

La Diputación Foral de Gipuzkoa dispone en Otxalarrea de una colección de manzanos cuyo objetivo principal es la conservación de variedades autóctonas para sidra. A lo largo de los años se ha ido recopilando una gran cantidad de variedades, gracias a diferentes prospecciones. La elección de las variedades plantadas en Otxalarrea se ha realizado en base a las características fenotípicas observadas, así como a la terminología empleada en los diferentes caseríos. A finales de 2018 se inició una colaboración con la UPNA, INTIA, Neiker y el Conservatoire Végétal Régional d'Aquitaine, dentro del proyecto TOKI-POMMES cuyo objetivo principal fue "la identificación y selección de variedades autóctonas de manzano y fomentar la creación de productos específicos que permitan el desarrollo sostenible de la fruticultura de la Eurorregión".

El objetivo de este informe es proporcionar datos preliminares de la identificación genética de 187 accesiones de manzano mediante marcadores moleculares procedentes mayoritariamente de la colección de Otxalarrea. Las muestras fueron remitidas por Aitor Etxeandía e Iratxe Aquesolo. Los análisis genéticos y la interpretación de los mismos han sido llevados a cabo en el laboratorio del grupo de investigación 'Fruticultura y Viticultura Avanzadas' adscrito al Departamento 'Agronomía, Biotecnología y Alimentación' de la Universidad Pública de Navarra.

En primer lugar, se extrajo el ADN de cada una de las muestras de manzano recibidas mediante el kit de extracción Dneasy® Plant Mini Kit (Qiagen). Posteriormente, se amplificaron por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 16 microsatélites tal y como se describe en Urrestarazu et al. (2012). Estos 16 microsatélites están distribuidos en los distintos grupos de ligamiento del genoma del manzano han sido amplificados mediante tres PCR múltiples (Tabla 1).

Tabla 1. Detalle de los microsatélites y de las reacciones de PCR múltiples empleadas

| Código | Grupo de ligamiento | PCR múltiple | Fluores-cencia | Forward primer sequence 5'→3' | Reverse primer sequence 5'→3' |
|----------------------|---------------------|--------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Hi02c07 ^a | 1 | C | VIC | AGAGCTACGGGGATCCAAAT | GTTT AAGCATCCCATTGAAAGG |
| CH02c06 ^b | 2 | C | PET | TGACGAAATCCACTACTAATGCA | GATTGCGCGCTTTTAAACAT |
| GD12 ^c | 3 | C | NED | TTGAGGTGTTCTCCCATGGA | CTAACGAAGCCGCATTTCTTT |
| CH05f06 ^b | 5 | B | NED | TTAGATCCGGTCACTCTCCACT | TGGAGGAAGACGAAGAAGAAAG |
| CH03d07 ^b | 6 | C | VIC | CAAATCAATGCAAAACTGTCA | GGCTTCTGGCCATGATTTTA |
| CH04e05 ^b | 7 | A | PET | AGGCTAACAGAAATGTGGTTTG | ATGGCTCCTATTGCCATCAT |
| CH01h10 ^b | 8 | A | PET | TGCAAAGATAGGTAGATATATGCCA | AGGAGGGATTGTTGTGCAC |
| CH01h02 ^b | 9 | A | NED | AGAGCTTCGAGCTTCGTTTG | ATCTTTTGGTGCTCCCACAC |
| CH02c11 ^b | 10 | B | PET | TGAAGGCAATCACTCTGTGC | TTCCGAGAATCCTCTTCGAC |
| CH02d08 ^b | 11 | A | VIC | TCCAAAATGGCGTACCTCTC | GCAGACACTCACTCACTATCTCTC |
| CH01f02 ^b | 12 | A | 6-FAM | ACCACATTAGAGCAGTTGAGG | CTGGTTTGTTCCTCCAGC |
| GD147 ^c | 13 | C | PET | TCCCCCATTTCTCTGC | GTTTAAACCCTGCTGCTGAAC |
| CH04c07 ^b | 14 | B | VIC | GGCTTCCATGTCTCAGAAG | CCTCATGCCCTCCACTAACA |
| CH02c09 ^b | 15 | B | VIC | TTATGTACCAACTTTGCTAACCTC | AGAAGCAGCAGAGGAGGATG |
| CH04f10 ^b | 16 | C | 6-FAM | GTAAATGAAATACAGTTTCACAA | TTAAATGCTTGGTGTGTTTTC |
| CH01h01 ^b | 17 | B | 6-FAM | GAAAGACTTGCACTGGGAGC | GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT |

^aSilfverberg-Dilworth et al. (2006)

^bLiebhart et al. (2002)

^cHokanson et al. (1998)

La separación de los fragmentos se ha llevado a cabo en un secuenciador genético automático mediante electroforesis capilar. La interpretación de resultados se ha realizado utilizando el programa Peak Scanner. Este tipo de análisis permiten la identificación inequívoca de la variedad, pero no la ocurrencia de mutaciones somáticas.

De las 187 accesiones analizadas se han identificado 112 genotipos únicos (Tablas 2 y 3). Ciento once accesiones aparecen repartidas en 39 grupos de duplicados (G001 a G039), lo que representa un 38,5% de accesiones duplicadas en el conjunto del germoplasma analizado. El resto de accesiones conservadas (76) únicamente aparecen una vez en el conjunto analizado (G040 a G112). La amplificación de tres muestras, indicadas en la Tabla 3 con *** ha sido deficiente [Bergarako Frailea (37), Geza (67) y Gazi Zuri Gaztelu (167)], por lo que deberíamos repetir los análisis genéticos. En la Tabla 2 se indican los genotipos con accesiones duplicadas, mientras que en la Tabla 3 se indican cuáles son los genotipos representados por una sola accesión. Se adjunta también un anexo en formato Excel con toda esta información.

Tabla 2. Listado de accesiones duplicadas. Un mismo código de grupo genético indica que las accesiones presentan un perfil genético idéntico para los marcadores utilizados.

| Grupo genético | ID | Variedad | Grupo genético | ID | Variedad |
|----------------|-----|---------------------------|----------------|-----|--------------------------|
| G001 | 87 | MAMULA | G021 | 17 | AÑUA |
| G001 | 97 | MERKALIN | G021 | 109 | MUTUR LUZE |
| G002 | 70 | GEZA KARABEL | G022 | 22 | ARROI ZULO |
| G002 | 90 | MANTTONI TXIKI | G022 | 143 | TXALAKA |
| G002 | 104 | MUA SAGARRA | G023 | 21 | ARISTEGI |
| G002 | 107 | MUNTO (AÑUA) | G023 | 124 | PELESTINA OSA |
| G003 | 47 | BUZTIN SAGARRA | G023 | 157 | URDIN |
| G003 | 140 | SAN PRAISKU | G024 | 52 | ENTZEA |
| G004 | 27 | AZAL LORIXA | G024 | 56 | EZTIKA |
| G004 | 164 | VERDE AGRIA | G025 | 26 | ATSO |
| G005 | 55 | ERROTA BERRI | G025 | 130 | PUTZUETA |
| G005 | 88 | MANTTONI | G026 | 54 | ERREGES SAGARRA |
| G006 | 78 | GORRI TXIKIA | G026 | 95 | MENDIOLA SAGARRA |
| G006 | 82 | HORRI ZARRATUE | G026 | 152 | UDARE SAGARRA |
| G007 | 1 | ABALEGI | G027 | 33 | BENTA ZAHARRA |
| G007 | 23 | ARTAMUGARRI | G027 | 57 | FRANTZES MIKATZA |
| G008 | 96 | MERABI | G027 | 75 | GOIKOETXE |
| G008 | 101 | MOKO | G028 | 66 | GAZILOKA |
| G009 | 10 | ANDOAIN | G028 | 153 | UDARE TXURIA |
| G009 | 50 | EMBOTELLA | G029 | 15 | AÑARREGIKO GAZI GOZOA |
| G009 | 89 | MANTTONI 035 | G029 | 29 | AZPEITI |
| G010 | 13 | ANIXA | G030 | 122 | PEASA |
| G010 | 150 | UBARRE | G030 | 123 | PEATXA |
| G011 | 99 | MIKATZA | G030 | 131 | REINETA PARDA |
| G011 | 110 | MUXU ZABALA | G030 | 151 | UDARE MARROI |
| G012 | 187 | BURNI | G030 | 154 | UDARRE |
| G012 | 45 | BURNI AITOR | G031 | 8 | AMA BIRJIÑA |
| G012 | 46 | BURNI OSA | G031 | 20 | ARIMASAGASTI |
| G013 | 44 | BURGO OSA | G031 | 125 | PELESTINA OTALARREA |
| G013 | 43 | BURGO ZALLA | G032 | 116 | OSTRO BELTZA (ARIZMENDI) |
| G014 | 135 | SAGAR GORRI | G032 | 121 | PATZOLUA |
| G014 | 144 | TXARBIA | G033 | 5 | ALE HANDI |
| G014 | 145 | TXISTU SAGARRA | G033 | 73 | GEZAMINA |
| G015 | 28 | AZELAIN | G033 | 103 | MOZOLUA |
| G015 | 91 | MANTTONI ZAHAR | G033 | 133 | SABE |
| G015 | 179 | NK173 | G034 | 25 | ASTARBE |
| G015 | 182 | SAN INAZIO (URKIZU) | G034 | 61 | GAZI HANDI |
| G016 | 62 | GAZI ZURI (AZKETA ERROTA) | G034 | 161 | URTEBI BELTZA |
| G016 | 168 | GAZI ZURI (AZKETA ERROTA) | G034 | 162 | URTEBI HAUNDI |
| G016 | 63 | GAZI ZURI (GAZTELU) | G035 | 4 | ALDAKO |
| G016 | 149 | TXURTEN LUZE | G035 | 48 | DONOSTI |
| G017 | 9 | ANBU | G035 | 120 | PATZOLU GORRIA |
| G017 | 31 | BEGI ZABALA (ARIZMENDI) | G036 | 2 | AGERREBURU |
| G017 | 172 | BEGI ZABALA (ARRATOLA) | G036 | 176 | AGERREBURU (ARIZMENDI) |
| G017 | 119 | PALAZIO | G036 | 68 | GEZA BELTZA |
| G018 | 59 | GABIRIERROTA | G036 | 69 | GEZA BELTZA (AZKETA) |
| G018 | 80 | HARITZA | G036 | 137 | SALTXIPI |
| G018 | 186 | MANTEROLA | G037 | 111 | NAPAR HAUNDI |
| G018 | 115 | ONDO MOTZA | G037 | 128 | PIKU |
| G019 | 35 | BERAUN | G037 | 155 | UGARTE |
| G019 | 100 | MK GORRIA | G038 | 170 | BEGI ZABALA (ARIZMENDI) |
| G019 | 141 | SANTA ANA | G038 | 146 | TXORI |
| G019 | 147 | TXORIXE SAGARRA | G039 | 166 | LIBRA OTALARREA |
| G020 | 6 | ALPERRO | G039 | 173 | LIBRA OTALARREA |
| G020 | 74 | GOIKO GORRI | | | |
| G020 | 105 | MUNIELA | | | |
| G020 | 106 | MUNIOLA | | | |

Tabla 3. Listado de accesiones con genotipo único (que sólo se ha encontrado en esa accesión).

| Grupo genético | ID | Variedad | Grupo genético | ID | Variedad |
|----------------|----|--------------------|----------------|-----|-------------------------|
| G040 | 3 | AIA SAGARRA | G078 | 98 | MIKATZ GORRIA |
| G041 | 7 | ALTZA | G079 | 102 | MOKOTE |
| G042 | 11 | ANDOAIN BERDEA | G080 | 108 | MURGIL |
| G043 | 12 | ANDRE | G081 | 112 | NARBARTE |
| G044 | 14 | AÑARREGI | G082 | 113 | ODIXA |
| G045 | 16 | AÑARREGIKO MIKATZA | G083 | 114 | OIARTZUN |
| G046 | 18 | ARANZATE | G084 | 117 | OSTRO BELTZA (ARRATOLA) |
| G047 | 19 | ARGENTINA | G085 | 118 | PALANKAIA |
| G048 | 24 | ASPURU SAGARRA | G086 | 126 | PERRAN SAGARRA |
| G049 | 30 | AZPURU GARRATZA | G087 | 127 | PIKE |
| G050 | 32 | BELTZA | G088 | 129 | POTROKILLO |
| G051 | 34 | BERANDU ERREINETA | G089 | 132 | ROJA TEMPRANA |
| G052 | 36 | BERDEA | G090 | 134 | SAGAR BELTZA |
| G053 | 38 | BERRONDO | G091 | 136 | SAGASTUME |
| G054 | 39 | BILLAFRANKIE | G092 | 138 | SAN JUAN |
| G055 | 40 | BIZKAI SAGARRA | G093 | 139 | SAN PEDRO |
| G056 | 41 | BOST KANTOI | G094 | 142 | TELLERI |
| G057 | 42 | BULANOA | G095 | 148 | TXURI TXIKIXE |
| G058 | 49 | ELORRABI | G096 | 156 | URDAN ITURRI |
| G059 | 51 | ENPAN | G097 | 158 | URKI |
| G060 | 53 | ERI SAGARRA | G098 | 159 | URRE SAGARRA |
| G061 | 58 | FRANTZES MINA | G099 | 160 | URTEBETE |
| G062 | 60 | GALDOTZA (GAZTELU) | G100 | 163 | URTEBI TXIKI |
| G063 | 64 | GAZIA | G101 | 165 | ZUAZNABAR |
| G064 | 65 | GAZIGORRI | G102 | 169 | ZABALEGI 2 |
| G065 | 71 | GEZA MIN GORRIA | G103 | 174 | MIKATZA GORRI 2 |
| G066 | 72 | GEZA ZURI | G104 | 175 | DOMINIXIE |
| G067 | 76 | GORDIN TXURI | G105 | 177 | SOLOKO URDINA |
| G068 | 77 | GORRI GARRATZA | G106 | 178 | SANTIAGO ZURI (URKIZU) |
| G069 | 79 | GORRI TXIKIA (1) | G107 | 180 | AZAOLA |
| G070 | 81 | HARITZA BERDEA | G108 | 181 | SANTIAGO GORRI (URKIZU) |
| G071 | 83 | LASTUR | G109 | 183 | NK-175 |
| G072 | 84 | LIBRA "OSA" | G110 | 184 | ZUBIETA |
| G073 | 85 | LIMOI | G111 | 185 | LUMANE |
| G074 | 86 | LUBERRI | G112 | 188 | KANPANDOJA (OLA) |
| G075 | 92 | MANZANA PERA | *** | 37 | BERGARAKO FRAILEA |
| G076 | 93 | MARTIKU | *** | 67 | GEZA |
| G077 | 94 | MAXIMELA | *** | 167 | GAZI ZURI GAZTELU |