

INFORME DE RESULTADOS del:

Contrato de investigación entre el CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN (CITA) y COMERCIALIZADORA ZIMEX ITDA. para la ejecución del proyecto “Ensayo de polinización con polen puro en plantación de cerezo en Albalate de Cinca (Aragón, España)”.

Introducción:

A petición de la empresa Comercializadora Zimex Itda., y con el fin de mejorar el cuajado de fruto mediante una mejora de la polinización, este estudio se llevó a cabo para evaluar la efectividad de la polinización asistida en árboles de cerezo en la zona de Albalate de Cinca en Aragón, España. Para ello se realiza la aplicación de polen externo (proporcionado por Comercializadora Zimex Itda.) de manera asistida, como una alternativa natural para disminuir y controlar los problemas de polinización y mejorar el cuajado en una parcela de la empresa Luxury Fruit. Para ello, en este estudio se evaluó la mejora en el cuajado de cerezo mediante la aplicación de polen de variedades polinizadoras compatibles con las variedades en la plantación a analizar. Este polen fue colocado en la piquera (puerta) de la colmena de abejas durante el período de floración y se evaluó el cuajado de árboles seleccionados después de este tratamiento y se comparó su cuajado con el de árboles sin el tratamiento. Se realizó un análisis de la calidad de la fruta en ambos tipos de árboles. Además, se realizó un ensayo de la viabilidad y fertilidad del polen recibido, que fue comparado con el polen de los árboles en la misma parcela y con un polen control, con el fin de evaluar su calidad.

1. Ensayo de cuajado

Datos del ensayo:

Cultivo: cerezo. Variedad: Brooks (S_1S_9)

Localización parcela de ensayo (Fig. 1): Albalate de Cinca, Huesca, España

Método: Conteo de flores de 8 árboles por tratamiento (Fig. 1) el día de aplicación del polen, secciones marcadas de 4 ramas por árbol (Rama 1: Este; Rama 2: Sur; Rama 3: Oeste; Rama 4: Norte) y posterior conteo de frutos (cuajado) a los 30 y 50 días en las mismas secciones marcadas. Distancia aproximada a las colmenas 20-30 metros.

Tratamientos (Fig. 1):

CP: Con Polen Zimex (50 gr de Polen puro de cerezo + 100 gr de Carrier nutricional Vericet para 1 hectárea de tratamiento) añadido a las colmenas (3 gr) realizado por agricultor. Las aplicaciones se realizaron 2 veces/día (am y pm) durante 5 días de floración (entre 30 y 80%) en 5 colmenas. Polen variedad 'Lapins' según se indica en el envase (S_1S_4 , compatible con la variedad cultivada).

SP: Sin Polen añadido a las colmenas.

Figura 1: Croquis ensayo de cuajado en foto parcela.



Amarillo: Colmenas. Flecha roja: apertura colmenas. CP: Tratamiento con polen añadido. SP: Tratamiento sin polen añadido. Números rojos: Situación aproximada y numeración de árboles utilizados para el ensayo.

Resultados:

Cuajado intermedio (30 días después de la floración):

Se analizó el cuajado a 30 días con el fin de realizar una evaluación intermedia del proceso de cuajado en el ensayo. El cuajado final en cerezo se establece aproximadamente entre la cuarta y quinta semana después de la floración (dependiendo de la variedad y de las condiciones ambientales). A los 30 días, por tanto, el cuajado existente será cercano al cuajado final, pero es posible que aun no esté estabilizado y que posteriormente todavía se produzca una caída de fruta fisiológica.

El cuajado a 30 días para el tratamiento CP fue del 41%, mientras que el cuajado total en el tratamiento SP fue del 35% (Tabla 6, 6a), por tanto, hubo una diferencia del 6% entre tratamientos 30 días después de la floración, esta **diferencia fue mayor en el cuajado intermedio que en el cuajado final**. El análisis estadístico de los datos reveló que, a los 30 días, el cuajado por rama fue significativamente mayor en el tratamiento CP que en el tratamiento SP (7 % superior), pero cuando se analizó el cuajado por árbol esta diferencia no fue significativa (Tabla 7).

Cuajado final (50 días después de la floración)

El cuajado total final para el tratamiento CP fue del 35%, mientras que el cuajado total en el tratamiento SP fue del 31% a los 50 días de cuajado (Tabla 6).

Estos valores, fueron menores que el cuajado a 30 días en ambos tratamientos (6% y 4% menor en los tratamientos CP y SP, respectivamente), indicando que posiblemente a los 30 días el cuajado aun no era definitivo y entre ambos conteos se produjo la caída de frutos que indican los datos en ambos tiempos.

El **rango de cuajado por árbol** en tratamiento CP fue de 22 a 41%, mientras el rango de cuajado en los árboles SP fue del 19 al 45%, siendo ambos rangos muy similares, pero los datos fueron más dispersos en los árboles del tratamiento SP (Tabla 6, Tabla 7). **Estos rangos de cuajado son normales en cerezo.** Sin embargo, el rango de **cuajado por rama** fue de 15 a 72 % en el tratamiento CP, mientras que en arboles SP fue de 4 a 46%, siendo por tanto más amplio en el tratamiento CP. Un cuajado menor al 5% se considera anómalo, por lo que la rama 2 del árbol 15 puede haber sufrido error experimental (error en conteos, poda entre conteos o enfermedad de la rama), debido a su bajo cuajado (4%). A pesar de ello el dato no se eliminó del análisis.

Aunque el cuajado total en los árboles del tratamiento CP, con polen añadido, fue un 4% mayor que en el tratamiento SP sin polen, **no se identificaron diferencias significativas en las medias de cuajado por árbol (35 y 31%, CP y SP, respectivamente), ni en las medias de cuajado por rama (36 y 31 %, CP y SP, respectivamente) entre los dos tratamientos (Tabla 7).**

Distancia entre colmenas

La **distancia entre las colmenas** de ambos tratamientos es de poco más de 200 metros (Fig. 1) lo que podría confundir los resultados al ser necesarios mínimo 200 entre tratamientos. Pero cuando comparamos el cuajado solo de los árboles más alejados en las filas 1 y 2 (CP, arboles 1, 2, 3 y 4) y en las filas 7 y 8 (SP, arboles 13, 14, 15, 16) **la diferencia en el cuajado final medio de esos árboles es solo del 2%** (33 y 31 %, respectivamente para cada tratamiento, CP y SP) (Tabla 6 y 6b). En el **cuajado intermedio la diferencia es del 9%** con un cuajado del 45% en tratamiento CP y del 36% SP, pero tampoco se identificaron diferencias significativas entre tratamientos analizando el cuajado por rama y por árbol (Tabla 7).

Tabla 2: Conteo de flores (27/03/2025):

Tratamiento	Árbol	No. flores/ Rama 1	No. Flores/ Rama 2	No. Flores/ Rama 3	No. Flores/ Rama 4	No. Flores/ Árbol
CP	1	355	174	217	212	958
CP	2	56	92	226	212	586
CP	3	311	159	171	121	762
CP	4	275	265	316	95	951
CP	5	288	143	137	188	756
CP	6	348	130	130	267	875
CP	7	139	252	345	232	968
CP	8	129	245	352	210	936
Total CP						6792
SP	9	303	162	163	158	786
SP	10	332	166	216	272	986
SP	11	83	100	178	154	515
SP	12	170	259	220	221	870
SP	13	304	146	212	159	821
SP	14	197	83	302	237	819
SP	15	110	344	94	124	672
SP	16	128	136	201	163	628
Total SP						6097

Tabla 3: Conteo de cuajado, a los 30 días (25/04/2025):

Tratamiento	Árbol	No. Frutos/ Rama 1	No. Frutos/ Rama 2	No. Frutos/ Rama 3	No. Frutos/ Rama 4	No. Frutos/ Árbol
CP	1	56	42	92	74	264
	2	16	58	107	82	263
	3	85	38	102	60	285
	4	116	94	147	41	398
	5	148	22	73	94	337
	6	169	71	55	120	415
	7	90	114	160	92	456
	8	18*	136	59	125	338
Total CP						2756
SP	9	130	61	72	64	326
	10	84	53	63	135	335
	11	26	33	39	89	187
	12	54	71	21	69	215
	13	118	8*	146	76	348
	14	62	8	124	49	243
	15	15	35*	24	34	108
	16	64	73	71	66	274
Total SP						2037

Tabla 4: Conteo de cuajado final, a los 50 días (22/05/2025):

Tratamiento	Árbol	No. Frutos/ Rama 1	No. Frutos/ Rama 2	No. Frutos/ Rama 3	No. Frutos/ Rama 4	No. Frutos/ Árbol
CP	1	57	39	60	57	213
	2	14	61	81	65	221
	3	84	42	108	43	277
	4	117	88	108	27	340
	5	114	22	73	69	278
	6	74	70	52	113	309
	7	78	112	81	61	332
	8	17*	128	53	151	349
Total CP						2319
SP	9	136	60	66	55	317
	10	83	47	43	109	282
	11	26	38	42	60	166
	12	53	67	10	67	197
	13	122	8*	93	44	267
	14	65	3	67	52	187
	15	9	26*	19	33	87
	16	58	61	92	74	285
Total SP						1788

*: Datos eliminados en la estimación de cuajado final por encontrarse la rama podada en el conteo final

Tabla 5: Porcentaje de cuajado final, a los 30 días (25/04/2025):

Tratamiento	Árbol	Cuajado/ Rama 1	Cuajado/ Rama 2	Cuajado/ Rama 3	Cuajado/ Rama 4	Cuajado/ Árbol
CP	1	16%	24%	42%	35%	27%
CP	2	29%	63%	47%	38%	45%
CP	3	27%	24%	59%	49%	37%
CP	4	42%	35%	46%	43%	42%
CP	5	51%	15%	53%	50%	45%
CP	6	48%	54%	42%	45%	47%
CP	7	65%	45%	46%	39%	47%
CP	8	*	56%	17%	59%	40%
Total CP						41%
SP	9	43%	37%	44%	41%	42%
SP	10	25%	32%	29%	50%	34%
SP	11	31%	33%	22%	57%	36%
SP	12	31%	27%	9%	31%	25%
SP	13	39%	*	69%	48%	50%
SP	14	31%	10%	41%	20%	30%
SP	15	14%	*	26%	27%	22%
SP	16	50%	54%	35%	40%	44%
Total SP						35%

*: Sin dato= Datos eliminados por encontrarse la rama podada en el conteo.

Tabla 6: Porcentaje de cuajado final, a los 50 días (22/05/2025):

Tratamiento	Árbol	Cuajado/ Rama 1	Cuajado/ Rama 2	Cuajado/ Rama 3	Cuajado/ Rama 4	Cuajado/ Árbol
CP	1	16%	22%	28%	27%	22%
CP	2	25%	66%	36%	31%	38%
CP	3	27%	26%	63%	36%	36%
CP	4	43%	33%	34%	28%	36%
CP	5	40%	15%	53%	37%	37%
CP	6	21%	54%	40%	42%	35%
CP	7	56%	44%	23%	26%	34%
CP	8	*	52%	15%	72%	41%
Total CP						35%
SP	9	45%	37%	40%	35%	40%
SP	10	25%	28%	20%	40%	29%
SP	11	31%	38%	24%	39%	32%
SP	12	31%	26%	5%	30%	23%
SP	13	40%	*	44%	28%	38%
SP	14	33%	4%	22%	22%	23%
SP	15	8%	*	20%	27%	19%
SP	16	45%	45%	46%	45%	45%
Total SP						31%

*: Sin dato= Datos eliminados por encontrarse la rama podada en el conteo final.

Tabla 6b: Resumen cuajado total por tratamiento a 30 y 50 días de cuajado

TRATAMIENTO	% CUAJADO		% CUAJADO	
	total 30 DIAS	total 50 DIAS	total 30 DIAS	total 50 DIAS
CP	41 %	35 %		
SP	35 %	31%		
INCREMENTO CUAJADO CP	6%	4%		

Tabla 7: Estadística de cuajado por rama y por árbol

a) Cujado por rama

	DDF	N	Cujado medio	DE	Min	Max	W (p)	F (p)	T (p)	U (p)
CP	30	31	42%	14%	15%	65%	0.24 ns			
SP	30	30	35%	14%	9%	69%	0.90 ns	0.96 ns	0.04*	
CP	50	31	36%	15%	15%	72%	0.11 ns			
SP	50	30	31%	12%	4%	46%	0.04*	0.23 ns	0.11 ns	0.35 ns

b) Cujado por árbol

	DDF	N	Cujado medio	DE	Min	Max	W (p)	F (p)	T (p)	U (p)
CP	30	8	41%	7%	27%	47%	0.07 ns			
SP	30	8	35%	10%	22%	50%	0.93 ns	0.28 ns	0.18 ns	
CP	50	8	35%	6%	22%	56%	0.02*			
SP	50	8	31%	9%	19%	45%	0.69 ns	0.07 ns	0.11 ns	0.53 ns

c) Cujado por rama en arboles más alejados (CP: 1, 2, 3, 4; SP: 13, 14, 15, 16)

	DDF	N	Cujado medio	DE	Min	Max	W (p)	F (p)	T (p)	U (p)
CP	30	16	39%	13%	16%	63%	0.94 ns			
SP	30	14	36%	16%	10%	69%	0.99 ns	0.42 ns	0.62 ns	
CP	50	16	34%	14%	16%	66%	0.006**			
SP	50	14	31%	14%	4%	46%	0.46	0.38 ns	0.54 ns	0.90 ns

d) Cujado por árbol en arboles más alejados (CP: 1, 2, 3, 4; SP: 13, 14, 15, 16)

	DDF	N	Cujado medio	DE	Min	Max	W (p)	F (p)	T (p)	U (p)
CP	30	4	38%	8%	27%	45%	0.61 ns			
SP	30	4	36%	12%	22%	50%	0.70 ns	0.18 ns	0.87 ns	
CP	50	4	33%	7%	22%	38%	0.03*			
SP	50	4	31%	12%	19%	45%	0.51 ns	0.15 ns	0.53 ns	1.00 ns

DDF: Días después de floración. DE: Desviación estándar.

W: Normalidad (Shapiro-Wilk). F: Homogeneidad de varianzas (Levene). t: Comparación de medias (t de Student) U: Comparación de medias (Mann-Whitney).

p: p-valor. ns: no significativo; *: significativo al 0.05; **: significativo al 0.01

2. Ensayo viabilidad de polen

Datos del ensayo:

Se investigó la viabilidad del polen en tres muestras de polen:

Polen Zimex: polen añadido a las colmenas. Polen proporcionado por la empresa Zimex al agricultor y posteriormente por este al equipo investigador en el último día de conteo (22/05/25). El polen fue entregado al equipo investigador en su mismo envase y este fue trasladado hasta el laboratorio en hielo seco, posteriormente fue conservado a -20°C hasta su utilización.



Polen parcela: Muestra polen extraída de flores recogidas en el campo objeto de ensayo el día del primer conteo (27/3/25). Para esta muestra se recogieron flores en estado de botón globoso y abiertas. De vuelta al laboratorio, se separaron las anteras que fueron conservadas a -20°C en recipientes de cristal herméticamente cerrados hasta su utilización.

Polen control: Muestra de polen recogida de una variedad de la colección de cerezo del CITA en el año 2023. Para esta muestra se recogieron flores en estado de botón globoso. De vuelta al laboratorio, se separaron las anteras de sus filamentos y se dejaron secar sobre papel a temperatura ambiente durante 24 h lo que provoca su dehiscencia. Mediante una malla de $0,26\text{ mm}^2$ se coló el polen utilizando un pincel fino y se congeló a -20°C en recipientes de cristal herméticamente cerrados hasta su posterior utilización.

Viabilidad y fertilidad del polen:

Se utilizaron dos técnicas complementarias de evaluación de viabilidad y fertilidad: a) la técnica de tinción Alexander que permite analizar el nivel de aborto en polen maduro y b) la germinación *in vitro* de polen que permite evaluar el grado de fertilidad del polen. Para la tinción Alexander se siguió el protocolo descrito en *Hedhly A. et al. "Whole-mount clearing and staining of Arabidopsis flower organs and siliques" Journal of Visualized Experiments: Jove 134 (2018): 56441*. Para la

germinación *in vitro* de polen se siguió el protocolo descrito en: *Hedhly A. et al. "Influence of genotype-temperature interaction on pollen performance" Journal of evolutionary biology 18.6 (2005): 1494-1502.*

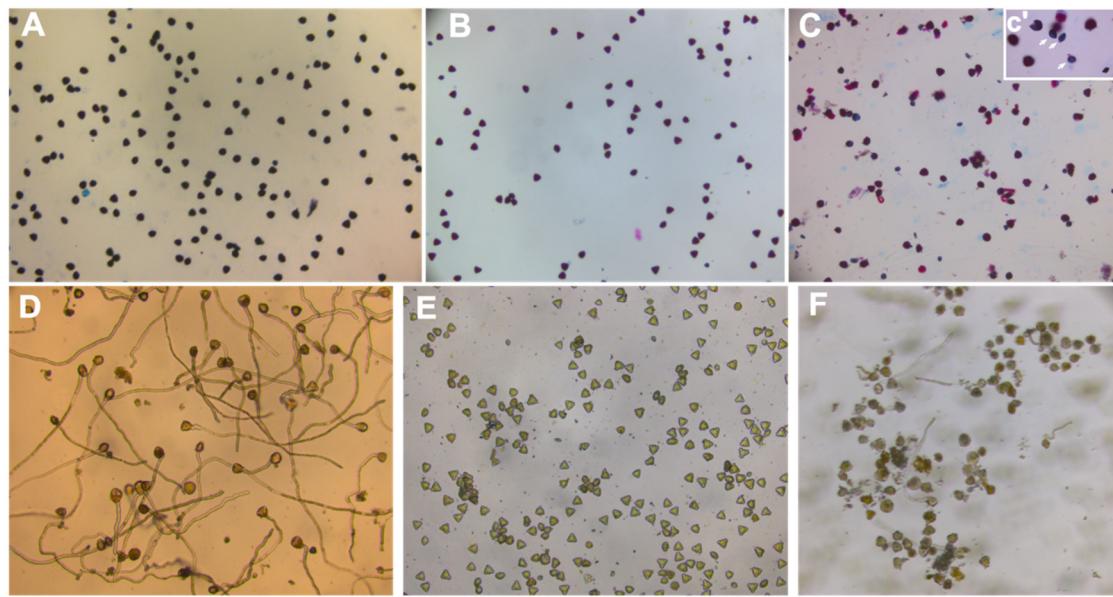
Resultados:

El análisis de viabilidad de polen por el método de tinción Alexander **reveló una viabilidad celular alta (79%) en el polen Zimex, aunque esta fue significativamente menor que en polen parcela (96%) y polen control (97%;** Tabla 6). El análisis microscópico revela que esa baja viabilidad puede explicarse por la mayor presencia de polen degenerado, es decir polen de tamaño más pequeño, de forma irregular y color verde a azul (Figura 2. A, B, C, c'). La diferencia entre pólenes se vio más significativamente acentuada en la evaluación de la fertilidad de polen. Dos muestras de polen, polen parcela y polen Zimex, presentaron una germinación anormalmente baja, **ausencia de germinación (polen parcela), germinación media 5% (granos germinados) en el polen Zimex, y una fertilidad adecuada con una media del 56% en el polen control** (Tabla 6; Figura 2. C-D). La observación microscópica reveló que la baja fertilidad correspondería tanto a polen degenerado como a polen con una viabilidad celular aparentemente buena (Figura 2).

Tabla 8: Viabilidad y fertilidad del polen

	Muestra control	Muestra parcela	Muestra Zimex
<i>Viabilidad de polen</i>			
Replica 1	98%	96%	82%
Replica 2	96%	95%	80%
Replica 3	96%	96%	75%
Promedio	97%	96%	79%
<i>t.test</i>		** p = 0.008	
<i>Fertilidad de polen</i>			
Replica 1	57%	0%	5%
Replica 2	58%	0%	2%
Replica 3	55%	0%	8%
Promedio	56%	0%	5%
<i>t.test</i>		* p = 0.0001	

Figura 2: Viabilidad y fertilidad de polen. Viabilidad de polen por tinción Alexander en las muestras de polen control (A), parcela (B) y Zimex (C-c'). Ejemplo polen degenerado indicado con flechas blancas (c'). Fertilidad de polen por germinación in vitro de muestras de polen control (D), parcela (E) y Zimex (F). Se observa baja viabilidad en C, y baja germinación en E y F.



3. Calidad de fruto

Se mezclaron los frutos de los árboles del tratamiento CP y del tratamiento SP y se seleccionaron aleatoriamente 40 frutos de cada tratamiento, que fueron analizados en dos lotes de 20 frutos. Para estos se analizaron el calibre, peso y color.

Resultados: Los frutos presentaban un estado de maduración similar en ambos tratamientos, habiendo una amplia variabilidad en su estado ya que se observaron frutos de color amarillo a rojo oscuro, pasando por rosa y rojo, lo que reflejaba falta de maduración para cosecha. El tamaño osciló entre los 7 y 8 gramos por fruto, siendo su calibre de 26 a 28 mm en ambos tratamientos.

Tabla 9: Parámetros evaluados calidad de fruto (22/5/25/; 20 frutos/lote)

Tratamiento	Lote	Peso medio fruto(gr)	Rango calibre (mm)	Firmeza	Rango Color
CP	Lote 1	8,4	26-28	Media	Amarillo - Rojo
CP	Lote 2	7,5	26-28	Media	Rosa - Rojo
SP	Lote 1	8,6	26-28	Media	Rosa - Rojo
SP	Lote 2	8,3	26-28	Media	Rosa - Rojo

Figura 3: Frutos a 50 días, conteo final (22/05/2025) de ambos tratamientos



4. Conclusiones

En el ensayo de cuajado se observó un cuajado mayor cuando se realizó el tratamiento con polen añadido. Aunque estas diferencias no fueron significativas en el cuajado final si se detectó una diferencia significativa en el cuajado intermedio entre ambos tratamientos, siendo el cuajado para el tratamiento con polen añadido un 6% superior al tratamiento sin polen. Este resultado no se considera concluyente, ya que el cuajado final podía no estar establecido en el momento del conteo del cuajado intermedio. Para concretar este resultado se recomienda repetir el ensayo realizando el conteo intermedio una vez el cuajado final ha sido establecido y si es posible utilizando árboles más separados entre tratamientos.

En el ensayo de viabilidad y fertilidad de polen, el polen proporcionado por la empresa y añadido a las colmenas presentó una pequeña proporción de polen degenerado y una muy baja fertilidad. Asimismo, el polen recogido en la parcela mostró una fertilidad nula a pesar de su aparente alta viabilidad celular. La baja fertilidad tanto del polen suministrado por la empresa como del polen recolectado en la parcela puede explicarse por un fallo desconocido en la cadena de frío desde el momento de la recolección del polen en el campo hasta la prueba de fertilidad. Pero además el polen de la empresa presentaba una baja viabilidad que puede deberse a factores adicionales del manejo o método de recolección. La baja fertilidad del polen suministrado por la empresa puede ser la causa de la ineficacia del tratamiento para mejorar el cuajado, pero solo un ensayo con polen viable podría aclarar esta hipótesis. Para reducir la proporción de polen degenerado se recomienda evaluar este parámetro en la variedad (o las variedades) de las cuales se cosecha el polen con el fin de identificar las variedades con menores proporciones de polen degenerado. Además, es esencial mantener la cadena de frío (conservación a -20°C hasta el día de tratamiento, reduciendo al máximo variaciones de temperatura) para mantener la calidad del polen. Se recomienda la puesta a punto y adopción de un método sencillo y práctico de evaluación de la fertilidad (germinación in vitro) que se aplicaría de una manera rutinaria y frecuente con el objetivo de identificar y descartar lotes de baja fertilidad. Se recomienda establecer puntos cardinales de evaluación de fertilidad desde el momento de cosecha de polen hasta el tratamiento. Este grupo de investigación, experto en biología reproductiva y de polen, puede colaborar como asesor en este proceso.

El análisis de la calidad de fruta no reveló diferencias entre los tratamientos, se observó que el fruto aún no había alcanzado su maduración completa en el momento del conteo, aunque este hecho no tiene influencia en el ensayo de cuajado, ya que el cuajado estaba bien establecido en el momento del conteo. Al ser el cuajado similar en ambos tratamientos este no afectó a la calidad de fruto.

Zaragoza, a fecha de firma electrónica.

Ana Wünsch
Investigadora
CITA de Aragón
Zaragoza (España)

Afif Hedhly
Investigador
ARAID, EEAD CSIC
Zaragoza (España)