



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Agronomía - Programa de Magíster en Ciencias Agronómicas

Efectividad de la aplicación de un agente crioprotector en el control del daño por heladas en cerezo (*Prunus avium* L.)

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agronómicas con Mención en Producción y Protección Vegetal

MIGUEL IGNACIO VALENZUELA VILLAR

CHILLÁN-CHILE

2019

Profesor Guía: Richard Bastías Ibarra
Dpto. de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción



Efectividad de la aplicación de un agente crioprotector en el control del daño por heladas en cerezo (*Prunus avium* L.)

Aprobada por:

Richard Bastías Ibarra

Ing. Agrónomo, Mg. Hort. Ph. D.

Profesor Guía

Victor Finot Saldías

Lic. Biología, Dr.

Evaluador Interno

Saddys Rodríguez Llamazares

Lic. Química, Dr.



Evaluador Externo

Macarena Gerding González

Ing. Agrónomo, Ph. D.

Directora de Programa

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado gracias al apoyo financiero del Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDEF N°ID16110425

Agradezco al Centro de Investigación en Polímeros Avanzados (CIPA), CONICYT Regional, GORE BIO BIO, R17A10003 y a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Concepción, principalmente al equipo de Fruticultura por su apoyo y aprendizaje brindado durante el proceso de formación.



DEDICATORIA

Este logro profesional, se lo dedico a Dios por darme la dicha de tener vida y la mejor Familia.

Mis más sinceros agradecimientos y dedicación a mi querida Familia, principalmente a mi mamita y tía que siguen apoyándome desde el cielo y también a mi mamá, papá, hermana, polola cuñado y suegros, por siempre estar presente en los buenos y malos momentos. Muchas gracias por su ayuda, apoyo y preocupación incondicional en la toma de decisiones del ámbito personal y profesional, especialmente este logro se lo dedico a mi **“mamá”** por la entrega, alegría, paz y amor que me ha entregado durante mi vida.

Es importante destacar que todos ustedes han logrado llegar a la meta debido a que son el pilar fundamental de mi vida



TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Índice de Figuras y Tablas	vi
Capítulo 1	
Introducción.....	1
Hipótesis.....	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
Literatura citada	7
Capítulo 2	
PVA, como herramienta para prevenir el daño por heladas en yemas florales del cerezo	
Resumen.....	11
Abstract.....	12
Introducción.....	13
Materiales y métodos.....	15
Resultados.....	19
Discusión.....	29
Conclusiones.....	31
Agradecimientos.....	31
Literatura citada.....	32
Capítulo 3. Conclusiones generales.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Páginas
Figura 1 Apariencia visual de dardos florales de cerezo instalados en orificios de bandeja de almaciguera con algodón hidrófilo durante los estados fenológicos de yema en receso (A), yema hinchada (B) y brotación (C).....	16
Figura 2 Apariencia visual de primordios florales en yemas del cerezo antes (A) y después (B) de la exposición a un evento de helada	17
Figura 3 Influencia de diferentes formulaciones en base a PVA sobre la cantidad de primordios florales dañados (nº) para las siguientes condiciones cultivar/cianamida: Sweetheart C/CH (A); Sweetheart S/CH (B); Lapins C/CH (C); Lapins S/CH (D); Regina C/CH (E) y Regina S/CH (F). Temporada 2017-2018.....	20
Figura 4 Influencia de diferentes formulaciones en base a PVA sobre la cantidad de primordios florales dañados (nº) para las siguientes condiciones cultivar/cianamida: Sweetheart C/CH (A); Sweetheart S/CH (B); Lapins C/CH (C); Lapins S/CH (D); Regina C/CH (E) y Regina S/CH (F). Temporada 2018-2019.....	21
Figura 5 Temperatura mínima diaria en los huertos de los cultivares Sweetheart, Lapins y Regina. Temporadas 2017- 2018 y 2018-2019.....	22
Figura 6 Influencia de diferentes formulaciones en base a PVA sobre el promedio de primordios florales dañados (nº) en dardos del cultivar Sweetheart expuestos durante 4 horas a -5°C	23

Tabla 1	Influencia de diferentes formulaciones de PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Lapins' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2017-2018.....	24
Tabla 2	Influencia de diferentes formulaciones de PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Lapins' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2018-2019.....	25
Tabla 3	Influencia de diferentes formulaciones de PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Sweetheart' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2017-2018.....	26
Tabla 4	Influencia de diferentes formulaciones de PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Sweetheart' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2018-2019.....	27
Tabla 5	Influencia de diferentes formulaciones de PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Regina' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2018-2019.....	28

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El cultivo del cerezo, se ha transformado en una de las alternativas productivas de mayor rentabilidad económica para los productores de frutas en Chile, alcanzando en la actualidad 30.179 hectáreas plantadas con esta especie frutal (ODEPA, 2019). El clima donde se cultiva el cerezo en nuestro país es muy variable, desde el clima desértico subtropical marino por el norte hasta un clima marino fresco por el sur, y con mayor predominancia es el clima del tipo mediterráneo templado (Novoa y Villaseca, 1989). En este tipo de clima es donde se ubican las zonas de mayor producción de cerezas en Chile y que abarcan las regiones de O'Higgins y Maule, con más del 82% de la superficie de cerezas del país (ODEPA, 2019).

En la actualidad la producción de cerezas se ve fuertemente amenazada por una serie de problemas derivados del calentamiento global, principalmente por las condiciones climáticas cada vez más adversas para el desarrollo productivo de este cultivo frutal. Durante la primavera las condiciones extremas de temperatura, lluvias y viento alteran los procesos de floración, germinación de polen, crecimiento del tubo polínico, receptividad del estigma y longevidad del óvulo, con efectos negativos en el rendimiento (Hedhly et al., 2003; Hedhly et al., 2004). Además, las altas temperaturas de verano alteran la diferenciación floral con el consecuente desarrollo anormal de pistilos y formación de frutos dobles (Beppu y Kataoka, 2011). Por otra parte, la alta incidencia de lluvias primaverales, inducen daño por partidura de frutos al momento de la cosecha (Simon, 2006), siendo uno de los problemas productivos de la cereza más difícil de manejar bajo las condiciones climáticas de Chile (Bastías et al., 2015).

Asimismo, debido al calentamiento global, se ha acentuado la escasez de frío durante el invierno, condición esencial para un buen desarrollo de las yemas durante y a salidas del receso invernal (Luedeling, 2012). En especies como el cerezo se ha reportado que la baja acumulación de frío durante el invierno, reduce la producción de frutos, debido a la floración retrasada y errática, la abscisión de algunos órganos florales y vegetativos y la falta de sincronización entre la floración y polinización del cultivar comercial con su respectivo polinizante (Thompson, 1996), así como también una baja producción de polen y malformaciones de los pistilos, las cuales limitan la posibilidades de fecundación de los frutos (Oukabli y Mahhou, 2007). De esta manera para obtener una brotación y floración normal por parte de las yemas del cerezo, es

necesario una adecuada acumulación de frío invernal, seguido de temperaturas cálidas para estimular el crecimiento y desarrollo de los órganos florales (Thompson, 1996). En general el requerimiento de frío para el cerezo fluctúa entre 750 y 1400 horas de acumulación bajo 7°C (Seif y Gruppe, 1985), y el que varía ampliamente dependiendo del cultivar (Albuquerque et al., 2008). Aun cuando especies de árboles caducifolios como el cerezo están adaptados genéticamente a la acumulación de frío para romper el receso invernal (Lang et al., 1987), la presencia de heladas con temperaturas bajo 0°C a inicio de primavera o finales de invierno, puede causar efectos adversos en la producción por lesiones en los tejidos de brotes, flores y frutos (Salazar-Gutiérrez et al. 2014).

Existen antecedentes que el fenómeno de cambio climático podría estar provocando primaveras con mayores fluctuaciones térmicas, dando como resultado, alteraciones fenológicas, tales como un adelanto en las fechas de floración, lo que posiblemente puede llevar a mayor riesgo de daños por heladas en especies caducifolias como el cerezo (Augsburger, 2013). En este mismo sentido se ha proyectado para el actual escenario climático un aumento del riesgo de heladas en primavera, debido a la anticipación de la brotación y floración, tal como ha sido demostrado en especies frutales como la vid (Mosedale et al., 2015) y el manzano (Unterberger et al., 2018).

En el caso específico de la producción de cerezas, el daño por helada ha provocado pérdidas económicas en nuestro país, equivalentes a unos 411.000 millones de dólares, en años con una alta incidencia de este fenómeno climático (ODEPA, 2013), mientras en países como España, se estima que las pérdidas económicas por daño por heladas superaron los 35 millones de euros, afectando en promedio entre 40% y 70% de los cultivos de cereza (AVA-ASAJA, 2018).

El grado de susceptibilidad de los tejidos al daño por helada en frutales, depende de varios factores, incluyendo aquellos del tipo genético (cultivares), fenológico (estado de desarrollo de la yema), físicos (capacidad de formación de cristales de hielo en el tejido), meteorológicos (temperatura y humedad relativa) y fisiológicos (endurecimiento de la yema y estado nutricional de la planta) (Rodrigo, 2000).

En términos fisiológicos, el daño por helada en los árboles frutales ocurre cuando el agua en los tejidos celulares de la planta se congela, se expande y rompe las paredes celulares (Matzneller et al., 2015). Luego de un evento de helada, el daño de la célula depende del lugar de formación de los cristales de hielo, la formación de hielo extracelular, protege temporalmente las células,

mientras que un enfriamiento rápido intracelular provoca la formación de hielo, con la consecuente muerte de las células. Cuando los cristales de hielo se expanden en las regiones extracelulares, produce un rápido aumento en la concentración de soluto de la solución extracelular, lo que conlleva a un gradiente de concentración que promueve la salida de agua y colapso de la membrana plasmática (Yuri et al., 2018). En la congelación intracelular, las células mueren, observándose en el tejido dañado un aspecto de flacidez y decoloración, debido a la interrupción de las membranas celulares y otros componentes celulares ocasionado por los cristales de hielo (Burke et al., 1976) o por una deshidratación severa que produce la coagulación del protoplasma (Modlibowska, 1962a).

El daño intracelular, se manifiesta en órganos reproductivos causando una pérdida dramática del cultivo, pudiendo estar relacionado con bajas temperaturas previo al receso de la yema durante el otoño, invierno y después de la brotación en la primavera (Palonen y Buszard, 1997). Este daño por helada puede expresarse en tejidos como el xilema, corteza, raíces y brotes (Palonen y Buszard, 1997). En las flores ocurre un aborto de los óvulos (Williams, 1970) y ruptura de los pétalos, sépalos formando área de color marrón claro a negro en las células muertas (Simons, 1969). En frutos inmaduros, el daño por helada se expresa como una separación de la piel de la pulpa (Olson y Steeves, 1983), mientras que en frutos maduros se manifiesta a través de cambios en la forma, tamaño y apariencia, incluyendo malformaciones, las cuales normalmente se aprecian a nivel de la epidermis (Simons y Doll, 1976).

Durante el periodo de receso invernal profundo (endodormancia), las yemas florales tienen la capacidad de sobrevivir a bajas temperaturas al impedir la congelación, mediante el proceso de enfriamiento súper profundo. A principios de otoño y con temperaturas bajo cero, el agua contenida en las yemas permanece en estado líquido pese a que exista la presencia de cristales de hielo, e incluso algunos primordios florales dentro de una yema pueden permanecer vivos. Durante este periodo, se ha observado la muerte del 50% de las yemas solo cuando las temperaturas alcanzan valores extremos entre -18°C y -20°C . Este valor, llamado nivel de resistencia mínimo se mantiene constante durante el periodo de receso profundo, inclusive con temperaturas por encima del punto de congelación. El nivel de resistencia de las yemas al daño por helada depende más del tiempo de exposición a la temperatura bajo cero que de la intensidad del evento en un día determinado (Thompson, 1996). En este sentido, se ha observado en

especies frutales como el manzano, que las ramas son capaces de sobrevivir a temperaturas cercanas incluso a los $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Potapov, 1999). Esta situación puede variar dependiendo de la especie y del estado fenológico. En el caso del cerezo se ha señalado que con temperaturas de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el estado fenológico de punta verde y plena floración, respectivamente ocurre la muerte del 90% de las yemas (Proebsting y Mills, 1978).

Una vez completado el enfriamiento de la yema en el receso profundo, se inicia el periodo de aclimatación, en el cual las temperaturas cálidas inician el desarrollo de las etapas que conducen a la floración. En este período, la probabilidad de la resistencia natural de la yema al daño por heladas es más difícil (Andrews y Proebsting, 1987), debido a que durante el avance de su desarrollo (floración y fructificación) los tejidos son más sensibles a temperatura por congelación (Yuri et al., 2018). En estos estados se pierde la capacidad de enfriamiento profundo y por tanto las yemas y sus tejidos son más susceptibles. En este contexto, temperaturas de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ poco antes de la floración o inmediatamente después pueden provocar la muerte de las yemas, flores y frutos recién cuajados (Thompson, 1996). Bajo estas condiciones, se ha determinado que el daño se caracteriza por un cambio externo en la coloración de los pétalos, adquiriendo una tonalidad del tipo café marrón. No obstante, aquellas flores sin este síntoma externo pueden presentar igualmente daños internos, tales como la necrosis parcial o total de estilos, ovarios y estambres, impidiendo con ello la fecundación (Rodrigo, 2000).

Es importante destacar que las condiciones climáticas pueden determinar el tipo y severidad de heladas en frutales. Así bajo condiciones invernales post-frontales de días despejados puede dar origen a una helada de tipo radiativa por pérdida de calor desde el suelo hacia la atmósfera, cuyo daño puede ser mayor en condiciones sin viento y baja humedad relativa (Palmer et al., 2003; Yuri et al., 2018), y que se acentúa a medida que avanza el estado fenológico (Matzneller et al., 2015). Por otra parte, en la medida que se avanza en la primavera, existe una mayor probabilidad de heladas del tipo advectiva por movimiento de masas de aire frío, las cuales causan mayor daño en relación a las heladas del tipo radiativa (Yuri et al., 2018).

Existen diferentes medidas para prevenir el daño por heladas en fruticultura, cuya efectividad varía de acuerdo al fundamento fisiológico que existe detrás de su aplicación. En este sentido, el método de mayor frecuencia es el control activo que incluye prácticas de aporte externo de calor con el fin de evitar así la congelación y formación de cristales de hielo en los tejidos. Otros

métodos de control activo son el uso de calefactores, riego por aspersión y el movimiento de aire a través de hélices. El riego por aspersión sirve para el control tanto de heladas del tipo radiativa como advectiva; este consiste en la aplicación continua de agua para evitar la formación de cristales de hielo, lo que se consigue a través de la energía calórica que es aportada durante el continuo proceso de congelación del agua que es aplicada a los tejidos de la planta (Snyder y Melo-Abreu, 2010; Ghaemi et al., 2009). En cuanto al movimiento de aire, éste se basa en el principio de inversión térmica y permite mezclar el aire más cálido que existe a mayor altitud con el aire más frío que existe a nivel de la superficie del suelo durante la noche (Alabama A&M y Auburn Universities, 2000). Si bien es cierto estos métodos de control del tipo activo son efectivos en el control de heladas, todos requieren de alta inversión y alto costo de operación por su uso, además del gasto energético involucrado (Longstroth y Perry, 1996; Cittadini et al., 2006).

Una segunda alternativa de control es el método de control pasivo, que involucra una serie de prácticas indirectas que promueven a que la planta se encuentre menos susceptible al daño por congelación (Evans, 2000). Dentro de este grupo se pueden encontrar la selección de cultivares y portainjerto más tolerantes, manejo de prácticas de poda y nutrición mineral, así como también del tipo fitosanitario, especialmente de bacterias del género *Pseudomonas* que promueven la formación de núcleos de hielos a nivel celular (Yuri et al., 2018).

En la búsqueda de soluciones de mejor relación costo/efectividad, se ha probado la aplicación de reguladores de crecimiento, tales como inhibidores de la síntesis de giberelinas, que son capaces de reducir el estrés oxidativo que se genera durante el desarrollo del daño, ya sea al disminuir el punto de congelación o bien al reducir la formación de radicales libres inducidos durante el daño por frío (Albrecht et al., 2004).

El polivinil alcohol (PVA), es un polímero que inhibe la recristalización del hielo al igual que las proteínas anticongelantes. Ha sido aplicado con el propósito impedir la formación de hielo durante la crioconservación de tejidos vegetales (Wowk, 2000). Se desconocen las razones de la actividad del polímero PVA, pero existe una hipótesis que plantea que este podría unirse directamente a los cristales de hielo (Budke y Koop, 2006). Desde el punto de vista agronómico, este tipo de compuesto ha sido efectivo en la disminución de núcleos de hielo inducido por bacterias del tipo *Pseudomonas* y que es un agente causal de enfermedades en frutales (Wowk

y Fahy, 2002), pero su efectividad en el control de daño por heladas en especies como el cerezo no ha sido a la fecha documentada.

HIPÓTESIS:

Las formulaciones de nanopartículas de polivinil alcohol (PVA) son más efectivas en reducir el daño por helada en primordios florales de cerezo que el agente anti-helada comercial y agua.

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar la efectividad de la aplicación de agente crio-protector en base a PVA en el control del daño por heladas en cerezo bajo diferentes condiciones de riesgo de este daño.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la efectividad del agente crio-protector para las siguientes condiciones de riesgo de daño por heladas: tratamientos con cianamida hidrogenada, cultivares con distinta fecha de floración, diferentes localidades geográficas y en cámara de frío.
- Cuantificar los efectos complementarios de la aplicación de este agente en la calidad de frutos.

LITERATURA CITADA

- Alabama A&M and Auburn Universities. 2000. Methods of Freeze. Protection for Fruit Crops. ANR-1057B.
- Albrecht, E., Schmitz-Eiberger, M., Brauckmann, M., Rademacher, W., Noga, G. 2004. Use of Prohexadione-Calcium, Vitamin E, and Glycerine for the reduction of Frost Injury in Apple (*Malus domestica*) Flowers and Leaves. *Europ. J. Hort. Sci.*, 69: 59-65.
- Albuquerque, N., García-Montiel, F., Carrillo, A., Burgos, L. 2008. Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environmental and Experimental Botany*, 64: 162–170.
- Andrews, P.K. and Proebsting, E.L. 1987. Effects of temperature on the deep supercooling characteristics of dormant and deacclimating sweet cherry flower buds. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 112: 334-340.
- Augspurger, C. 2013. Reconstructing patterns of temperature, phenology, and frost damage over 124 years: Spring damage risk is increasing. *Ecology*, 94(1): 41-50.
- AVA-ASAJA, 2018. España: las heladas causan pérdidas de 35 millones de euros en 7.500 hectáreas en Valencia. Consultado el día 08 de abril de 2019. Disponible en <https://www.freshfruitportal.com/news/2018/03/23/spain-frosts-cause-e35m-losses-across-7500-hectares-in-valencia/>
- Bastías, R.M., Leyton, M.J., Valenzuela, R., Saavedra, M., Soto, G. 2015, Long, L. 2015. Diagnóstico y manejo de partiduras en cerezas. *Revista Frutícola*, 37 (3): 20 – 27.
- Beppu, K and Kataoka, I. 2011. Studies on Pistil Doubling and Fruit Set of Sweet Cherry in Warm Climate. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 80 (1): 1–13.
- Budke, C and Koop, T. 2006. Ice Recrystallization Inhibition and Molecular Recognition of Ice Faces by Polyvinyl alcohol. *Chem. Phys. Chem*, 7: 2601–2606.
- Burke, M., Gusta, L., Quamme, H., Weiser, C., Li, P. 1976. Freezing and injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol* 27: 507-528.

- Cittadini, E., Ridder, N., Peri, P., Van Keulen, H. 2006. A method for assessing frost damage risk in sweet cherry orchards of South Patagonia. *Agricultural and Forest Meteorology*, 141: 235–243.
- Evans, R.G. 2000. The art of protecting grapevines from low temperature injury. Proc. ASEV 50th Anniversary Annual Mtg., Seattle WA, 19–23 June. p. 60–72.
- Ghaemi, A., Rafiee, M., Sepaskhah, A. 2009. Tree-Temperature Monitoring for Frost Protection of Orchards in Semi-Arid Regions Using Sprinkler Irrigation. *Agricultural Sciences in China*, 8(1): 98-107.
- Hedhly, J., Hormaza, I., Herrero, M. 2003. The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant, Cell and Environment*, 26: 1673 – 1680.
- Hedhly, J., Hormaza, I., Herrero, M. 2004. Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). *American Journal of Botany*, 91(4): 558–564.
- Lang, G., Early, J., Martin, G., Darnell, R., 1987. Endo-, para-, and ecodormancy. Physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience*, 22: 371-377.
- Longstroth, M., and Perry, R. 1996. Selecting the orchard site, orchard planning and establishment. (Eds.), *Cherries: Crop physiology, production and uses*. CAB International, Cambridge, UK, 203–221.
- Luedeling, E. 2012. Climate change impacts on winter chill for temperate fruit and nut production: A review. *Scientia Horticulturae*, 144: 218–229.
- Matzneller, P., Götz, K., Chmielewski, F. 2015. Spring frost vulnerability of sweet cherries under controlled conditions. *Int. J. Biometeorology*, 60: 123–130.
- Modlibowska, I. 1962a. Frost damage and recovery in plant tissues. *Proceedings of the XVIII Int. Hort. Cong.*, 180–189.
- Mosedale J, Wilson R, Maclean I. 2015. Climate Change and Crop Exposure to Adverse Weather: Changes to Frost Risk and Grapevine Flowering Conditions. *PLoS ONE* 10(10): e0141218. doi:10.1371/journal.pone.0141218.

Novoa, R y Villaseca, S. 1989. Mapa agroclimático de Chile. Consultado el 02 de abril. Disponible <file:///C:/Users/Flasher/Downloads/Mapa%20Agroclimatico%20de%20Chile.pdf>

ODEPA, 2013. Estudio: Efecto heladas de septiembre en frutales y hortalizas entre la Región de Coquimbo y la del Maule. Consultado el día 6 de julio del 2017. Disponible en http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1388163908estudioDanoHeladas.pdf

ODEPA. 2019. Catastro Frutícola. Superficie nacional y regional. Consultado el 10 de marzo del 2019. Disponible en <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/estadisticas-productivas>

Olson, R., and Steeves, E., 1983. Frost damage in flowers and immature fruits of *Amelanchier alnifolia* Nutt (Maloideae). *J. Plant Sci.*, 63: 461-466.

Oukabli, A. and Mahhou, A. 2007. Dormancy in sweet cherry (*Prunus avium* L.) under Mediterranean climatic conditions. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 11 (2): 133–139

Palmer, J. Privé, J. Tustin, D. 2003. Temperature. *Apples: Botany, Production and Uses*. CAB International.

Palonen, P. and Buszard, D. 1997. Current state of cold hardiness research on fruit crops. *J. Plant Sci.*, 77: 399-420.

Potatov, V. 1999. Winter hardy dwarfing apple rootstocks: apple rootstock for intensive orchards. In: *Proceedings of the International Seminar, Warsaw*. Warsaw Agricultural University (SGGW), Warsaw Ursynow, Poland, 85-86.

Proebsting, E., and Mills, H. 1978. Low temperature resistance of developing flower buds of six deciduous fruit species. *J. Am Soc Hortic Sci.*, 103: 192-198.

Rodrigo J. 2000. Spring frosts in deciduous fruit trees — morphological damage and flower hardiness. *Scientia Horticulturae*, 85 (3- 4): 155-173.

Salazar-Gutierrez, M., Chaves, B., Anothai, J., Whiting, M., Hoogenboom, G. 2014. Variation in cold hardiness of sweet cherry flower buds through different phenological stages. *Scientia Horticulturae*, 172: 161–167.

- Seif, S., and Gruppe, W. 1985. Chilling requirements of sweet cherries (*Prunus avium*) and interspecific hybrids (*Prunus* X *SPP*) *Acta Horticulturae*, 169: 289-294.
- Simon, G. 2006. Review on rain induced fruit cracking of sweet cherries (*Prunus avium* L.), its causes and the possibilities of prevention. *International Journal of Horticultural Science*, 12 (3): 27-35.
- Simons, R. 1969. Tissue response of young developing apple fruits to freeze injury *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 94: 376-382.
- Simons, R., Doll, C., 1976. Morphological and anatomical response of apples to a late spring frost in relation to stage of fruit development. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 101: 315-320.
- Snyder, R y Melo-Abreu. P. 2010. Protección contra las heladas: fundamentos, práctica y economía. 1, 257.
- Thompson, M. 1996. Flowering, pollination and fruit set. Cherries. *Crop Physiology, Production*. CAB International, Cambridge, UK. 223–241.
- Unterberger, C., Brunner, L., Nabernegg, S., Steininger, KW., Steiner, AK., Stabentheiner, E., Monschein, S., Truhetz, H. 2018. Spring frost risk for regional apple production under a warmer climate. *PLoS ONE* 13 (7): e0200201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200201>
- Williams, R. 1970. Factors affecting pollination in fruit trees. *Physiology of Tree Crops*. Academic Press, London, 193–207.
- Wowk, B., Leitel, E., Rasch, C., Mesbah-Karimi, N., Harris, CS., Fahy, G. 2000. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*, 40: 228–236.
- Wowk, B and Fahy, G. 2002. Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymer. *Cryobiology*, 44: 14–23.
- Yuri, J.A., Lepe, V., Sepulveda, A. 2018. Heladas en fruticultura. Una mirada desde Chile. *Revista de Fruticultura*, 66: 7 – 17.

CAPÍTULO 2

PVA COMO HERRAMIENTA PARA PREVENIR EL DAÑO POR HELADAS EN YEMAS FLORALES DEL CEREZO

PVA AS TOOL TO PREVENT FROST DAMAGE IN CHERRY FLOWER BUDS

Miguel Valenzuela-Villar¹, Richard M. Bastías^{1*}, Saddys Rodríguez-Llamazares², Constanza Sabando² y, Walther Ide²

¹ Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Av. Vicente Méndez 595, Chillán, Chile.

² Centro de Investigación de Polímeros Avanzados, Avenida Collao 1202, Edificio de Laboratorios CIPA, Concepción, Chile.

Autor para correspondencia: ribastias@udec.cl

Artículo enviado para publicación Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences

Fecha de envío: 05 de agosto 2019



RESUMEN

El daño por helada en frutales se produce cuando la temperatura inferior a 0°C induce cristalización del hielo en el tejido vegetal. Las nanopartículas de polivinil alcohol (PVA) en condiciones de laboratorio inhiben la cristalización del hielo. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la efectividad de formulaciones base a PVA para prevenir el daño por heladas en yemas florales del cerezo. Se evaluaron los siguientes tratamientos y formulaciones: i) F1, PVA completamente hidrolizado 0,1% p/v; ii) F2, nanopartículas de PVA + tween 0,01 % p/v; iii) F3-15, nanopartículas de PVA + tween + polivinilpirrolidona 0,01 % p/v; iv) F3-30, nanopartículas de PVA + tween + polivinilpirrolidona 0,02 % p/v. Como testigo se incluyeron un agente anti-helada comercial (AAC) 1 % v/v y agua destilada. Los ensayos se condujeron bajo condiciones de campo (localidades, cultivares y aplicación de cianamida) y de laboratorio (micro-cámara). En los ensayos de campo se cuantificó el efecto del polímero en los parámetros calidad de fruta: tamaño (mm), firmeza (g mm^{-1}), sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$) y color (escala CITFL). Para los diferentes ensayos la formulación de polímero F3 fue la más efectiva en reducción de daño por heladas en yemas

florales, cuya efectividad varió desde 40% a un 100%, sin causar efectos negativos en la calidad de la fruta. Estos resultados demuestran que el uso de polímero PVA es una herramienta promisoría para el control de daño por heladas en huertos frutales.

Palabras claves: Agente crioprotector, polivinil alcohol (PVA), *Prunus avium* L.

ABSTRACT

Frost damage on fruit trees occurs when the temperature below 0 ° C induces ice crystallization in plant tissue. Polyvinyl alcohol (PVA) nanoparticles under laboratory conditions inhibit ice crystallization. This work aimed to evaluate the effectiveness of a polymer based on PVA to prevent frost damage in cherry buds. The following treatments and formulations were evaluated: i) F1, PVA completely hydrolyzed 0.1% w/v; ii) F2, PVA Nanoparticles + tween 0.01% w/v; iii) F3-15, PVA Nanoparticles + tween + polyvinylpyrrolidone 0.01% w/v; iv) F3-30, PVA Nanoparticles + tween + polyvinylpyrrolidone 0.02% w/v. As a control, commercial anti-freeze agent (AAC) 1% v/v and distilled water were included. The trials were conducted under field conditions (localities, cultivars and application of cyanamide) and laboratory (micro-camera). In the field trials the effect of the polymer on the fruit quality parameters: size (mm), firmness (g mm^{-1}), soluble solids (° Brix) and color (CITFL scale). For the different trials, the F3 polymer formulation was the most effective in reducing frost damage in cherry flower buds, whose effectiveness varied from 40% to 100%, without causing negative effects on fruit quality. These results demonstrate that the use of PVA polymer is a promising tool for controlling frost damage in fruit orchards.

Key words: Cryoprotective agent, Polyvinyl alcohol (PVA), *Prunus avium* L.

INTRODUCCION

El cultivo del cerezo, se ha transformado en una de las alternativas productivas de mayor rentabilidad económica para los productores de frutas en Chile, alcanzando en la actualidad 30.179 hectáreas plantadas con esta especie frutal (ODEPA, 2019). No obstante, en la actualidad la producción de cerezas se ve fuertemente amenazada por una serie de problemas derivados del calentamiento global, principalmente por las condiciones climáticas cada vez más adversas para el desarrollo productivo de este cultivo frutal (Luedeling, 2012).

Se ha indicado que el fenómeno de cambio climático podría estar provocando primaveras con mayores fluctuaciones térmicas, dando como resultado, alteraciones fenológicas, tales como un adelanto en las fechas de floración, lo que posiblemente puede llevar a un mayor riesgo de daños por heladas en especies caducifolias como el cerezo (Augspurger, 2013). Bajo el actual escenario climático un aumento del riesgo de heladas en primavera, se debe a la anticipación de la brotación y floración, tal como ha sido demostrado en especies frutales como la vid (Mosedale et al., 2015) y el manzano (Unterberger et al., 2018).

El grado de susceptibilidad de los tejidos al daño por helada en frutales, depende de varios factores, incluyendo aquellos del tipo genético (cultivares), fenológico (estado de desarrollo de la yema), físicos (capacidad de formación de cristales de hielo en el tejido), meteorológicos (temperatura y humedad relativa) y fisiológicos (endurecimiento de la yema y estado nutricional de la planta) (Rodrigo, 2000). En términos fisiológicos, este daño ocurre cuando el agua en los tejidos celulares de la planta se congela, se expande y rompe las paredes celulares (Matzneller et al., 2015). Cuando los cristales de hielo se expanden en las regiones extracelulares, produce un rápido aumento en la concentración de soluto de la solución extracelular, lo que conlleva a un gradiente de concentración que promueve la salida de agua y colapso de la membrana plasmática (Yuri et al., 2018).

Existen diferentes medidas para prevenir el daño por heladas en fruticultura, cuya efectividad varía de acuerdo al fundamento fisiológico que existe detrás de su aplicación. En este sentido, el método de mayor frecuencia es el control activo que incluye prácticas liberación de energía para el aporte externo de calor con el fin de reemplazar pérdidas de energía y evitar así la congelación y formación de cristales de hielo en los tejidos. Dentro de los métodos de control activo se encuentran el uso de calefactores, riego por aspersion y el movimiento de aire a través

de hélices (Snyder y Melo-Abreu, 2010; Ghaemi et al., 2009). Si bien es cierto estos métodos de control del tipo activo son efectivos en el control de heladas, todos requieren de una alta inversión y un alto costo de operación por su uso, además del gasto energético involucrado (Longstroth y Perry, 1996; Cittadini et al., 2006).

Una segunda alternativa de control es el método de control pasivo, que involucra una serie de prácticas indirectas que promueven a que la planta se encuentre menos susceptible al daño por congelación (Evans, 2000). Dentro de este grupo se pueden encontrar la selección de cultivares y portainjerto más tolerantes, manejo de prácticas de poda y nutrición mineral, así como también del tipo fitosanitario, especialmente de bacterias del genero *Pseudomonas* que promueven la formación de núcleos de hielos a nivel celular (Yuri et al., 2018).

En la búsqueda de soluciones de mejor relación costo/efectividad, se ha probado la aplicación de reguladores de crecimiento, tales como inhibidores de la síntesis de giberelinas, que son capaces de reducir el estrés oxidativo que se genera durante el desarrollo del daño, ya sea al disminuir el punto de congelación o bien al reducir la formación de radicales libres inducidos durante el daño por frío (Albrecht et al., 2004). Una alternativa con potencial aplicación es el uso de polivinil alcohol (PVA), polímero que inhibe que la recristalización del hielo al igual que las proteínas anticongelantes. Este tipo de agente ha sido efectivo en impedir la formación de núcleo de hielo durante la crioconservación de tejidos vegetales, así como también en aquel inducido por bacterias del tipo *Pseudomonas* (Wowk, 2000; Wowk y Fahy, 2002; Budke y Koop, 2006), pero su efectividad en el control de daño por heladas en especies como el cerezo no ha sido a la fecha documentada. El objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad de la aplicación de agente crio-protector en base a PVA en el control del daño por heladas bajo diferentes condiciones de riesgo de este daño en yemas florales del cerezo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal y Diseño Experimental

Ensayo en condiciones de campo

Los ensayos bajo condiciones de campo se realizaron durante dos temporadas consecutivas (2017-2018 y 2018-2019) en huertos comerciales de cerezas de los cultivares Lapins, Sweetheart y Regina, ubicados en las comunas de San Fabián (36°43'S, 71°95'W) y Coihueco (36°35'S, 71°54'W) y Chillán (36°35'S, 72°04'W), respectivamente. Los huertos de los cultivares Lapins y Sweetheart estaban formados por árboles de nueve años de edad, injertados sobre portainjerto Colt y plantados a una distancia de 5 x 3 m y 4,5 x 3 m, respectivamente. El huerto del cultivar Regina, estaba formado por árboles de cuatro años de edad, injertados sobre el portainjerto Gisela 6 y plantado a una distancia de 3 x 1 m.

Los ensayos fueron establecidos en un diseño experimental de bloques completamente al azar, con cuatro bloques como repetición y cuatro ramas basales por árbol como unidad experimental para los cultivares Lapins y Sweetheart, mientras que en el cultivar Regina se seleccionó como unidad experimental el árbol completo.

Durante el periodo de receso de la yema (finales de julio), se asperjó el 50% de los árboles que participaron en el ensayo con cianamida hidrogenada (Dormex®, Trostberg, Alemania) en una dosis del 2% v/v junto a un coadyuvante concentrado soluble (Break®, Hopewell, EE.UU.) en dosis del 0,01% v/v. El 50% de los árboles restante no fueron asperjados con cianamida hidrogenada.

Para los estados fenológicos, de yema en receso, yema hinchada, botón verde y floración y antes de un evento de helada se aplicaron las siguientes formulaciones del polímero en base a poli vinil alcohol (PVA): i) F1, PVA completamente hidrolizado 0,1% p/v; ii) F2, nanopartículas de PVA + tween 0,01 % p/v; iii) F3-15, nanopartículas de PVA + tween + polivinilpirrolidona 0,01 % p/v; iv) F3-30, nanopartículas de PVA + tween + polivinilpirrolidona 0,02 % p/v. Como testigo se incluyó un agente anti-helada comercial (AAC) 1 % v/v y agua destilada. Previo a la aplicación, el polímero fue agitado para ser diluido en agua destilada. Las aplicaciones de cianamida hidrogenada y de las formulaciones del polímero fueron realizadas a través de una moto-pulverizadora manual (SWISSMEX®, Jalisco, México) con capacidad de 15 L.

Ensayo en condiciones de laboratorio

Veinticuatro dardos sanos del cultivar Sweetheart se tomaron al azar desde madera de dos años de edad. Los dardos se seleccionaron para los estados fenológicos de yema en receso, yema hinchada y brotación. Las muestras se colectaron, envolvieron en papel húmedo y transportadas en un cooler (Rubbermaid®, Ohio, EE.UU.) de 47 litros de capacidad. Posteriormente, el total de las yemas florales fueron abiertas con la ayuda de un bisturí y los dardos fueron instalados en orificios de bandeja de almaciguera tipo forestal (JKS, Corea) de 288 cavidades con algodón hidrófilo (Fig. 1), el cual fue humedecido previamente al 1% con una solución que contenía los elementos N, P, K en una relación 9-4-10% (Best Garden®, Chile). Los dardos fueron dispuestos en 4 sectores de la bandeja de 6 dardos por sector. Cada dardo por repetición fue asperjado con las siguientes formulaciones: i) F1, PVA completamente hidrolizado 0,1% p/v; ii) F2, nanopartículas de PVA + NaOH 6% p/v; iii) F3-15, nanopartículas de PVA + tween + polivinilpirrolidona 0,01 % p/v; iv) F3-30, nanopartículas de PVA + tween + polivinilpirrolidona 0,02 % p/v. Como testigo se incluyó un agente anti-helada comercial (AAC) 1 % v/v y agua destilada, a través de un dispensador manual (Ergo®, China) de 1 L de capacidad. Luego, la bandeja con los dardos asperjados fue introducida en una micro-cámara QB0.4L2 (Calvac®, China) a una temperatura de -5°C y a 70% de humedad relativa. Después de 4 horas de exposición a estas condiciones, la bandeja con los dardos fue sacada de la micro-cámara para una posterior evaluación.



Figura 1: Apariencia visual de dardos florales instalados en orificios de bandeja de almaciguera con algodón hidrófilo durante los estados fenológicos de yema en receso (A), yema hinchada (B) y brotación (C). Fuente: Elaboración propia.

Evaluación de incidencia de helada

La incidencia de daño por helada en yemas florales fue evaluada durante dos temporadas consecutivas: 2017-18 y 2018-19. La evaluación se realizó en distintos estados fenológicos, desde yema en receso hasta la floración, según la escala propuesta por Fadón et al. (2015). Luego de un evento de helada, se tomaron dos yemas florales desde dardos creciendo en madera de dos años para cada cultivar. Las muestras fueron recolectadas entre las 10:00 y 14:00 horas del día. Cada muestra fue envuelta en papel húmedo y transportadas en un cooler (Rubbermaid ®, Ohio, EE.UU.) de 47 litros de capacidad para su posterior evaluación. Posteriormente las yemas fueron abiertas mediante cortes secuenciales en forma transversal, comenzando de la parte superior hacia la base, usando un bisturí y observando visualmente mediante un estereomicroscopio modelo SZ61 (Olympus®, Tokio, Japón) que estaba equipado a una cámara digital modelo LC30 (Olympus®, Tokio, Japón). Luego se evaluó visualmente la incidencia de daño, a través del conteo de primordios florales que presentaban pardeamiento (color café-oscuro) para estados prematuros de desarrollo de la yema (Fig. 2), o estilos y pistilos necrosados, para los estados más avanzados en el desarrollo de la yema (Longstroth, 2013). Las imágenes fueron digitalizadas por medio del software LC micro. Este mismo procedimiento de evaluación se realizó sobre las yemas que fueron tratadas bajo condiciones de micro-cámara de frío.

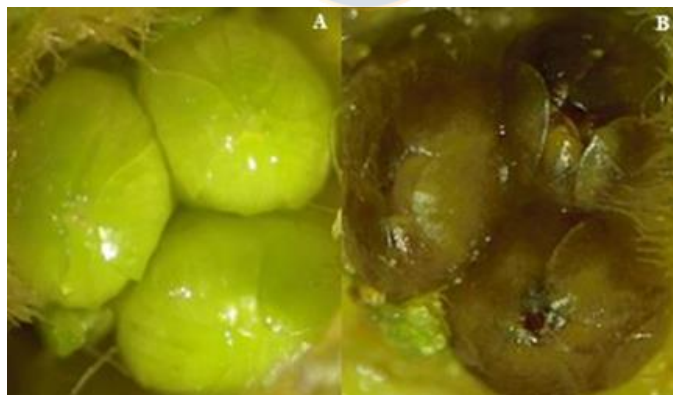


Figura 2: Apariencia visual de primordios florales en yemas del cerezo antes (A) y después (B) de la exposición a un evento de helada. Fuente: Elaboración propia.

Condiciones climáticas

En el ensayo de campo se llevó un registro continuo de temperatura mínima diaria en ambas temporadas, desde el estado de caída de hojas (principio de mayo) hasta frutos cuajados (octubre) mediante sensores modelo HOBO Pro v2 (Onset Corporation®, Massachusetts, EE.UU.). Mientras que el ensayo de micro-cámara se registró continuamente la temperatura y humedad relativa mínima horaria, a través de sensores modelo KTL-508 (KeyTag Analyser®, China).

Evaluación de calidad de fruta

Al momento de cosecha y para cada tratamiento se realizó un análisis de calidad de fruta, considerando una muestra de entre 4 - 10 frutos, por repetición según la carga frutal de cada condición (localidad, variedad). El color de frutos se midió usando la escala numérica (1-7) desarrollada por CTIFL (Centro técnica interprofessionnel des fruit et legumes, Francia). Luego se procedió a medir el diámetro ecuatorial utilizando un pie de metro digital modelo Y305624 (Stainless Hardened, EE.UU.). Posteriormente se midió la firmeza de frutos utilizando un equipo FirmTech 2 (BioWorks Inc., Kansas, EE. UU.). Finalmente, se determinó el contenido de sólidos solubles utilizando un refractómetro digital modelo HI96801 (Hanna Instrument, EE.UU.).

Análisis estadístico

Los datos de incidencia de daño por helada fueron comparados mediante un análisis de varianza no paramétrico y a través de la prueba de Friedman. Los datos de calidad de fruta fueron sometidos a un análisis de varianza ANDEVA con un nivel de significancia del 0,05, previa comprobación de la normalidad y homogeneidad de los datos. La separación de medias se realizó a través del test Tukey al 95% de significancia. Los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico Infostat (Balzarini et al. 2008).

RESULTADOS

Para la temporada 2017/2018 y en el cultivar Sweetheart se apreció que el uso de cianamida incrementó solo parcialmente la cantidad de primordios con daño por helada, en comparación a aquellos árboles no tratados (Fig. 3a y b). En este mismo cultivar, sólo se observó un efecto significativo ($p < 0.05$) de los tratamientos con polímeros de PVA a los 54 días antes de la floración, para los árboles tratados con cianamida (Fig. 3a). En este caso, todas las formulaciones de PVA disminuyeron este daño, en comparación al agente AAC empleado como control comercial, pero no así en relación al control absoluto (agua). En el caso del cultivar Lapins no se apreció mayor diferencia en la incidencia de daño para yemas florales tratadas y no tratadas con cianamida hidrogenada, no encontrándose efecto significativo por efecto del polímero PVA (Fig. 3c y d). En cuanto al cultivar Regina, también se evidenció parcialmente un mayor daño de heladas en yemas florales de aquellos árboles tratados con cianamida hidrogenada. En este cultivar, se observó un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de los tratamientos con polímeros a los 16 días antes de la floración, en los árboles tratados con cianamida. En este caso, la formulación F3-15 fue la más efectiva y redujo en un 83% el daño por heladas comparado con el control absoluto (agua) (Fig. 3e).

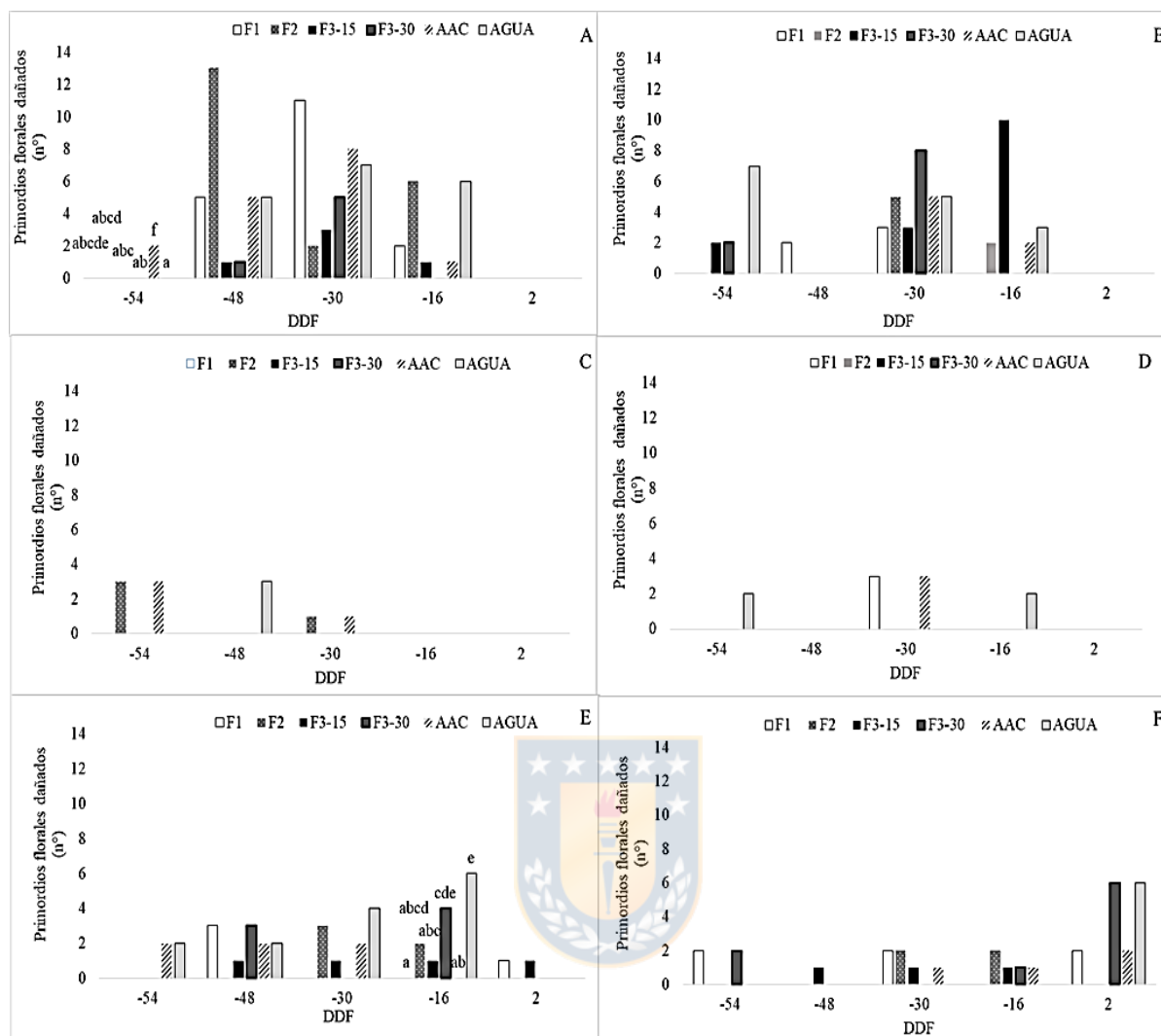


Figura 3: Influencia de diferentes formulaciones en base a PVA sobre la cantidad de primordios florales dañados (n°) para las siguientes condiciones cultivar/cianamida: Sweetheart C/CH (A); Sweetheart S/CH (B); Lapins C/CH (C); Lapins S/CH (D); Regina C/CH (E) y Regina S/CH (F). Temporada 2017-2018. Barras con letras distintas difieren estadísticamente según test de Friedman. Abreviaturas: C/CH: con cianamida hidrogenada; S/CH: sin cianamida hidrogenada; DDF: días después de floración. Fuente: Elaboración propia.

Durante la temporada 2018/2019 y en el cultivar Sweetheart, el uso de cianamida hidrogenada no provocó mayor incidencia de daño por helada en yemas, y tampoco un efecto significativo de los tratamientos con polímero PVA en ambas condiciones (Fig. 4a y b). Para la misma temporada y en el cultivar Lapins, no se aprecian diferencias de daño por helada en árboles tratados con cianamida (Fig. 4c). En este cultivar, a los 8 días después de la floración las

formulaciones de polímero PVA F3-15 y F3-30 redujeron significativamente ($p < 0,05$) y en un 43% el daño de primordios en yemas florales, comparado con el control absoluto (agua) (Fig. 4d). En el cultivar Regina, se apreció mayor cantidad de flores dañadas con el uso de cianamida hidrogenada, pero sin efecto significativo de los tratamientos con polímero PVA (Fig. 4e y f). Cabe destacar que en ambas temporadas y los tres cultivares las formulaciones de polímero PVA F3 mostraron la tendencia más clara en disminuir el daño por heladas en yemas florales.

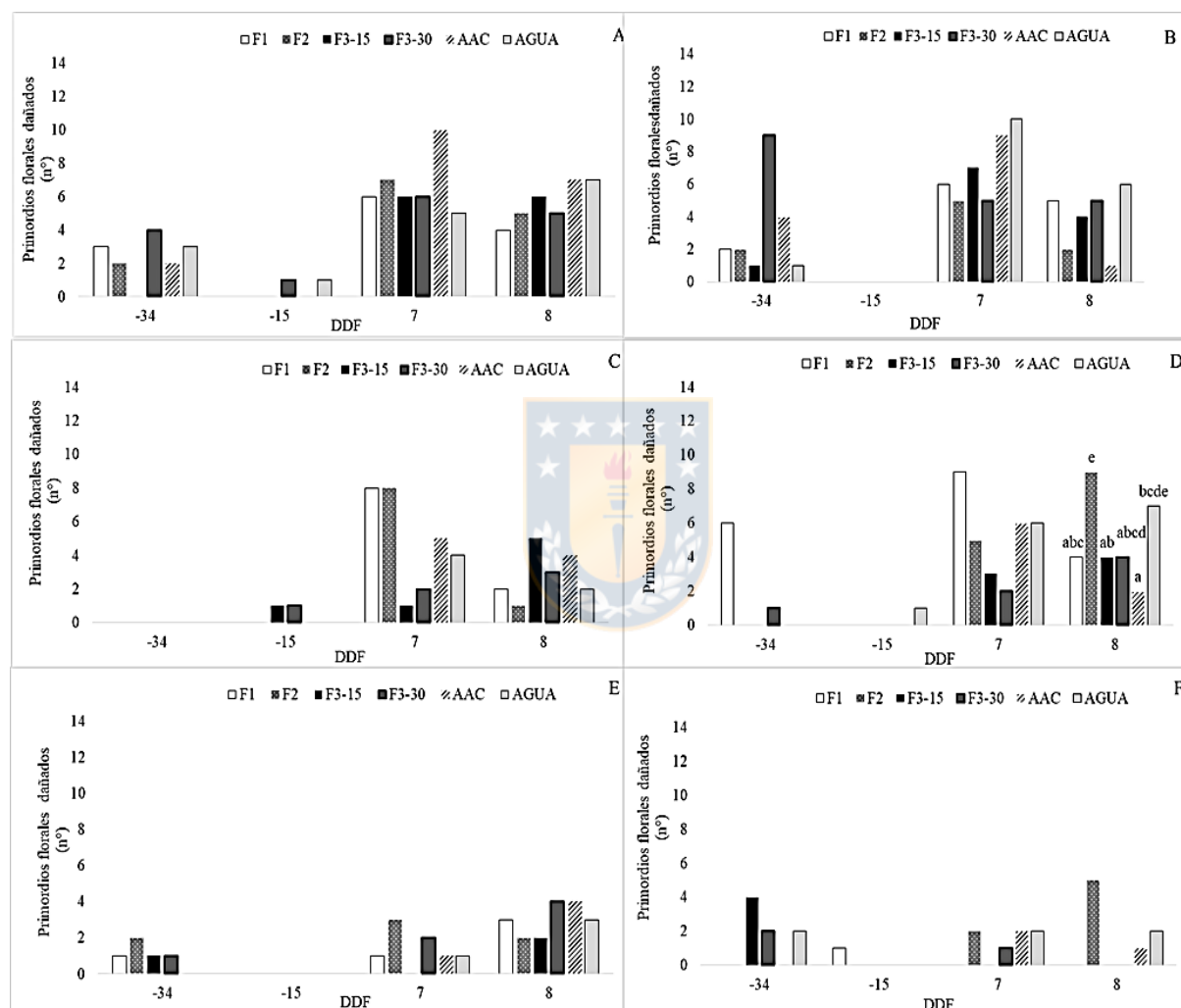


Figura 4: Influencia de diferentes formulaciones en base a PVA sobre la cantidad de primordios florales dañados (n°) para las siguientes condiciones cultivar/cianamida: Sweetheart C/CH (A); Sweetheart S/CH (B); Lapins C/CH (C); Lapins S/CH (D); Regina C/CH (E) y Regina S/CH (F). Temporada 2018-2019. Barras con letras distintas difieren estadísticamente según test de Friedman. Abreviaturas: C/CH: con cianamida hidrogenada; S/CH: sin cianamida hidrogenada. Fuente: Elaboración propia.

Para la temporada 2018-19, existió un 33,7% de mayor daño por helada en primordios florales que la temporada anterior (Fig. 3 y 4), acrecentándose el daño en floración, debido a una mayor duración e intensidad de heladas tardías, comparada con la temporada 2017-2018, según el registro de temperaturas inferiores a 0°C que fueron registradas en este estudio (Fig. 5).

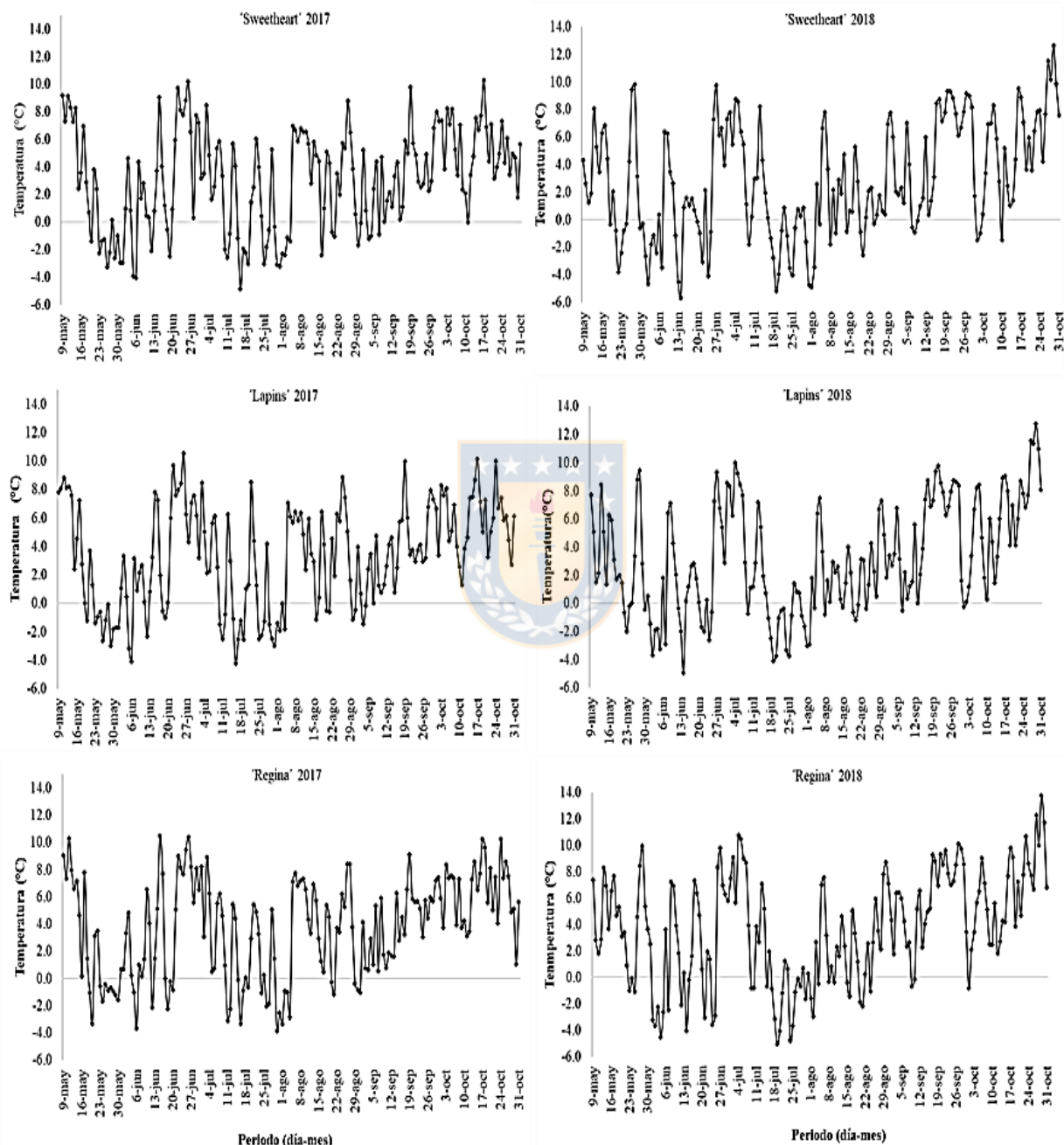


Figura 5: Temperatura mínima diaria en los huertos de los cultivares Sweetheart, Lapins y Regina. Temporadas 2017-2018 y 2018-2019.

Cuando se evaluó el efecto del polímero PVA bajo condiciones controladas (micro-cámara), se apreció un efecto significativo ($p < 0,05$) y positivo de los tratamientos con las formulaciones de polímero F2 y F3, respecto al control absoluto (agua). En este caso, ambas formulaciones redujeron el daño por heladas en yemas con una efectividad de un 100%, mientras que con la formulación F1 esta efectividad fue de un 84% (Fig. 6).

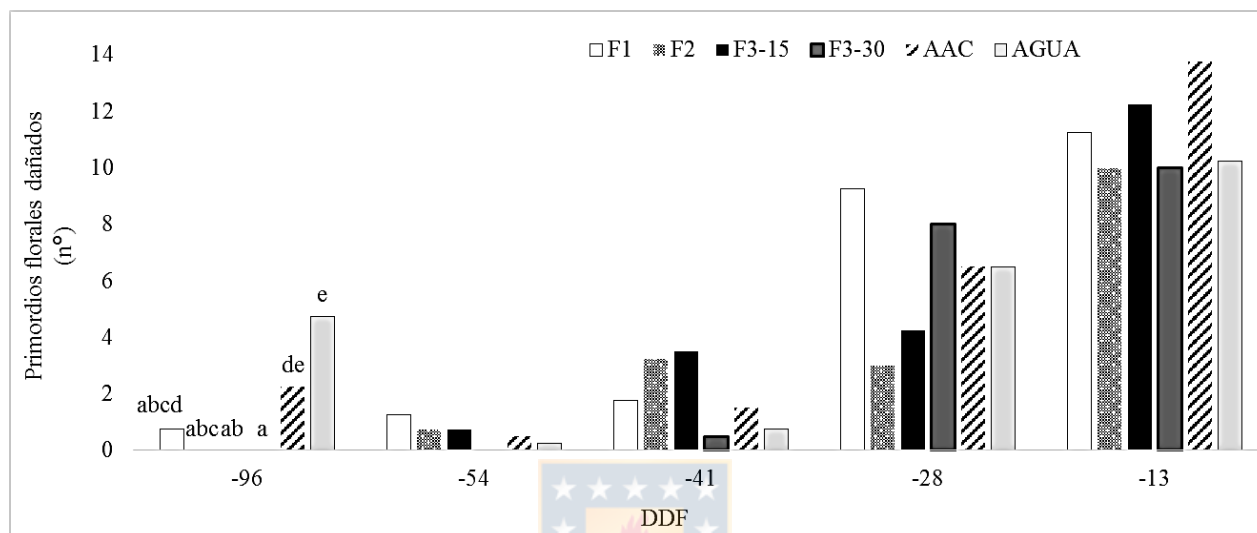


Figura 6: Influencia de diferentes formulaciones en base a PVA sobre el promedio de primordios florales dañados (n°) en dardos del cultivar Sweetheart expuestos durante 4 horas a -5°C . Barras con letras distintas difieren estadísticamente según test de Friedman. Fuente: Elaboración propia.

Para la temporada 2017/2018 y cultivar Lapins, sólo se apreció efecto significativo de las formulaciones de polímero de PVA en los parámetros de calidad de diámetro y color de frutos, sin apreciarse efecto en la firmeza y sólidos solubles (Tabla 1). Ninguna formulación afectó en forma negativa y significativa el diámetro de frutos, en comparación con el control absoluto (agua). De hecho, para la condición con cianamida, el uso de la formulación F3-30 incrementó significativamente ($p < 0,01$) y en un 4,6% el diámetro de frutos comparado con el control (Tabla 1). Para esta temporada y cultivar se observó una disminución significativa en el color de frutos por efecto de la formulación F3-15, comparado con el control y del orden de un 21% (Tabla 1).

Tabla 1. Influencia de diferentes formulaciones de PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Lapins' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2017-2018

Tratamientos	con cianamida				sin cianamida			
	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm ⁻¹)	Color (1-7)	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm ⁻¹)	Color (1-7)
F1	26,3ab	14,8	303,2	3,9	26,8 ^a	13,9	329,9	2,4a
F2	25,0c	15,4	317,5	4,3	26,0ab	13,9	332,5	2,3a
F3-15	26,8ab	15,5	294,1	3,9	27,0a	14,4	359,9	1,7b
F3-30	27,1a	14,7	293,9	3,4	25,1b	13,7	352,6	2,3a
AAC	26,7ab	14,6	287,4	3,9	26,6ab	13,8	341,9	2,3a
Agua	25,9bc	14,8	297,4	3,6	25,6ab	13,3	351,6	2,2a
Significancia	**	ns	ns	ns	**	ns	ns	*

Filas con letra distinta difieren estadísticamente según test de Tukey al 95%. Fuente: Elaboración propia.

Para la temporada 2018/2019 y en el mismo cultivar, se apreció un efecto de las formulaciones de polímero de PVA en los parámetros de calidad de diámetro, sólidos solubles y color de frutos, sin apreciarse efecto en la firmeza de frutos (Tabla 2). Al igual que la temporada 2017/18 ninguna formulación afectó en forma negativa y significativa el diámetro de frutos, comparado con el control absoluto (agua). La aplicación de la formulación F1 incrementó significativamente ($p < 0,05$ y $0,01$) entre un 25 - 30% el diámetro de frutos comparado con la formulación F2, F3, AAC y agua respectivamente (Tabla 2). De la misma manera ninguna de las formulaciones de polímero PVA afectó en forma significativa la concentración de azúcares (sólidos solubles) en la fruta, en comparación al testigo (agua) (Tabla 2). La fruta tratada con la formulación F1 y F2 presentó una concentración significativamente ($p < 0,05$ y $0,01$) mayor de sólidos solubles, comparada con la fruta tratada con el agente AAC, y con un incremento del orden del 15%. Finalmente, se apreció que la formulación F2 incrementó significativamente ($p < 0,05$) y en un 4% el color de frutos, en comparación al agente F3 y AAC (Tabla 2).

Tabla 2. Influencia de diferentes formulaciones de PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Lapins' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2018-2019.

Tratamientos	con cianamida				sin cianamida			
	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm ⁻¹)	Color (1-7)	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm ⁻¹)	Color (1-7)
F1	29,2a	17,5a	315,5	5,6	29,8 ^a	16,1ab	323,4	5,3ab
F2	27,5b	17,6a	340,0	5,7	29,0abc	16,8a	333,5	5,7a
F3-15	28,7ab	16,9ab	325,0	5,6	29,6ab	15,4b	322,6	5,1b
F3-30	28,5ab	16,1b	305,5	5,6	27,6c	15,9ab	342,5	5,4ab
AAC	28,2ab	15,7b	309,6	5,5	27,6c	14,9b	348,8	5,2b
Agua	28,1ab	16,9ab	315,7	5,7	28,2bc	15,5ab	347,5	5,5ab
Significancia	*	**	ns	ns	**	*	ns	*

Filas con letra distinta difieren estadísticamente según test de Tukey al 95%. Fuente: Elaboración propia.

Para la temporada 2017/2018 y en el cultivar Sweetheart las formulaciones de polímero PVA afectaron significativamente ($p < 0,01$) el diámetro, sólidos solubles y firmeza de los frutos (Tabla 3). En el caso del diámetro de frutos, ninguna formulación disminuyó significativamente el diámetro de frutos en comparación al testigo (agua), mientras que en este cultivar las formulaciones de polímero F2 y F3-15 incrementaron significativamente ($p < 0,01$) y en un 5% el diámetro de frutos en relación al tratamiento con AAC (Tabla 3). Tampoco se observó un efecto negativo de las formulaciones sobre el contenido de sólidos solubles, en relación al testigo. Las formulaciones F3-15 y F3-30 incrementaron significativamente ($p < 0,01$) y en un 10% y 12% el contenido de sólidos solubles, en relación al testigo y a la formulación F1, respectivamente (Tabla 3). En el caso de la firmeza de frutos esta variable de calidad tampoco se vio negativamente afectada por las formulaciones de polímero de PVA, por el contrario, con la formulación F1 esta variable se incrementó significativamente ($p < 0,05$) y en 11%, en relación al testigo (agua) (Tabla 3).

Tabla 3. Influencia de diferentes formulaciones de PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Sweetheart' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2017-2018.

Tratamientos	con cianamida				sin cianamida			
	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm ⁻¹)	Color (1-7)	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm ⁻¹)	Color (1-7)
F1	27,0ab	13,9b	291,2	3,3	26,6b	14,8ab	346,4a	2,7
F2	27,9a	15,1ab	303,5	3,4	27,5ab	14,0ab	323,7ab	2,7
F3-15	27,4a	14,9ab	306,4	3,3	27,9 ^a	15,2a	329,9ab	2,6
F3-30	27,9a	15,8a	318,5	3,4	27,2ab	14,1ab	311,7ab	2,9
AAC	26,3b	15,3ab	311,4	3,5	26,6b	13,6b	311,7ab	2,8
Agua	27,6a	15,2ab	295,1	3,5	27,0b	13,8b	308,9b	2,7
Significancia	**	**	ns	ns	**	**	*	ns

Filas con letra distinta difieren estadísticamente según test de Tukey al 95%. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Influencia de diferentes formulaciones de PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Sweetheart' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2018-2019.

Tratamientos	con cianamida				sin cianamida			
	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm ⁻¹)	Color (1-7)	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm ⁻¹)	Color (1-7)
F1	27,5	17,0	357,6	4,2	26,3	18,7	421,7	4,3
F2	27,6	18,4	378,1	4,3	28,3	17,2	426,5	4,3
F3-15	26,7	18,2	408,1	5,0	28,0	15,8	379,1	3,7
F3-30	27,7	15,4	392,0	4,2	27,8	16,9	405,6	3,6
AAC	28,8	17,0	401,7	4,4	26,8	17,0	403,4	4,2
Agua	28,0	16,5	362,8	4,5	27,5	17,8	381,4	3,7
Significancia	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Filas con letra distinta difieren estadísticamente según test de Tukey al 95%. Fuente: Elaboración propia.

En el caso del cultivar Regina y debido a la edad de los árboles, solo se evaluó el efecto de las formulaciones durante la temporada 2018-2019. En este caso, las formulaciones de PVA afectaron significativamente ($p < 0,05$) la firmeza y color de la fruta (Tabla 5). La fruta con la formulación F3-30 fue un 28,7% más firme que la fruta tratada con la formulación F1, y a su vez presentó un 33,3% de menor intensidad de color, respecto del control absoluto (agua) (Tabla 5).

Tabla 5. Influencia de diferentes formulaciones de PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Regina' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2018-2019.

Tratamientos	con cianamida				sin cianamida			
	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm ⁻¹)	Color (1-7)	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm ⁻¹)	Color (1-7)
F1	26,6	19,0	450,1	5,5	25,1	18,3	364,1b	5,0ab
F2	26,4	19,7	433,1	5,9	24,3	17,7	443,7ab	4,5abc
F3-15	26,6	19,8	406,9	5,7	25,0	18,1	475,9ab	4,2bc
F3-30	26,1	19,7	435,0	5,2	24,9	17,6	510,7a	3,6c
AAC	25,2	20,3	400,4	5,4	25,1	17,7	487,4ab	4,0bc
Agua	25,3	19,3	412,2	5,7	25,3	18,9	432,7ab	5,4a
Significancia	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	**

Filas con letra distinta difieren estadísticamente según test de Tukey al 95%. Fuente: Elaboración propia.

DISCUSIÓN

La incidencia de daño por helada en primordios florales fue diferente en los tratamientos para los tres cultivares, durante ambas temporadas (Figs. 3 y 4), ya que el daño por helada se debe principalmente por temperaturas por debajo a 0°C antes o después de la brotación en la primavera (Rodrigo, 2000). El cultivar Sweetheart presentó el mayor daño de primordios florales en ambas temporadas (Fig. 3a,b y 4a,b), coincidente con la localidad que presentó el mayor registro de días con temperaturas bajo 0°C, especialmente entre el periodo de agosto a octubre (Figura 5). Estudios anteriores describen que estos factores influyen en el nivel de daño por congelación (Strang et al., 1980b). El daño observado es altamente dependiente de la etapa de desarrollo de las yemas florales, las cuales se relacionan con un aumento en la vulnerabilidad de manera progresiva a bajas temperaturas (Rodrigo, 2000; Longstroth, 2013; Salazar-Gutiérrez et al., 2014; Salazar-Gutiérrez et al., 2016; Matzneller et al., 2015). Además, se ha demostrado que la probabilidad de daño por helada aumenta, cuando la resistencia es baja y la probabilidad de exposición a heladas es alta (Charrier, 2015). En este sentido, se ha reportado que la aplicación de cianamida hidrogenada adelantó la floración en damasco, provocando daño en flores expuesta a helada (Lemus et al., 1989). En nuestro estudio, la aplicación de cianamida hidrogenada favoreció solo levemente una mayor incidencia de heladas en primordios florales por efecto de la fecha de floración; en este caso la fecha del cultivar fue más determinante (Fig. 3 y 4). Así en ambas temporadas la incidencia de daño de primordios en cultivares con floración tardía como 'Regina' fue inferior a la de cultivares de floración más anticipada como 'Sweetheart' (Fig. 3 y 4).

Los resultados de este estudio demostraron que tanto en condiciones de campo y laboratorio, la formulación de polímero PVA presentó un efecto positivo en inhibir el daño por heladas en primordios florales del cerezo, lo que puede deberse a la acción de este polímero en la inhibición de cristalización del agua. Previos estudios, han mostrado que el tratamiento con PVA al 0,1% y 1% mejoraron significativamente la supervivencia de plantas de papa durante el proceso de crioconservación (Zhao et al., 2005). Estos resultados indican que bajos niveles de PVA podrían inhibir la formación de hielo durante la crioconservación (Wowk et al., 2000). Además, se ha reportado que el PVA, es el único polímero no peptídico conocido, capaz de inhibir el aumento del tamaño de los cristales de hielo de manera similar a las proteínas anticongelantes. Otros

estudios, han demostrado que la capacidad del polímero PVA de la inhibición de la recristalización del hielo puede derivar por un aumento de la concentración molar, el peso molecular y del grado de hidrólisis que presenta este polímero (Inada y Lu., 2003). Otro aspecto relevante tiene que ver con la acción del polímero sobre la modificación y aumento del pH, pues en un medio más alcalino, se restringe con mayor fuerza el crecimiento del hielo, por lo que los enlaces de hidrógeno juegan un rol importante en la actividad de inhibir la recristalización del hielo de PVA (Burkey et al., 2018). Cabe destacar que la formulación F3 tuvo una tendencia más marcada en reducir el daño por helada en primordios florales (Fig. 3,4 y 6). Esta mayor efectividad de la formulación F3 puede deberse al menor tamaño de las nanopartículas que pueden ser más efectivas en la disminución de la recristalización del hielo (Congdon et al., 2013). La mayor efectividad de formulaciones de PVA se puede deber a la combinación de emulsionante o agentes estabilizantes de nanopartículas como PVP y Tween, que se adicionaron en esta formulación al PVA. Se ha demostrado que el uso de surfactantes o emulsionantes mejoran la estabilidad y capacidad de absorción de agroquímicos en los tejidos vegetales, lo que podría explicar la mayor efectividad del polímero al mejorar su penetración en los tejidos de la yema floral del cerezo (Stock y Holloway, 1993).

En general las formulaciones de polímero en base a PVA no afectaron negativamente los parámetros la calidad de la fruta (diámetro, firmeza, azúcares), cuando fue evaluado al momento de la cosecha de fruta en ambas temporadas y en los tres cultivares. De hecho, en algunos casos se observó cierto efecto positivo de las formulaciones en el incremento de diámetro y firmeza de frutos. Esto demostraría que el uso de polímeros a base de PVA no estaría alterando la fisiología del crecimiento y desarrollo de los frutos, como ha sido reportado en otras especies frutales y con otro tipo de polímeros aplicados en precosecha (Brillante et al., 2016).

CONCLUSIONES

La mayor incidencia de daño por helada en primordios florales se apreció en el cultivar Sweetheart, debido a que en esta condición se registró una mayor duración e intensidad de temperaturas bajo 0°C en ambas temporadas.

Tanto en condiciones de campo y de laboratorio, se observó que las formulaciones de polímero PVA F3-15 y F3-30 fueron más efectivas en reducir el daño por helada en yemas de cerezo, lo que podría ser consecuencia a la presencia de nanopartículas de PVA de estas formulaciones, ya que incluye la adición de ciertos agentes estabilizantes de nanopartículas.

Las formulaciones en base a PVA junto a agentes estabilizantes fueron efectivos en reducir el daño por helada en primordios florales expuesto a una temperatura de -5°C durante 4 horas.

La aplicación de los polímeros F3-15 y F3-30, no afectaron negativamente las principales características de calidad de fruta para cerezas de exportación, tales como el diámetro, sólidos solubles y la firmeza.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado gracias al apoyo financiero del Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDEF N°ID16110425

Agradezco al Centro de Investigación en Polímeros Avanzados (CIPA), CONICYT Regional, GORE BIO BIO, R17A10003 y a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Concepción, principalmente al equipo de Fruticultura por su apoyo, aprendizaje brindado durante el proceso de formación.

LITERATURA CITADA

- Albrecht, E., Schmitz-Eiberger, M., Brauckmann, M., Rademacher, W., Noga, G. 2004. Use of Prohexadione-Calcium, Vitamin E, and Glycerine for the reduction of Frost Injury in Apple (*Malus domestica*) Flowers and Leaves. *Europ. J. Hort. Sci*, 69 (2): 59-65.
- Augspurger, C. 2013. Reconstructing patterns of temperature, phenology, and frost damage over 124 years: Spring damage risk is increasing. *Ecology*, 94 (1): 41-50.
- Balzarini, M., González, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J., y Robledo. CW. 2008. InfoStat: software estadístico. Manual del usuario. Versión 2008. Brujas. Córdoba, Argentina.
- Budke, C. and Koop, T. 2006. Ice Recrystallization Inhibition and Molecular Recognition of Ice Faces by Poly (vinyl alcohol). *Chem. Phys. Chem*, 7: 2601–2606.
- Burkey, A., Riley, C., Wang, L., Hatridge, T., Lynd, N. 2018. Understanding Poly (vinyl alcohol)-Mediated Ice Recrystallization Inhibition through Ice Adsorption Measurement and pH Effects. *Biomacromolecules*, 19: 248–255.
- Brillante, L., Belfiore, N., Gaiotti, F., Lovat, L., Sansone, L., Poni, S., Tomasi. D. 2016. Comparing Kaolin and Pinolene to Improve Sustainable Grapevine Production during Drought. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156631>.
- Charrier, G., Ngao, J., Saudreau, M., Améglio, T. 2015. Effects of environmental factors and management practices on microclimate, winter physiology, and frost resistance in trees. *Frontiers in Plant Science*, 259 (6): 1 – 18.
- Cittadini, E., Ridder, N., Peri, P., Van Keulen, H. 2006. A method for assessing frost damage risk in sweet cherry orchards of South Patagonia. *Agricultural and Forest Meteorology*, 141: 235–243.
- Congdon, T., Notman, R., Gibson, M. 2013. Antifreeze (Glyco) protein Mimetic Behavior of Poly (vinyl alcohol): Detailed Structure Ice Recrystallization Inhibition Activity Study. *Biomacromolecules*, 14: 1578–1586.

Evans, R.G. 2000. The art of protecting grapevines from low temperature injury. Proc. ASEV 50th Anniversary Annual Mtg., Seattle WA, 19–23 June. p. 60–72. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 80 (1): 1–13.

Fadón, E., Herrero, M., Rodrigo, J. 2015. Desarrollo floral de cerezo según escala BBCH. XIV Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas.

Ghaemi, A., Rafiee, M., Sepaskhah. A. 2009. Tree-Temperature Monitoring for Frost Protection of Orchards in Semi-Arid Regions Using Sprinkler Irrigation. Agricultural Sciences in China, 8(1): 98 – 107.

Inada, T and Lu, S. 2003. Inhibition of Recrystallization of Ice Grains by Adsorption of Poly (Vinyl Alcohol) onto Ice Surfaces. Crystal Growth & Design, 3 (5): 747 – 752.

Lemus, G., Gálvez, S., Valenzuela. J. 1989. Floración y brotación con cianamida hidrogenada. IPA La Platina N°52.

Longstroth, M., and Perry, R. 1996. Selecting the orchard site, orchard planning and establishment. (Eds.), Cherries: Crop physiology, production and uses. CAB International, Cambridge, UK, 203–221.

Longstroth, M. 2013. Assessing frost and freeze damage to flowers and buds of fruit trees. Michigan State University Extension. Consultado el día 8 de julio de 2017. Disponible en http://msue.anr.msu.edu/news/assessing_frost_and_freeze_damage_to_flowers_and_buds_of_fruit_trees

Luedeling, E. 2012. Climate change impacts on winter chill for temperate fruit and nut production: A review. Scientia Horticulturae, 144: 218–229.

Matzneller, P., Götz, K., Chmielewski, F. 2015. Spring frost vulnerability of sweet cherries under controlled conditions. Int. J. Biometeorology, 60: 123–130.

Mosedale J, Wilson R, Maclean I. 2015. Climate Change and Crop Exposure to Adverse Weather: Changes to Frost Risk and Grapevine Flowering Conditions. PLoS ONE 10(10): e0141218. doi:10.1371/journal.pone.0141218.

ODEPA. 2019. Catastro Frutícola. Superficie nacional. Consultado el 10 de marzo del 2019. Disponible en <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/estadisticas-productivas>.

Rodrigo J. 2000. Spring frosts in deciduous fruit trees — morphological damage and flower hardiness. *Scientia Horticulturae*, 85 (3, 4): 155 – 173.

Salazar-Gutierrez, M., Chaves, B., Anothai, J., Whiting, M., Hoogenbooma, G. 2014. Variation in cold hardiness of sweet cherry flower buds through different phenological stages. *Scientia Horticulturae*, 172: 161–167.

Salazar-Gutiérrez, M., Chaves, B., Hoogenboom, G. 2016. Freezing tolerance of apple flower buds. *Scientia Horticulturae*, 198: 344–351

Snyder, R y Melo-Abreu. P. 2010. Protección contra las heladas: fundamentos, práctica y economía. 1, 257.

Stock, D. and Holloway, P. 1993. Possible mechanisms for surfactant-induced foliar uptake of agrochemicals. *Pest Management Science*, 38: 165 – 177.

Strang, J., Lombard, P., Westwood, M., Weiser, C. 1980b. Effect of duration and rate of freezing and tissue hydration of 'Barlett' pear buds, flowers, and small fruits. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 105: 102 – 107.

Unterberger, C., Brunner, L., Nabernegg, S., Steininger, KW., Steiner, AK., Stabentheiner, E., Monschein, S., Truhetz, H. 2018. Spring frost risk for regional apple production under a warmer climate. *PLoS ONE* 13 (7): e0200201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200201>.

Wowk, B., Leitel, E., Rasch, C, Mesbah-Karimi., N, Harris S., Fahy, G. 2000. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*, 40: 228–236.

Wowk, B and Fahy, G. 2002. Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers. *Cryobiology*, 44: 14–23.

Yuri, J.A., Lepe, V., Sepúlveda, A. 2018. Heladas en fruticultura. Una mirada desde Chile. *Revista de Fruticultura*, 66: 7 – 17.

Zhao, M., Xhu, Y., Dhital, S., Khu, D., Song, Y., Wang, M., Lim, H. 2005. An efficient cryopreservation procedure for potato (*Solanum tuberosum* L.) utilizing the new ice blocking agent, Supercool X1000. *Plant Cell Rep.*, 24: 477–481.



CAPITULO 3

CONCLUSIONES GENERALES

1. La incidencia de daño por congelación en primordios florales se relaciona con la intensidad y duración de la helada en los tres cultivares, en ambas temporadas, acrecentándose aún más el daño, en estados fenológicos más vulnerable del cerezo, pudiendo reducir significativamente los rendimientos del cultivo.
2. El efecto de la cianamida hidrogenada no provocó en todos los cultivares mayor daño por helada en primordios florales, sino que se observó mayor incidencia al daño en cultivares de cerezo con floración más tardía como 'Sweetheart' y 'Regina'. Esto indica que este método no posee grandes ventajas para la evaluación de agentes crioprotectores en cerezo, bajo condiciones de campo.
3. La utilización de cámara de frío es una buena técnica para estudiar el efecto de agente crioprotectores sobre el control de daño por heladas en yemas y dardos de cerezo. Sin embargo, aspectos de nutricionales y balance hídrico podrían alterar estas respuestas, al trabajar con dardos desconectados de la planta.
4. Las formulaciones de polímero PVA F3-15 y F3-30 presentaron el efecto más significativo en la reducción de daño por helada en primordios florales en cerezo, siendo candidatas más promisorias para el control de heladas en huertos frutales; las características químicas en cuanto a la adición surfactante y emulsionantes, es determinante en esta efectividad.
5. Los formulados de polímero en base a PVA no alteraron las características de calidad de frutos en cerezas para la exportación.