evaluación de la viabilidad del polen
4. Evaluación de la capacidad de germinación del polen
5. Evaluación de la auto-compatibilidad (en laboratorio y en campo)

25 variedades de sidra y 8 control

Variedades recomendadas (15)	Otras variedades relevantes (10)	Variedades control (8)
Errezila	Bost kantoï	Golden delicious
Frantzes sagarra	Ibarra	Starking
Gezamina	Limoï	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		



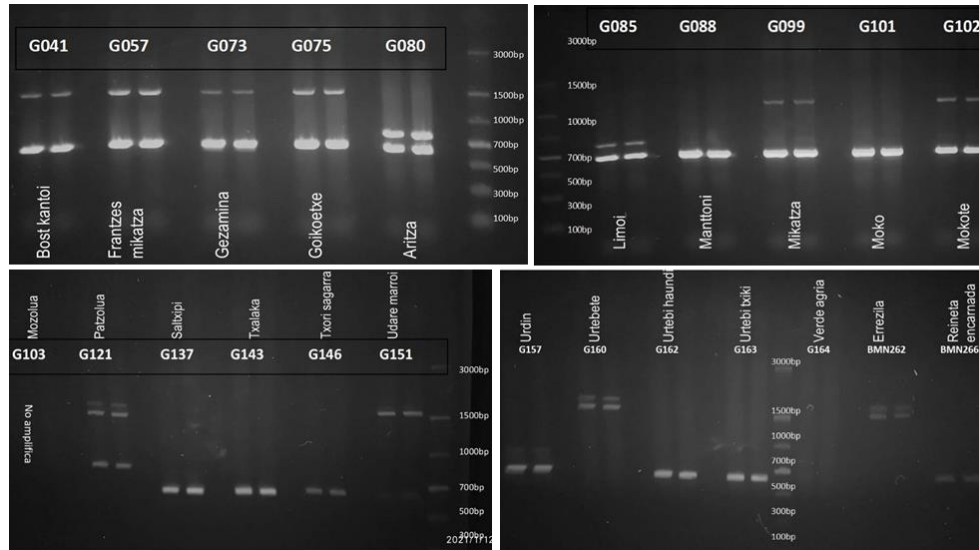
Metodología empleada



Protocolo: **amplificación de todos los S-alelos** mediante un único par de cebadores (lo que se denomina como cebadores degenerados) para su posterior **secuenciación**.

Asegura que todas las variantes de S-alelos van a poder ser identificadas, incluso si no han sido descritos previamente (nuevos S-alelos).

Amplificación



Gel de agarosa con fragmentos de S-alelos amplificados con primers degenerados Pycom

Identificación en base de datos genómica

>G080.1 (804bp) S20

CGCGCGCCTCTATCACTCTCNGTAGGCGCTCTCGGCAAGGTGTTTACNGTICACAGTTGTGGCTTCAGACATCAATGGAATGACCCANAAATATTCGANGGCCGCCGCT
CNTANCCNACGCTAATGATGATCAATACAGANAGCAAAATGTTTCTCATNTAGTACCTGTGTGTCANATAATATTTTGGNCNACCTGGGNCACCCNACCTTTAAACCAA
ANGTGTGCTGCGAATGNNNCATATAATCCTTNGNAGCCNNAATCAATCNCNCCCACCTCCCTAGTGGTGGGNGGNNCGNCAGCATCACTCATCTCTATCTATCTGTCGGG
AATACATAGNGTGCTACACACAGNAGCGCTGTGGNGNAITCCCTNAACTGACAGCCCTGCTGNNCTCCNTTACATATATNTATATGTGACGNCACNAAATACATCNCNCCG
CTNNNGCNCNNCTGACGACCNNTNNCCNNAAGGNGCATCTGAGNGTCTGTGGCGCTGACGNGGCCGAAACATGNGCTCGCGCGGCTGNCNCNACCCNACCCNCCG
GCCCATCNCNCTCATCAGATCAANNGNCCNAGCCNNTANNAGCCTGTCTGAGAACTCTCAAAAGGCGAATATACAAACCGGTGAGGAAAAACAGGACCATCGTGGT
ATATGAAAAATGGCATCGACGAATGTATCAACAAATGACACCAAAATTAAGTGGCCAAAGATCAATGAGGACATCATGCAATGTGGTGGTGGCTCCCTTCGNGGA

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Malus domestica S-RNase (Sl) gene, S20 allele, complete cds	apple	298	298	20%	4e-76	100.00%	3186	MG598500.1

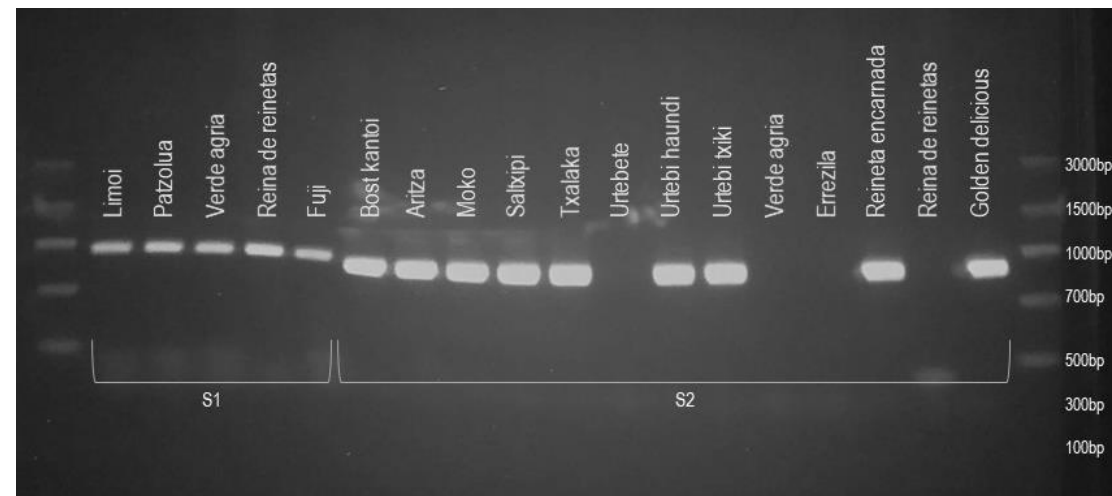
>G080.2 (621bp) S2

NCCGCGCGGCGTCTCTCTCTCTGTAAGTCAATCTCTGCAGAGTCGATGTCGCTGCGTTGTCCGCTCTCAACATGATGTCGAAGTGAAATTAATGTCAGTAGTCAACGCTGA
 CTAATCGGCAAGTAATAATTAACAACAGTCAATCAATATGTTATTTATTAATTAATACTAATCAATGATGATTTATTCGCGGCTGGTGCAACAACTTAATTAATAATTAATCAATA
 CACTTCCTATTATTAATGTCGACATCAAAATATGCTCGCAACGATGTTGAATGTCGCAAAACGATTAATCAAGAAAAATCAATTTAGGCGCTTCGGAATAGAGGTGGGCAAAA
 CAGTTGGCTCTGGGTATCCCAACATACGGGAACGATCTCAATGATTAATCAATAGTCAATGCAATAATCCAGCAACAAAAAGCTTCGTATCTCTCAAGAGGCGCAAGAT
 TGAACGGGATGCGGATTAACAGGACAGAGAAGGAAATGTGATGCCATAAGAAAAAGGTGTCATGTTAAGGAACCAAACTCAAGTGGCCTAAAAGATACTCAGTAGCTGAAT
 GTATCGGAGTCCCCCTTCAG

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Malus domestica S-RNase (S) gene, S2 allele, complete cds	apple	1105	1105	98%	0.0	99.19%	2764	MG598488.1

Resultado: S-alelos Aritza: S2-S20

Confirmación con primers específicos



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).

25 variedades de sidra

18 grupos de incompatibilidad

13 grupos diploides

5 grupos triploides

1) **Incompatibles:** Variedades del mismo grupo

- Bost kantoï (S2 S5) y Urtebi txiki (S2 S5)

2) **Parcialmente compatibles:** variedades que comparten un alelo (sólo les sirve el polen que no coincide)

- Bost kantoï (S2 S5) y Haritza (S2 S20)

3) **Totalmente compatibles:** variedades que no comparten alelos (les sirve todo el polen)

- Bost kantoï (S2 S5) y Limoi (S1 S26)

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 kantoï	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 sagarra	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

25 variedades de sidra
18 grupos de incompatibilidad
13 grupos diploides
5 grupos triploides

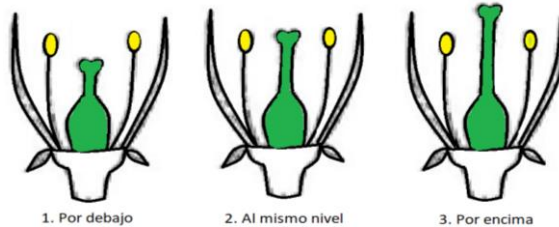
- 1) **Incompatibles:** Variedades del mismo grupo
 - Bost kantoi (**S2 S5**) y Urtebi txiki (**S2 S5**)
- 2) **Parcialmente compatibles:** variedades que comparten un alelo (sólo les sirve el polen que no coincide)
 - Bost kantoi (**S2 S5**) y Haritza (**S2 S20**)
- 3) **Totalmente compatibles:** variedades que no comparten alelos (les sirve todo el polen)
 - Bost kantoi (**S2 S5**) y Limoi (**S1 S26**)

Malus Everest: S20 S26

Grupo	Variedad	Ploidia		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	S1 S3 S5													
4	Fuji	2n	S1 S9													
5	Limoi	2n	S1 S26													
6	Golden delicious	2n	S2 S3													
	Urtebi haundi	3n	S2 S3													
7	Jonagold	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	Manttoni	2n	S23 S26													
13	Urdin	2n	S24 S26													
14	Errezila	2n	S3 S5													
	Urtebete	2n	S3 S5													
15	Udare marroi	3n	S3 S5 S11													
16	Granny smith	2n	S3 S23													
17	Mikatza	2n	S3 S26													
	Mokote	2n	S3 S26													
	Ibarra	2n	S3 S26													
18	Txori sagarra	2n	S3 S28													
19	Goikoetxe	2n	S5 S28													
	Frantzes	2n	S5 S28													
20	Gezamina	3n	S5 S7 S28													
21	Mozolua	3n	S7 S28 S?													
22	Top red, R Chief, Starking	2n	S9 S28													

Estilos y estambres

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

La posición de los estigmas respecto de las anteras es un mecanismo con el que se puede forzar la polinización cruzada:

- Los tipos 1 y 2 pueden recibir polen de la misma flor
- El tipo 3 no puede recibir polen de la misma flor



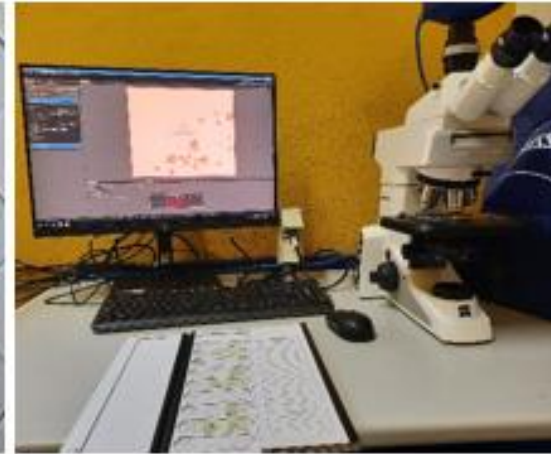
100 flores / variedad



Extracción y
secado

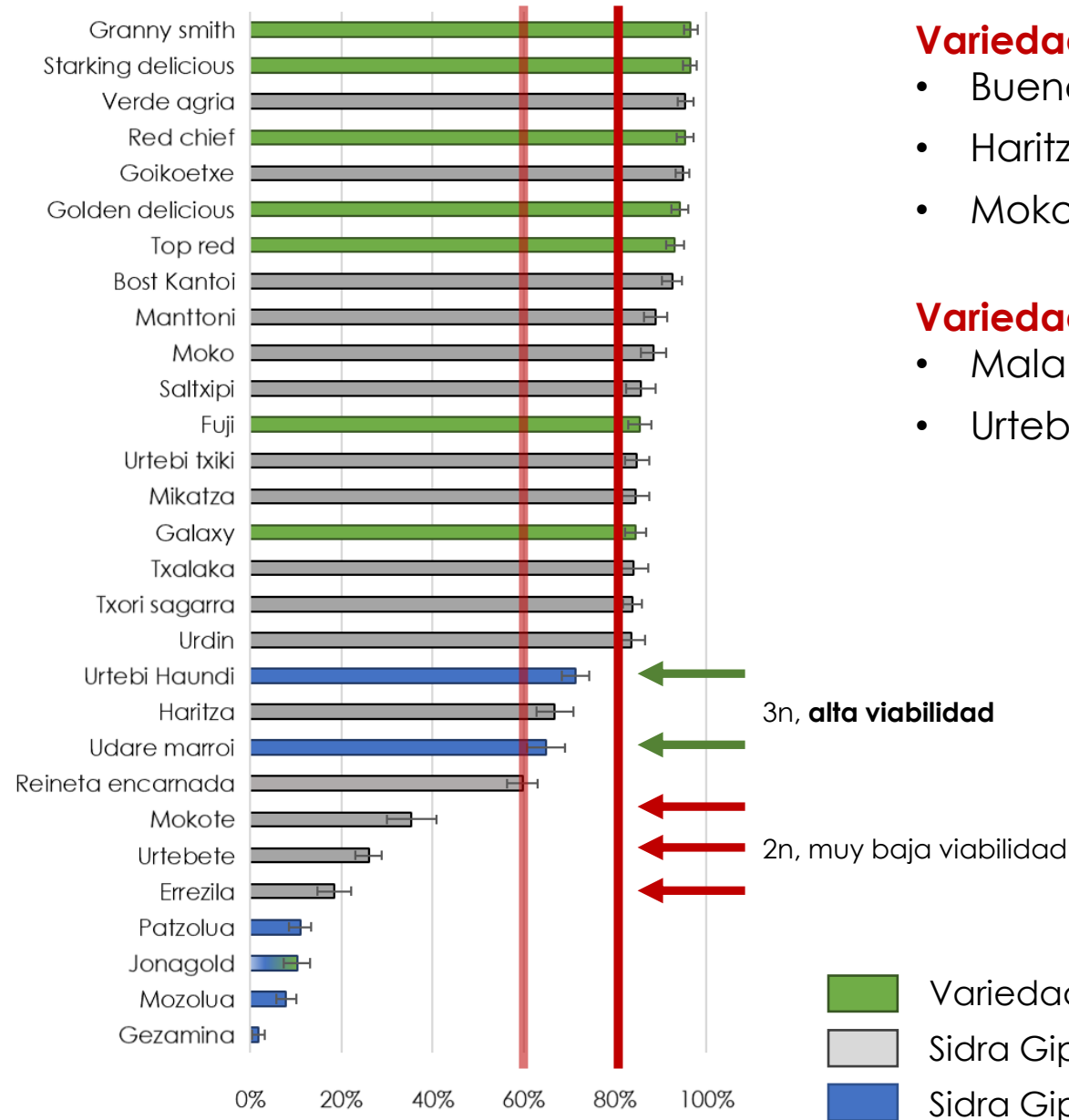


Tinción del polen: esparcido, tinción y observación al microscopio



	Considerados como viables	Considerados como medio viables	Considerados como no viables
MTT			
TTC			

Polen viable: “vivo”, capaz de germinar y fecundar



Variedades diploides

- Buena viabilidad en general
- Haritza viabilidad moderada
- Mokote, Urtebete, Errezila muy baja viabilidad

Variedades triploides

- Mala viabilidad en general
- Urtebi haundi, Udare marroi viabilidad moderada

4 – Caracterización de la germinación del polen

100 flores / variedad



Extracción y
secado

Germinación in vitro: incubación y observación al microscopio



Considerados como germinados

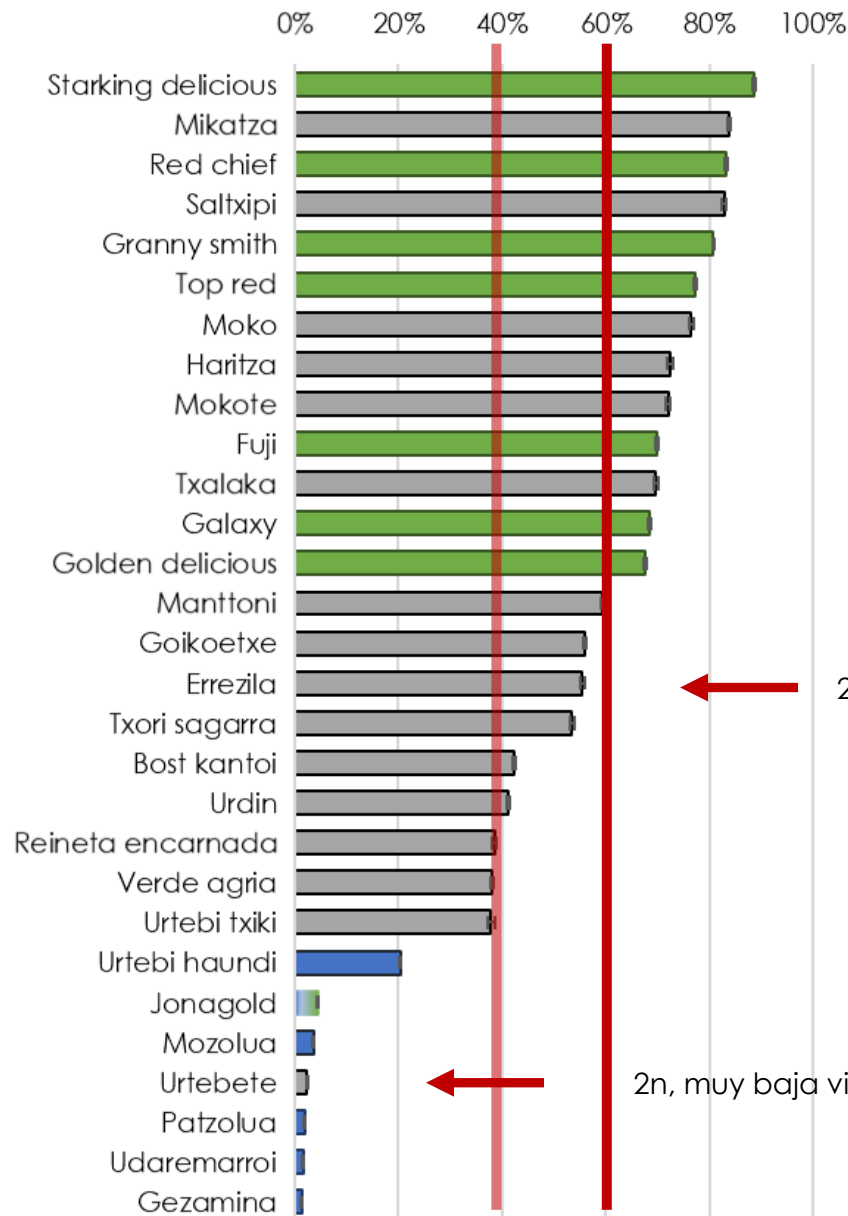


Considerados como no germinados



Polen germinado: “vivo”, capaz de fecundar

4 – Caracterización de la germinación del polen



Variedades diploides

- Buena germinación en general
- Bost kantoí, Urdin, R. Encarnada, Verde Agria, Urtebi txiki, germinación moderada
- Urtebete muy baja germinación (y muy baja viabilidad)

Variedades triploides

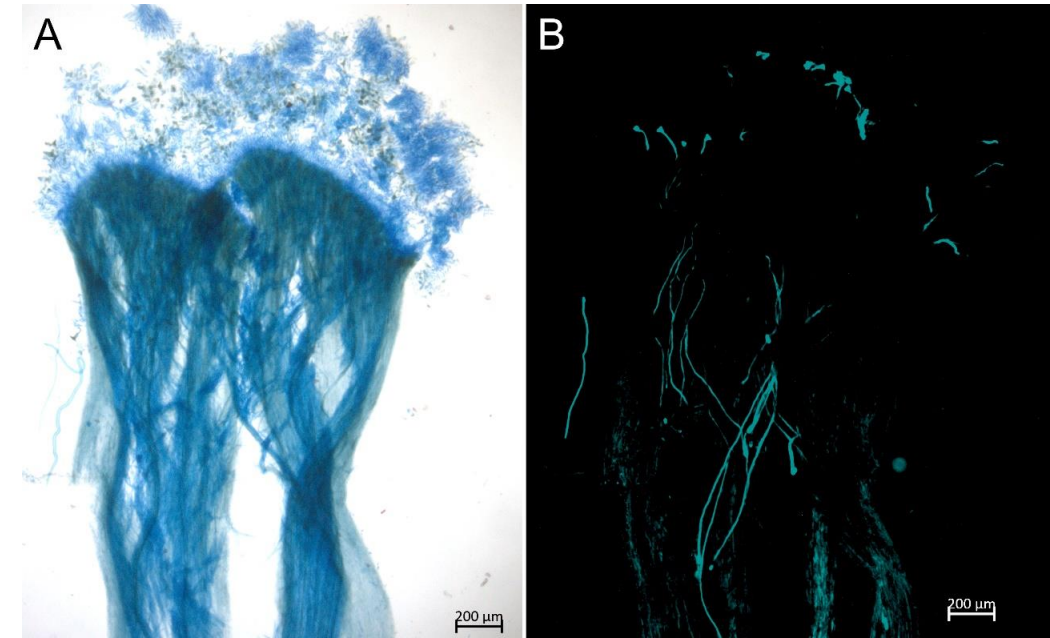
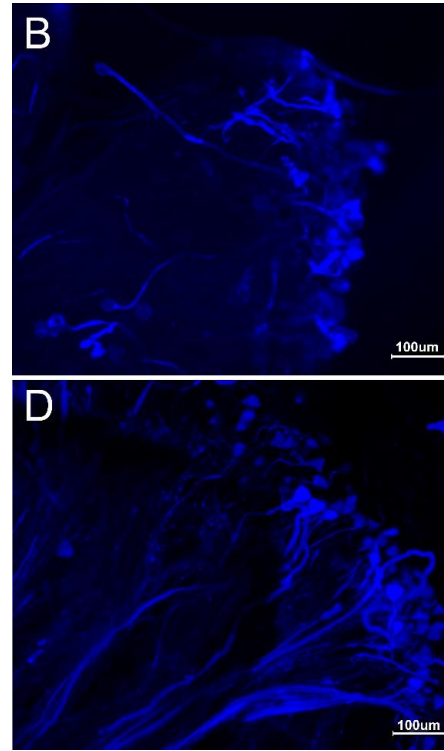
- Muy mala germinación en general
- Urtebi haundi germinación baja

2n, muy baja viabilidad, baja germinación

2n, muy baja viabilidad, muy baja germinación

- Variedades de referencia
- Sidra Gip diploides
- Sidra Gip triploides

a) Autopolinización en laboratorio



b) Autopolinización en campo (ensacado)



5 – Determinación del nivel de auto-compatibilidad

Tipo	Variedad	Calidad poler		Autopolinización					Autotértil
		Viabilidad (%)	Germinación (%)	% Pistilos con polen germ	Nº granos polen aeminado	Long max (%)	Cuajado campo (%)		
Diploides	Mokote								NO
	Urtebete								NO
	Reineta encarnada								NO
	Goikoetxe								NO
	Verde agria								NO
	Errezila								NO
	Haritza								NO
	Txalaka								Parcial
	Urtebi txiki								NO
	Manttoni								NO
	Mikatza								NO
	Saltxipi								NO
	Golden delicious								Parcial
	Txori sagarra								NO
	Bost kantoï								NO
	Moko								Parcial
	Urdin								NO
Triploides	Udare marroi								NO
	Gezamina								NO
	Patzolua								NO
	Urtebi haundi								NO
	Mozolua								NO

Como se esperaba, la autocompatibilidad fue nula en la mayoría de variedades: **necesitan polen de otra variedad compatible**

Destacable el comportamiento de Txalaka y Moko, con cierta autocompatibilidad (**no evita necesitar polinizadores**)

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

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	Gezamina (3n)			
Incompatible con					
Urtebi txiki	Galaxy				

Se han identificado los alelos de incompatibilidad (S-alelos) en las 25 variedades más relevantes de la DO

Se han encontrado cinco grupos de variedades incompatibles:

S2 S5	Bost kantoï , Urtebi txiki
S2 S26	Reineta encarnada , Moko , Txalaka
S3 S5	Urtebete , Errezila
S3 S26	Mikatza , Mokote , Ibarra
S5 S28	Frantzes sagarra , Goikoetxe

La viabilidad del polen de las variedades analizadas es generalmente buena o muy buena en las diploides y mala en las triploides, aunque destacan:

- Mokote, Urtebete y Errezila como diploides con polen muy poco viable
- Urtebi Haundi y Udare marroi como triploides con buen polen

La germinabilidad del polen es generalmente buena o muy buena en las diploides y mala en las triploides, aunque destacan Urtebete como variedad con polen de muy mala calidad y Errezila, con polen de muy baja viabilidad, baja germinación. Esto hace que estas dos variedades sean muy malas como polinizadores de otras en el mismo huerto.

Como era de esperar, las variedades son en su mayoría completamente autoestériles y el polen propio no da lugar a fruta, salvo en el caso de Moko y Txalaka, en las que hay una cierta (aunque pequeña) autofertilidad.



Gracias por su
atención!

Compatibilidad y viabilidad del polen de variedades de manzano de sidra en Gipuzkoa

upna

Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

Grupo de Investigación **FRUTICULTURA Y VITICULTURA AVANZADAS**
Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y Biociencias (ETSIAB)
Campus de Arrosadía, 31006 Pamplona

Carlos Miranda Jiménez

Sara Crespo Martínez
Oihane Oneka Mugica
M^a Jesús Laquidain Imirizaldu
Jorge Urrestarazu Vidart
L. Gonzaga Santesteban García