

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**USO DE LEVADURAS PRETRATADAS CON TREHALOSA PARA EL
CONTROL DE LA PUDRICIÓN OJO DE BUEY CAUSADA POR *PHLYCTEMA*
VAGABUNDA EN MANZANAS ORGÁNICAS**

POR

JUAN IGNACIO SALAZAR ORMEÑO

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE
2024**

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**USO DE LEVADURAS PRETRATADAS CON TREHALOSA PARA EL
CONTROL DE LA PUDRICIÓN OJO DE BUEY CAUSADA POR *PHLYCTEMA*
VAGABUNDA EN MANZANAS ORGÁNICAS**

POR

JUAN IGNACIO SALAZAR ORMEÑO

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN - CHILE
2024**

Aprobada por:

Profesor Asociado. Marisol Vargas C.
Ing. Agrónomo, Dr.

Guía

Profesor Asociado. Macarena Gerding G.
Ing. Agrónomo, Ph. D.

Asesor

Ximena Sepúlveda B.
Ing. Agrónomo, M. Sc. Dr.

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.
Ing. Agrónomo, M. Sc.

Decano

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	1
Summary.....	1
Introducción	2
Materiales y Métodos	4
Resultados y Discusión	9
Conclusiones	16
Referencias	16
Anexos	21

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS

	Página
Figura 1 Incidencia y severidad de la enfermedad Ojo de buey en manzanas 'Cripps Pink'. Tratadas con las levaduras <i>V. victoriae</i> EPL 29.5 y <i>M. guilliermondii</i> M11 pretratadas a distintas concentraciones de trehalosa (T1= 0, T2= 1 %, T3= 1,5 %, T4= 2 % y T5= 2,5 %). Las manzanas fueron almacenadas a 20°C por 15 días.....	10
Figura 2 Incidencia de la enfermedad Ojo de buey en manzanas 'Cripps Pink' tratadas en precosecha con una mezcla 50/50 de las levaduras <i>V. victoriae</i> EPL 29,5 y <i>M. guilliermondii</i> M11 (1×10^7 células mL ⁻¹) (T1) o una mezcla 50/50 de las levaduras <i>V. victoriae</i> EPL 29,5 y <i>M. guilliermondii</i> M11 (1×10^7 células mL ⁻¹) pretratadas con trehalosa al 1,5 % (T3). La fruta cosechada se almacenó por 5 meses a 0°C más 15 días a 20°C.....	12
Figura 3 Población de levaduras epífitas (A) y endófitas (B) en manzanas 'Cripps Pink' tratadas en precosecha con una mezcla 50/50 de las levaduras <i>V. victoriae</i> EPL 29,5 y <i>M. guilliermondii</i> M11 (1×10^7 células mL ⁻¹) (T1) o una mezcla 50/50 de las levaduras <i>V. victoriae</i> EPL 29,5 y <i>M. guilliermondii</i> M11 (1×10^7 células mL ⁻¹) pretratadas con trehalosa al 1,5 % de trehalosa (T3). La fruta se almaceno por 5 meses a 0°C más 15 días a 20°C. Asterisco indica cosecha.....	13
Figura 4 Incidencia de la enfermedad Ojo de buey en manzanas 'Cripps Pink' tratadas en postcosecha con una mezcla 50/50 de las levaduras <i>V. victoriae</i> EPL 29,5 y <i>M. guilliermondii</i> M11 (1×10^7 células mL ⁻¹) (T1) o una mezcla 50/50 de las levaduras <i>V. victoriae</i> EPL 29,5 y <i>M. guilliermondii</i> M11 (1×10^7 células mL ⁻¹) pretratadas con trehalosa al 1,5 % (T3). Las manzanas fueron almacenadas por 5 meses a 0°C más 15 días a 20°C.....	14
Figura 5 Población de levaduras epífitas (A) y endófitas (B) en manzanas 'Cripps Pink' tratadas en postcosecha con una mezcla 50/50 de las levaduras <i>V. victoriae</i> EPL 29,5 y <i>M.</i>	

	<i>guilliermondii</i> M11 (1×10^7 células mL ⁻¹) (T1) o una mezcla 50/50 de las levaduras <i>V. victoriae</i> EPL 29,5 y <i>M. guilliermondii</i> M11 (1×10^7 células mL ⁻¹) pretratadas con trehalosa al 1,5 % (T3). Las manzanas fueron almacenadas por 5 meses a 0°C más 15 días a 20°C.....	15
Tabla 1	Tratamientos utilizados en el ensayo <i>in vivo</i>	6
Tabla 2	Tratamientos utilizados en ensayo de campo.....	7
Tabla 3	Tratamientos utilizados en ensayo de postcosecha.....	8
Anexo 1	Condiciones climáticas durante el ensayo de campo. Precipitaciones se muestran por columnas y la temperatura media por líneas. Flechas indica aplicación de tratamientos.....	21

LEVADURAS COMO AGENTES DE BIOCONTROL PARA LA PUDRICIÓN OJO DE BUEY CAUSADA POR *PHLYCTEMA VAGABUNDA* EN UN HUERTO DE MANZANAS ORGÁNICAS

YEASTS AS BIOCONTROL AGENTS FOR BULL'S EYE ROT CAUSED BY *PHLYCTEMA VAGABUNDA* IN AN ORGANIC APPLE ORCHARD

Palabras índice adicionales: Control biológico, *Malus domestica*, *Neofabraea vagabunda*, Postcosecha.

RESUMEN

La pudrición Ojo de buey, causada por *Phlyctema vagabunda* es una importante enfermedad de postcosecha en manzanas. Las principales estrategias de control consisten en la aplicación de fungicidas sintéticos, los que representan un gran riesgo para la salud humana. Esto último a derivado en la necesidad de buscar alternativas de control, como el control biológico, el cual es una de las opciones más prometedoras. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad biocontroladora de las levaduras *Vichniacosima victoriae* EPL 29.5 y *Meyerozyma guilliermondii* M11, pretratadas con trehalosa a distintas concentraciones, contra *P. vagabunda*. Los aislados de levadura EPL 29.5 más M11 pretratadas con 1,5 % de trehalosa redujeron un 100 % la incidencia y severidad de *P. vagabunda* en manzanas 'Cripps Pink'. La aplicación de la mezcla de levaduras sobre las manzanas en precosecha, no redujo la enfermedad en la postcosecha, ya que a los 5 meses de almacenamiento a 0°C no se observaron diferencias en la incidencia de Ojo de Buey entre las manzanas tratadas y el control. Al evaluar el efecto curativo de las levaduras sobre la incidencia natural de Ojo de buey, se observó que estas redujeron la incidencia de *P. vagabunda* en un 10 % luego de 3 meses de almacenamiento de la fruta a 0°C, pero a los 5 meses no se observaron diferencias en la incidencia de la enfermedad, con respecto al control.

SUMMARY

Bull's eye rot, caused by *Phlyctema vagabunda*, is an important postharvest disease of apples. The main control strategies consist of the application of synthetic

fungicides, which represent a great risk to human health. The latter has led to the need to look for control alternatives, such as biological control, which is one of the most promising options. The objective of this research was to evaluate the biocontrol capacity of the yeasts *Vichniacosima victoriae* EPL 29.5 and *Meyerozyma guilliermondii* M11, pretreated with trehalose at different concentrations, against *P. vagabunda*. Yeast isolates EPL 29.5 plus M11 pretreated with 1.5 % trehalose in vivo reduced the incidence and severity of *P. vagabunda* on 'Cripps Pink' apples by 100 %. When the yeast mixture was applied to apples pre-harvest, it was observed that after 5 months of storage at 0°C, no differences in the incidence of walleye were observed between the treated apples and the control. When evaluating the curative effect of yeasts on the natural incidence of walleye, it was observed that they reduced the incidence of *P. vagabunda* by 10 % after 3 months of storage of the fruit at 0°C. At 5 months of storage, no differences were observed in the incidence of the disease in the fruit with respect to the control.

INTRODUCCIÓN

En Chile, la manzana (*Malus domestica* Borkh) es un cultivo de gran importancia económica con 29.035 ha plantadas, de las cuales, 2.650 ha corresponden a producción orgánica (Eguillor, 2022). Durante el año 2022 se exportaron 602.478 toneladas, equivalentes a USD 518,4 millones FOB (ODEPA, 2023), el 3,3 % corresponde a producción orgánica (USD 24 millones FOB) (ODEPA, 2023). Los principales cultivares exportados fueron las del tipo Gala y Cripps Pink con una participación del 47 y 17 % respectivamente (Asoex, 2023) Los principales destinos de la manzana chilena fueron Colombia (14 %), EE. UU. (12 %) y Brasil (10 %) (ODEPA, 2023).

Las mayores pérdidas de esta fruta están asociadas a pudriciones causadas principalmente por hongos como *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Phlyctema vagabunda* (Lolas y Díaz, 2016), este último es el más importante, ya que, afecta principalmente a cultivares de cosecha tardía como 'Cripps Pink' (Soto-Alvear et al., 2013). En Chile, *P. vagabunda* fue reportada por primera vez en 2005 (Henríquez, 2005), y fue descrito como el agente causal primario de la enfermedad

Ojo de buey, hasta la detección de *Neofabraea perennans* en 2020 (González *et al.*, 2020).

La infección de la fruta ocurre en el huerto durante toda la temporada (Henríquez *et al.*, 2004) y es favorecida por abundantes lluvias y temperaturas cercanas a los 20°C (Lolas, 2005). Los síntomas aparecen en la postcosecha después de 3-5 meses de almacenamiento en frío, observándose lesiones individuales o numerosas en una sola fruta (Spotts *et al.*, 2009). Las incidencias alcanzan un 30 % después de 120 días de almacenamiento en cámaras de frío (Lolas, 2005), sin embargo, en la producción orgánica la incidencia puede ser de 80-90 %. El patógeno ingresa por heridas o cavidades lenticelares, las lesiones son circulares necróticas, suelen ser planas o ligeramente cóncavas de color marrón con anillos concéntricos y los tejidos afectados son relativamente firmes y se desprenden fácilmente del tejido sano (Soto-Alvear *et al.*, 2013).

Las estrategias de control para esta enfermedad incluyen la eliminación de restos de poda y fruta madura dejada después de la cosecha (Wenneker y Thomma, 2020), además de la aplicación de hidróxido de cobre, fosfito de potasio (Soto-Alvear *et al.*, 2012) o el fungicida de contacto fludioxonil con el cual la incidencia de la enfermedad sigue estando cercana al 35 % (Lolas *et al.*, 2016). Sin embargo, la creciente preocupación sobre el riesgo que representa el uso de fungicidas para la salud humana, la contaminación ambiental y el desarrollo de resistencia a los fungicidas (Jurick *et al.*, 2017), ha conllevado a la búsqueda de nuevas estrategias de control para las enfermedades de postcosecha, que sean respetuosas con el medio ambiente y seguras para el consumo humano, bajo esta premisa la alternativa más estudiada es el control biológico (Syed Ab Rahman *et al.*, 2018).

El control biológico consiste en la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en un estado activo o dormante, por uno o más organismos, realizado de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o de los antagonistas del patógeno (Baker y Cook, 1974). La utilización de microorganismos antagonistas ha sido reconocida como una de las alternativas promisorias al uso de fungicidas (Spadaro y Droby, 2016). Entre estos microorganismos las levaduras han

demostrado ser efectivas frente a los principales patógenos asociados a las pudriciones en manzanas (Sanzani *et al.*, 2021; Gomomo *et al.*, 2022; Sepúlveda *et al.*, 2022; Settler-Ramírez *et al.*, 2022).

La aplicación de microorganismos antagonistas no siempre provee un control de enfermedades de postcosecha comercialmente aceptable (Qin *et al.*, 2015), por tanto, el biocontrol por parte de las levaduras debe ser mejorado antes de desarrollar una alternativa económicamente factible (Zhou *et al.*, 2014). En este sentido distintos estudios han demostrado que el pretratamiento con trehalosa mejora la capacidad biocontroladora de las levaduras frente a diferentes patógenos (Apaliya *et al.*, 2018; Nie *et al.*, 2019; Dhanasekaran *et al.*, 2021).

La trehalosa es un disacárido no reductor compuesto por dos subunidades de glucosa unidas por un enlace α -1,1-glicosídico (Kosar *et al.*, 2019), que en levaduras funciona generalmente como metabolito protector frente a diversos tipos de estrés (Li y Tian, 2006); como por ejemplo, frente al estrés oxidativo, la trehalosa exógena en la levadura aumenta la expresión de los genes que codifican para las enzimas Tiorredoxina Reductasa y Catalasa (Nie *et al.*, 2019); en el estrés por calor estabiliza proteínas y membranas celulares (Péter *et al.*, 2021); en el estrés por desecación protege las proteínas citosólicas, ya que la trehalosa tiene la capacidad de formar un cristal líquido amorfo dentro de las células en ausencia de agua (Kim *et al.*, 2018); en el estrés por congelación se sugiere que la trehalosa actúa como un sustituto del agua que rodea las biomoléculas en condiciones de baja actividad de agua, ayudando a mantener sus estructuras tridimensionales al proporcionar hidrógeno (Chen y Gibney, 2022).

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio en laboratorio

Los estudios se realizaron en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, Campus Chillán.

Fruta

Se utilizaron manzanas 'Cripps Pink' sin heridas visibles, cosechadas desde un huerto orgánico de la Región de Ñuble. En el momento de su utilización las manzanas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 0,5 %

durante 5 minutos, se enjuagaron 3 veces con agua destilada, se depositaron en bandejas y se secaron al aire.

Patógeno y obtención de inóculo

El patógeno utilizado corresponde a un aislado de *P. vagabunda*, el cual se obtuvo desde la colección de microorganismos del laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Concepción, Campus Chillán.

Para la obtención del inóculo de *P. vagabunda*, se cortaron discos de 5 mm de diámetro de micelio del hongo en crecimiento activo. Estos se sembraron en placa Petri con 20 mL de medio Agar Tomate (AT) e incubados en oscuridad a 5 °C por 14 días (Cameldi *et al.*, 2017). Las conidias se obtuvieron por raspado de la superficie, luego fueron suspendidas en agua destilada estéril y se ajustaron a una concentración de 5×10^5 conidias mL⁻¹, empleando para ello una cámara de Neubauer.

Levaduras antagonistas y obtención de inóculo

Se utilizaron las especies de levaduras *Vichniacosima victoriae* EPL 29.5 y *Meyerozyma guilliermondii* M11, las cuales fueron seleccionadas por su actividad antagonista frente a *P. vagabunda* (Sepúlveda *et al.*, 2022). Estas levaduras pertenecen a la colección de microorganismos del laboratorio de fitopatología de la Universidad de Concepción, Campus Chillán.

Para la obtención del inóculo las levaduras se cultivaron en medio caldo Melaza, a 20 °C por 72 horas en agitación constante a 150 rpm. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Finalmente, las suspensiones se ajustaron a una concentración de 1×10^9 células mL⁻¹, mediante una cámara de Neubauer.

Determinación de la eficacia de biocontrol de las levaduras *V. victoriae* EPL 29.5 y *M. guilliermondii* M11 pretratadas con trehalosa sobre Ojo de buey

Los aislados M11 y EPL 29.5 se cultivaron en medio de caldo melaza enriquecida con trehalosa en concentraciones 0 %, 1 %, 1.5 %, 2 % y 2.5 % (Tabla 1), bajo las condiciones que se describen en el apartado anterior. Posteriormente a manzanas 'Cripps Pink' sanas se le realizaron 2 heridas de 3 mm de diámetro y 15 mm de

profundidad en el eje ecuatorial utilizando una punta de micropipeta estéril y se inocularon con 20 µL de la mezcla 50/50 de los aislados M11 y EPL 29.5, de acuerdo con cada tratamiento (Tabla 1) (Apaliya *et al.*, 2018), 24 h después las heridas se inocularon con 20 µL de una suspensión del patógeno (5×10^5 conidias mL⁻¹). En el tratamiento control, los 20 µL de la mezcla de levaduras más trehalosa fueron reemplazados por agua destilada estéril. Luego de 15 días de almacenamiento a 20°C se determinó la incidencia y severidad de la pudrición mediante las fórmulas descritas por Vero *et al.* (2002).

Tabla 1. Tratamientos utilizados en el ensayo *in vivo*

Tratamientos	Concentración de trehalosa (%)
T0 (Control)	Agua destilada
T1	0
T2	1
T3	1,5
T4	2
T5	2,5

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de frutos con pudrición}}{\text{N}^\circ \text{ total de frutos}} \times 100$$

$$\text{Severidad (\%)} = \frac{\text{Diámetro promedio de heridas tratadas con el antagonista}}{\text{Diámetro promedio de las heridas inoculadas en el control}} \times 100$$

Para determinar la eficacia de biocontrol de las levaduras pretratadas con trehalosa se utilizó un diseño completamente al azar, donde la unidad experimental fueron 6 manzanas con 2 heridas cada una y cada tratamiento tuvo tres repeticiones.

Estudios en campo

Ubicación del campo experimental. El ensayo en campo se realizó en un huerto comercial de manzanas orgánicas (*Malus domestica*) var. Cripps Pink, perteneciente a la Agrícola Santa Isabel de Cato SA, ubicada en la comuna de Cato, Región de Ñuble (36°33' S, 71°41' W; a 229 m.s.n.m.).

Obtención de inóculo. Las levaduras se activaron en medio Caldo Levadura: Peptona Dextrosa (CLPD), a 20 °C por 72 horas en agitación. Luego de este

período, se tomaron 5 mL del inóculo y se depositaron en botellas de 1 L conteniendo 500 mL de caldo melaza y/o 500 mL de caldo melaza con 1,5 % de trehalosa. Se mantuvieron a 20 °C por 72 horas en agitación. Finalmente, las levaduras se precipitaron mediante centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos. Las células de levadura se contabilizaron en una cámara Neubauer y en campo se resuspendieron en agua, quedando a una concentración de 1×10^7 células mL⁻¹.

Efectividad de la aplicación en campo de levaduras *V. victoriae* EPL 29.5 y *M. guilliermondii* M11 pretratadas con trehalosa sobre la enfermedad Ojo de buey

Árboles var. 'Cripps Pink' se le aplicó 1L de la mezcla de levaduras, de acuerdo con cada tratamiento (Tabla 2), 60, 45, 34, 19 y 15 días antes de la cosecha (Leibinger *et al.*, 1997). En el tratamiento control, la mezcla de levaduras fue reemplazada por el manejo del huerto (Serenade Aso y Microlife Bio Potasio). Las manzanas de los árboles tratados fueron cosechadas y almacenadas durante 5 meses a 0°C más 15 días a 20°C (Soto-Alvear *et al.*, 2013), para luego determinar la incidencia de la enfermedad obtenida en cada tratamiento.

Tabla 2. Tratamientos utilizados en ensayo de campo.

Tratamientos	Descripción
T0 (control)	(Serenade Aso 6 L/ha ⁻¹ + Microlife Bio Potasio 4 L/ha ⁻¹)
T1	Mezcla 50/50 de levaduras <i>V. victoriae</i> EPL 29.5 y <i>M. guilliermondii</i> M11
T2	Mezcla 50/50 de levaduras <i>V. victoriae</i> EPL 29.5 y <i>M. guilliermondii</i> M11 pretratadas con trehalosa al 1.5 %

Durante la postcosecha se realizaron muestreos periódicos para determinar la población total de levaduras en la fruta. Para ello, se utilizaron 12 manzanas seleccionadas desde 3 cajas por cada tratamiento. Los muestreos en campo fueron realizados después de cada aplicación (5 muestreos) y durante el almacenamiento de la fruta en cámara de frío se realizaron muestreos cada 45 días (3 muestreos). Para determinar la eficacia de biocontrol de las levaduras, se utilizó un diseño de bloques completamente al azar, los bloques se distribuyeron en el sentido de las hileras, dispuestas con orientación norte a sur y se establecieron 9 repeticiones

donde la unidad experimental correspondió a un árbol. Las evaluaciones se realizaron a los árboles centrales, para evitar el efecto borde.

Evaluación del efecto curativo de las levaduras pretratadas con trehalosa sobre la incidencia natural de Ojo de buey.

Manzanas cv. 'Cripps Pink' sanas fueron sumergidas en una suspensión de levaduras de acuerdo con cada tratamiento (Tabla 3). Posteriormente las manzanas fueron secadas a temperatura ambiente y almacenadas durante 5 meses a 0°C más 15 días a 20°C (Soto-Alvear *et al.*, 2013). Luego de este período se determinó la incidencia de la pudrición con las fórmulas descritas anteriormente.

Tabla 3. Tratamientos utilizados en el ensayo de postcosecha.

Tratamientos	Descripción
T0 (control)	Sin sumergir
T1	Mezcla 50/50 de <i>V. victoriae</i> EPL 29.5 y <i>M. guilliermondii</i> M11
T2	Mezcla 50/50 de <i>V. victoriae</i> EPL 29.5 y <i>M. guilliermondii</i> M11 pretratadas con trehalosa al 1.5 %

Durante todo el ensayo se realizaron muestreos periódicos para determinar la población total de levaduras en la fruta. Se utilizaron 12 manzanas desde 3 cajas por tratamiento. Los muestreos fueron realizados cada 30 días (5 muestreos).

Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar, donde la unidad experimental fue una caja con 100 manzanas y se establecieron 7 repeticiones.

Determinación de las poblaciones de levaduras. Para evaluar la población de levaduras epífitas en la fruta cosechada en cada uno de los ensayos descritos anteriormente, las manzanas fueron lavadas superficialmente con 5 mL de solución salina al 0,9 %. La suspensión obtenida fue diluida y de esa dilución se sembró 100 μ L en medio Agar Levadura Peptona Dextrosa (ALPD) que contenía 0,05 g/L⁻¹ de estreptomycin y cloranfenicol. Las placas fueron incubadas a 20 °C por 3 días para determinar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por manzana.

Para determinar la población de levaduras endófitas en la fruta cosechada en los ensayos descritos anteriormente, las manzanas fueron desinfectadas

individualmente y se trataron según el siguiente esquema: etanol al 70 % por 30 min; hipoclorito de sodio al 2 % por 30 min; etanol al 70 % por 30 s; y agua destilada estéril durante 10 minutos (Glushakova y Kachalkin, 2017). Parte del exocarpo fue removido con un bisturí y macerado con 5 mL de tampón fosfato (0.5 M; pH 6.5), 100 µL de la suspensión obtenida se sembró en medio ALPD que contenía 0,05 g/L⁻¹ de estreptomycin y cloranfenicol. Las placas se incubaron a 20 °C por 7 días para determinar las UFC por manzana.

Análisis estadístico

Los datos cuantitativos obtenidos se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilks para verificar su normalidad y a la prueba de Barlett para comprobar la homogeneidad de varianzas u homocedasticidad. Los datos que no presentaron distribución normal fueron transformados utilizando la función $y = \arcseno(x/100)^{1/2}$. Posteriormente a la transformación, los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5 % ($p \leq 0,05$). Para la separación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). Todos los datos determinados fueron analizados con el software estadístico INFOSTAT versión 2020e (FCA-UNC, Córdoba, Argentina).

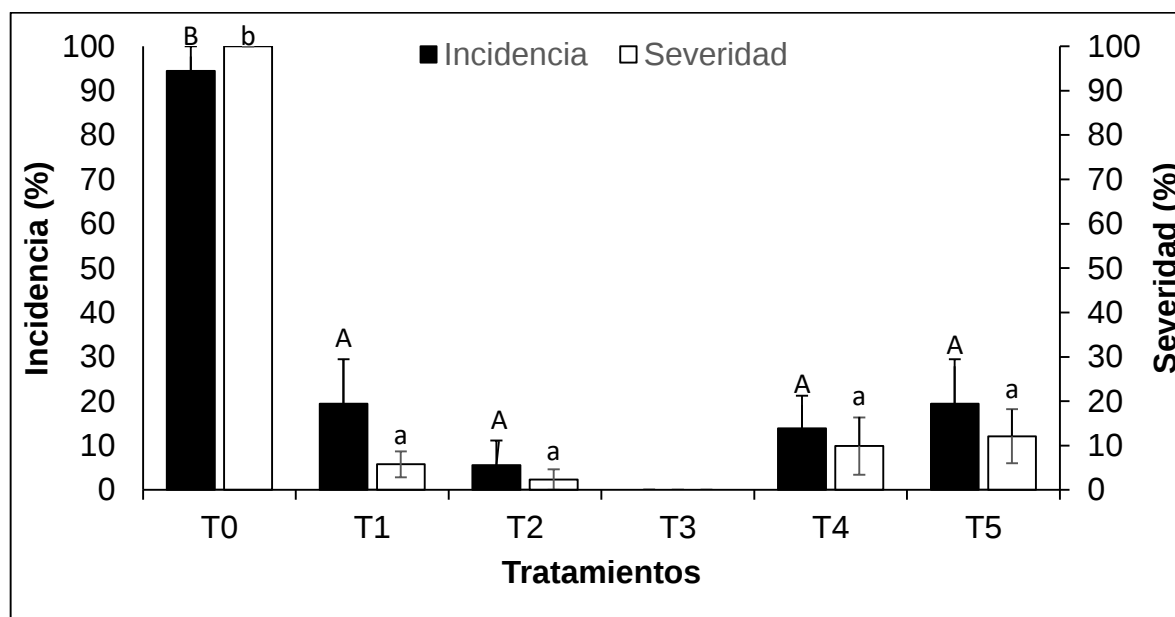
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la eficacia de biocontrol de las levaduras *V. victoriae* EPL 29.5 y *M. guilliermondii* M11 pretratadas con trehalosa sobre la enfermedad Ojo de buey

Al evaluar la actividad antagonista de la mezcla de levaduras *V. victoriae* EPL 29.5 y *M. guilliermondii* M11 pretratadas con trehalosa a distintas concentraciones (Tabla 1) se pudo observar que en todos los tratamientos se redujo la incidencia de Ojo de buey en manzanas entre 79 y 100 %; mientras que para la severidad entre 87 % y 100 %, siendo todos los tratamientos estadísticamente distintos al control ($p \leq 0,05$ según la prueba de Tukey) (Figura 1). Los aislados EPL 29.5 más M11 redujeron la incidencia en un 79 % y la severidad en un 93 % cuando la fruta fue almacenada a 20 °C durante 15 días (Figura 1). La utilización de la mezcla de estas especies de levaduras como agentes de biocontrol para la enfermedad Ojo de buey no ha sido

reportado anteriormente. Sin embargo, Sepúlveda *et al.* (2022), informó que *V. victoriae* EPL29.5 era capaz de reducir la incidencia y severidad de Ojo de buey en un 60 % y 70 %, respectivamente.

Figura 1. Incidencia y severidad de la enfermedad Ojo de buey en manzanas 'Cripps Pink', tratadas con la mezcla de las levaduras *V. victoriae* EPL 29.5 y *M. guilliermondii* M11 pretratadas a distintas concentraciones de trehalosa (T1= 0 %, T2= 1 %, T3= 1,5 %, T4= 2 % y T5= 2,5 %). Las manzanas fueron almacenadas a 20 °C por 15 días.



Letras distintas representan diferencia significativa entre tratamiento de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras representan error estándar.

Cabe destacar que, cuando la mezcla de levaduras fue pretratada con trehalosa al 1,5 %, y aplicada en la fruta, se observó un 0 % de incidencia y severidad de Ojo de buey (Figura 1). Distintos estudios han demostrado que el pretratamiento de levaduras con trehalosa mejora la capacidad de control de las levaduras. Dhanasekaran *et al.* (2021) reportó que al pretratar *Sporidiobolus pararoseus* con trehalosa al 1,5 % registraba la menor incidencia de *P. expansum* (14,8 %) en uva de mesa. En concordancia con lo anterior, Nie *et al.* (2019) indicaron que al pretratar *Candida oleophila* con trehalosa al 1 %, obtuvieron un 30 % de incidencia de *P. expansum* en peras, comparado con un 50 % con las levaduras sin pretratar.

Mientras que Apaliya *et al.* (2018), informaban que al pretratar *Hanseniaspora uvarum* con trehalosa al 2 % se redujo la incidencia de *Aspergillus tubingensis* y *Penicillium commune* en uva de mesa a un 15 %, mientras que la levadura no pretratada redujo la incidencia a un 23 %, cuando la fruta se almacenó a temperatura de 20 °C durante nueve días.

El aumento en la capacidad biocontroladora de las levaduras pretratadas con trehalosa puede deberse a que este compuesto aumenta la actividad de la β -1,3-glucanasa (Dhanasekaran *et al.*, 2021), enzima que actúa sobre los sitios β -1,3-glucano en la cadena de polisacáridos de las paredes del patógeno; por lo tanto, logra distorsionar las hifas y filtra los componentes citoplasmáticos causando su lisis y la posterior muerte celular (Delali *et al.*, 2021). Además, se ha descrito que la trehalosa protege las células de levadura frente al estrés oxidativo (Nie *et al.*, 2019), ya que, aumenta la expresión de los genes que codifican para la enzima Tiorredoxina Reductasa y la enzima Catalasa que facilita la degradación de H_2O_2 a O_2 y H_2O (Mesquita *et al.*, 2010).

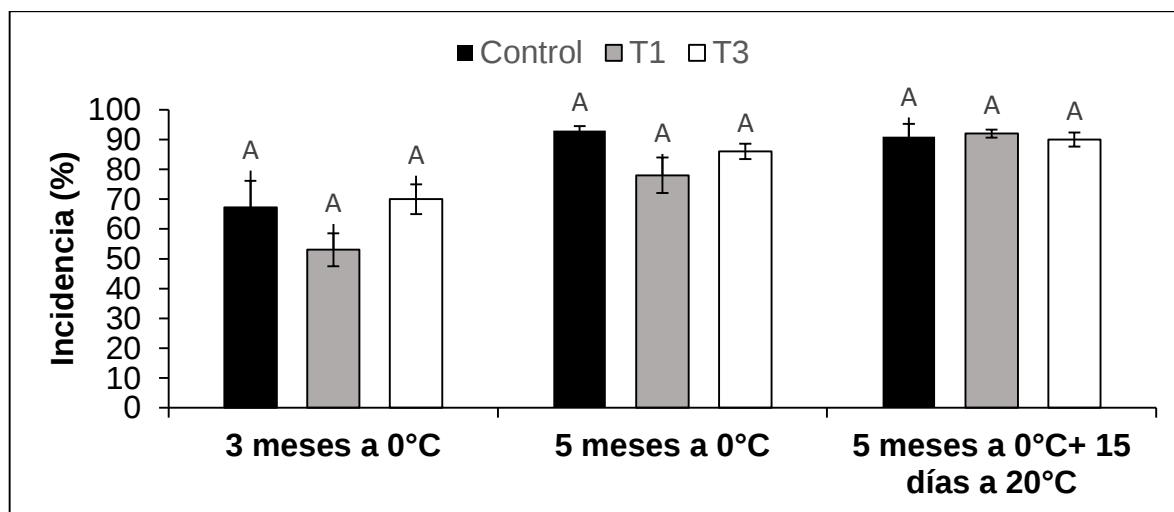
Efectividad de la aplicación en campo de levaduras *V. victoriae* EPL 29.5 y *M. guilliermondii* M11 pretratadas a distintas concentraciones de trehalosa sobre la enfermedad Ojo de buey

Para determinar la efectividad de la mezcla de levaduras sobre la enfermedad Ojo de buey, se realizaron tres evaluaciones a la incidencia de la pudrición, realizado durante el período de almacenamiento en frío de la fruta. La primera fue a los 3 meses, debido a que se ha descrito que los síntomas de la enfermedad aparecen luego de tres a cuatro meses de almacenamiento a una temperatura de 0°C, una segunda medición se realizó a los cinco meses de almacenamiento, cuando se sacó la fruta desde frío y una tercera luego de 15 días a 20 °C, esto último se realizó para simular el período de la fruta en anaquel.

A los tres meses de almacenamiento a temperatura de 0 °C de la fruta tratada con la mezcla de levaduras, se puede observar que T1 fue capaz de reducir la incidencia en un 21 %, mientras que en el tratamiento control se registró una incidencia de 67 % (Figura 2). Estudios previos han demostrado la eficacia de levaduras aplicadas en campo para el manejo de patógenos de postcosecha. Cai *et al.* (2015)

demostraron que la aplicación en precosecha de *H. uvarum* redujo la incidencia natural de la pudrición gris ocasionada por *B. cinerea* en frutillas.

Figura 2. Incidencia de la enfermedad Ojo de buey en manzanas 'Cripps Pink' tratadas en precosecha con una mezcla 50/50 de las levaduras *V. victoriae* EPL 29.5 y *M. guilliermondii* M11 (1×10^7 células mL^{-1}) (T1) o una mezcla 50/50 de las levaduras *V. victoriae* EPL 29.5 y *M. guilliermondii* M11 (1×10^7 células mL^{-1}) pretratadas con trehalosa al 1,5 % (T3). La fruta cosechada se almacenó por 5 meses a 0°C más 15 días a 20°C.



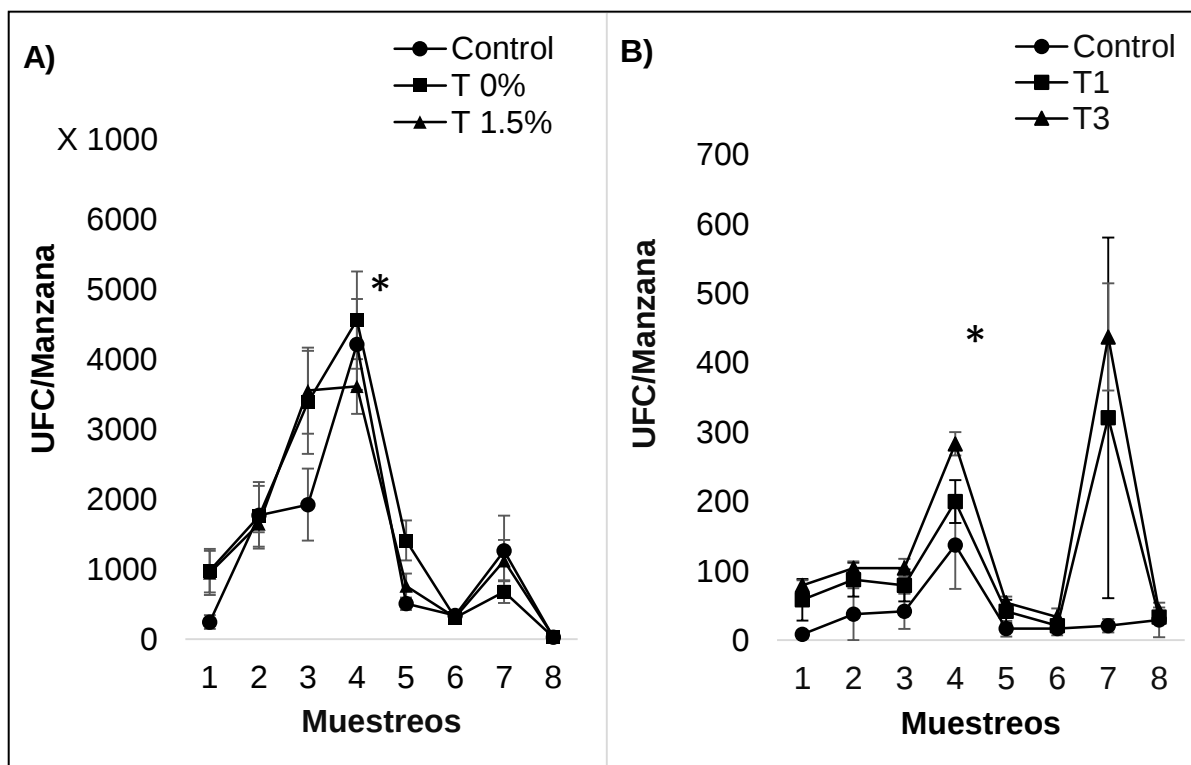
Letras distintas representan diferencia significativa entre tratamiento de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras representan error estándar.

Los resultados observados en este estudio pueden estar relacionados con la fecha de aplicación de los tratamientos con levaduras. Lolas *et al.* (2021) señalaron que las lenticelas de la manzana son susceptibles a la infección por *P. vagabunda* desde 120 días previos a la cosecha y en este estudio las primeras aplicaciones fueron realizadas 60 días antes de la cosecha, quedando un período de la lenticela sin la protección de las levaduras. Otra explicación a los resultados observados podría ser que, en la semana previa a la cosecha, se registraron precipitaciones de 115 mm (Anexo 1), lo que podría haber favorecido la infección de la fruta por *P. vagabunda* (Giraud *et al.*, 2021). Por lo que en futuras investigaciones se deberá estudiar la fecha más adecuada para la aplicación de levaduras.

Durante todo el ensayo se realizaron evaluaciones periódicas de las poblaciones endófitas y epífitas en la fruta. Se observó que la población de levaduras epífitas

aumentó en ambos tratamientos hasta la cuarta aplicación, registrándose poblaciones de 4×10^6 UFC manzana⁻¹ en T1 y de 3×10^6 UFC manzana⁻¹ en T3 (Figura 3A). En la quinta evaluación, la población de levaduras disminuyó a 1×10^6 UFC manzana⁻¹ en T1 y a 7×10^5 UFC manzana⁻¹ en T3 (Figura 3A). Esta disminución en la población de levaduras epífitas podría haber sido causada por las precipitaciones registradas entre la cuarta y quinta aplicación. La disminución en las poblaciones de levaduras en las manzanas, podría ser otro factor que contribuyó a los resultados observados. Por otra parte, la población de levaduras endófitas en T1 varió entre 50 y 4 UFC manzana⁻¹ para el muestreo 1 y 8 respectivamente. Mientras que en el T3 las poblaciones variaron entre 20 y 8 UFC manzana⁻¹ para el muestreo 1 y 8 respectivamente (Figura 3B).

Figura 3. Población de levaduras epífitas (A) y endófitas (B) en manzanas 'Cripps Pink' tratadas en precosecha con una mezcla 50/50 de las levaduras *V. victoriae* EPL 29,5 y *M. guilliermondii* M11 (1×10^7 células mL⁻¹) (T1) o una mezcla 50/50 de las levaduras *V. victoriae* EPL 29,5 y *M. guilliermondii* M11 (1×10^7 células mL⁻¹) pretratadas con trehalosa al 1,5 % de trehalosa (T3). La fruta se almacena por 5 meses a 0°C más 15 días a 20°C. Asterisco indica cosecha.

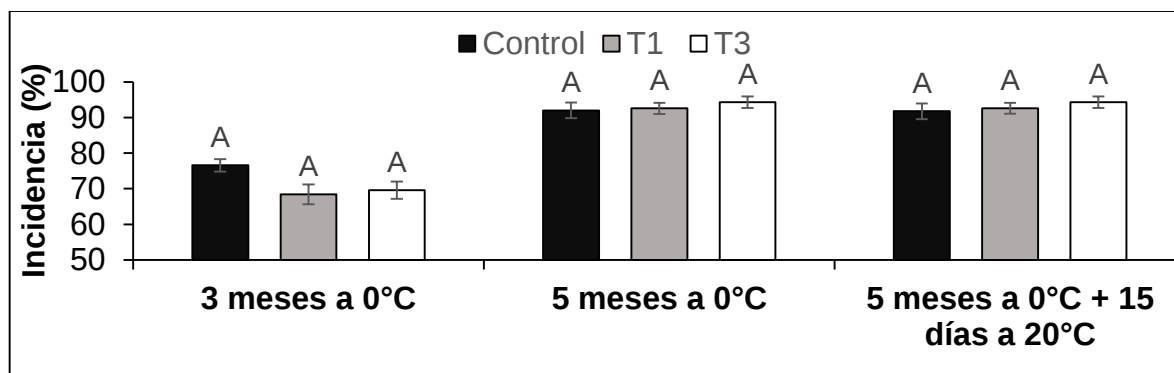


Barras representan error estándar.

Evaluación del efecto curativo de las levaduras sobre la incidencia natural de Ojo de buey.

En las manzanas tratadas con la mezcla de levaduras antes de ingresar en almacenamiento en frío, se pudo observar que T1 redujo la incidencia de Ojo de buey en un 10 % luego de tres meses de almacenamiento, comparado con el tratamiento control. Luego de cinco meses de almacenamiento la incidencia de Ojo de buey aumento a un 93 %, siendo estadísticamente ($p \leq 0,05$) igual al tratamiento control (Figura 4). Por lo que, al aumentar el tiempo de almacenamiento de la fruta, la efectividad de las levaduras sobre Ojo de buey disminuyó.

Figura 4. Incidencia de la enfermedad Ojo de buey en manzanas 'Cripps Pink' tratadas en postcosecha con una mezcla 50/50 de las levaduras *V. victoriae* EPL 29,5 y *M. guilliermondii* M11 (1×10^7 células mL⁻¹) (T1) o una mezcla 50/50 de las levaduras *V. victoriae* EPL 29,5 y *M. guilliermondii* M11 (1×10^7 células mL⁻¹) pretratadas con trehalosa al 1,5 % (T3). Las manzanas fueron almacenadas por 5 meses a 0°C más 15 días a 20°C.

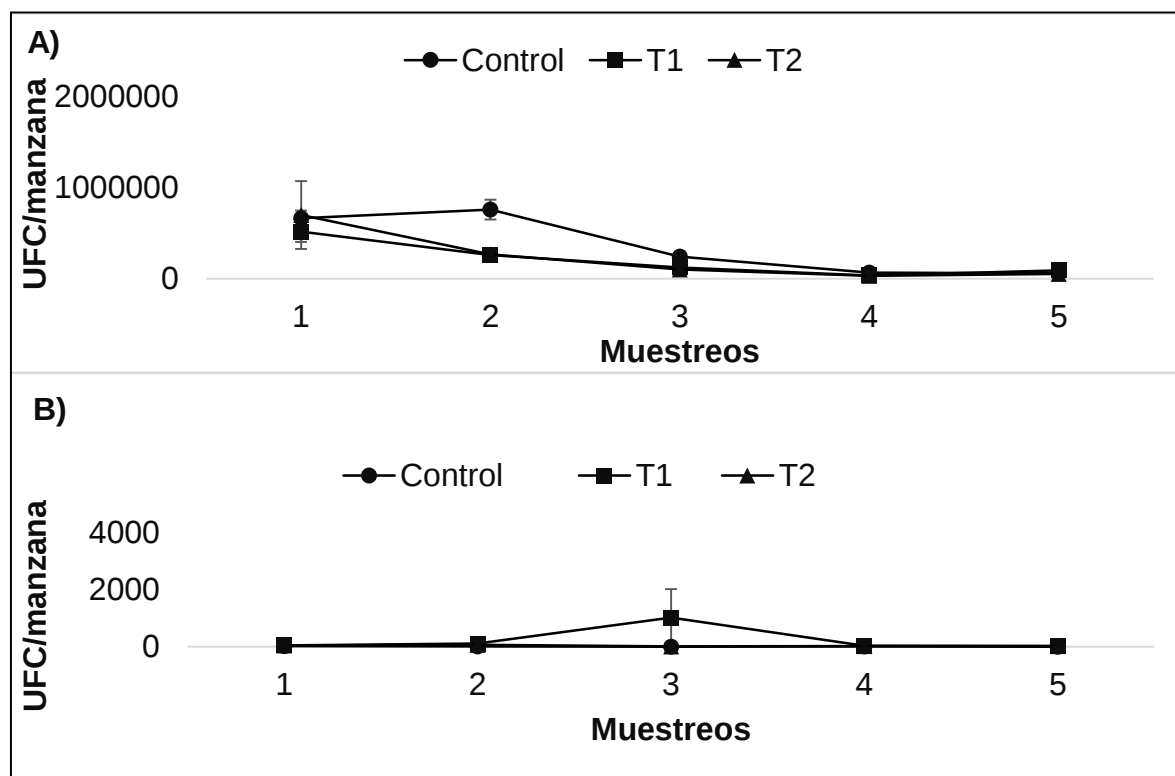


Letras distintas representan diferencia significativa entre tratamiento de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras representan error estándar.

La infección de la fruta ocurre en el huerto durante la temporada de crecimiento del árbol (Henríquez *et al.*, 2004). Sin embargo, se desconoce a día de hoy el ciclo de la enfermedad en Chile. Por lo tanto, al momento de la aplicación de las levaduras, las manzanas pudieron ya estar infectadas con el patógeno. En este sentido, Ngongang *et al.* (2021) reportaron que cuando la levadura *Pichia kluyveri* se aplicó antes de la infección (efecto preventivo), el control de *B. cinerea* fue más exitoso que cuando la infección ya estaba presente en la manzana (efecto curativo). Uno

de los principales mecanismos de acción descritos para las levaduras es la competencia por nutrientes y espacio (Droby *et al.*, 2016), este mecanismo está relacionado con la capacidad de las células de levadura para proliferar rápidamente en la fruta (Janisiewicz y Korsten, 2002). Como se observa en la Figura 5, la población de levaduras epífitas disminuyó progresivamente durante el período de almacenamiento en frío de la fruta, alcanzando poblaciones de 9×10^4 UFC/manzana en T1 y 5×10^4 UFC/manzana en T3 (Figura 5A) después de 150 días de almacenamiento; la población de levaduras endófitas en T1 disminuyó de 41 a 20 UFC/manzana durante el muestreo 1 y 5 respectivamente, en T3 la tendencia se mantuvo, ya que, la población de levaduras disminuyó de 45 a 12 UFC/manzana durante el muestreo 1 y 5 respectivamente (Figura 5B).

Figura 5. Población de levaduras epífitas (A) y endófitas (B) en manzanas 'Cripps Pink' tratadas en postcosecha con una mezcla 50/50 de las levaduras *V. victoriae* EPL 29,5 y *M. guilliermondii* M11 (1×10^7 células mL^{-1}) (T1) o una mezcla 50/50 de las levaduras *V. victoriae* EPL 29,5 y *M. guilliermondii* M11 (1×10^7 células mL^{-1}) pretratadas con trehalosa al 1,5 % (T3). Las manzanas fueron almacenadas por 5 meses a 0°C más 15 días a 20°C .



Barras representan error estándar.

La baja población de levaduras observada durante el periodo de almacenamiento de la fruta podría explicar la incidencia de Ojo de buey registrada en las evaluaciones.

CONCLUSIONES

1. La mezcla de levaduras antagonistas *Vichniacosima victoriae* EPL 29,5 y *M. guilliermondii* M11 presentan actividad de biocontrol sobre *P. vagabunda* cuando son aplicadas sobre manzanas 'Cripps Pink' en condiciones de laboratorio.
2. *Vichniacosima victoriae* EPL 29.5 y *M. guilliermondii* M11 pretratadas con trehalosa y aplicadas en mezcla en manzanas 'Cripps Pink' en campo, reducen la incidencia de *P. vagabunda* los primeros 3 meses de almacenamiento en frío.
3. Las poblaciones de levaduras epífitas y endófitas de las manzanas disminuyen durante el almacenamiento de la fruta en frío.

REFERENCIAS

1. Apaliya, M.T., H. Zhang, X. Zheng, Q. Yang, G. K. Mahunu, and E. Kwaw. 2018. Exogenous trehalose enhanced the biocontrol efficacy of *Hanseniaspora uvarum* against grape berry rots caused by *Aspergillus tubingensis* and *Penicillium commune*. J. Sci. Food Agric. 98(12): 4665–4672.
2. Asociación de Exportadores de Frutas de Chile A.G. 2023. Mercado Internacional de Manzanas. [en línea]. Asoex. <<https://www.asoex.cl/component/content/article/25-noticias/1232-anuario-manzanas-2022-produccion-mundial-de-manzanas-baja-5-3-esta-temporada.html>> [Consulta: 10 de agosto 2023].
3. Baker, K.F., R.J. Cook. 1974. Biological control of plant pathogens. Freeman and Company, San Francisco, USA.
4. Cai, Z., R. Yang, H. Xiao, X. Qin, and L. Si. 2015. Effect of preharvest application of *Hanseniaspora uvarum* on postharvest diseases in strawberries. Postharv. Biol. Technol. 100: 52–58.
5. Cameldi, I., F. Neri, M. Menghini A. Pirondi I. M. Nanni M. Collina and M. Mari. 2017. Characterization of *Neofabraea vagabunda* isolates causing apple bull's eye rot in Italy (Emilia-Romagna region). Plant Pathol. 66(9): 1432–1444.

6. Chen, A., and P. A. Gibney. 2022. Intracellular trehalose accumulation via the Agt1 transporter promotes freeze–thaw tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 133(4): 2390–2402.
7. Delali, K.I., O. Chen, W. Wang, L. Yi, L. Deng and K. Zeng. 2021. Evaluation of yeast isolates from kimchi with antagonistic activity against green mold in citrus and elucidating the action mechanisms of three yeast: *P. kudriavzevii*, *K. marxianus*, and *Y. lipolytica*. *Postharvest Biol. Technol.* 176: 111495.
8. Dhanasekaran, S., Q. Yang, E.A. Godana, J. Liu, J. Li and H. Zhang. 2021. Trehalose supplementation enhanced the biocontrol efficiency of *Sporidiobolus pararoseus* Y16 through increased oxidative stress tolerance and altered transcriptome. *Pest Manag. Sci.* 77(10): 4425–4436.
9. Droby, S., M. Wisniewski, N. Teixidó, D. Spadaro and M.H. Jijakli. 2016. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biol. Technol.* 122: 22–29.
10. Eguillor, P. 2022. Agricultura Orgánica. Información actualizada del sector. [en línea]. Biblioteca digital ODEPA. <https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/handle/20.500.12650/71558>. [Consulta: 11 de agosto 2023].
11. Giraud, M., C. Coureau, J. Perrin and P. Westercamp. 2021. Apple lenticel rots: state of knowledge on the epidemiology of *Neofabraea vagabunda*. *Acta Hortic.* 1325: 59–66.
12. Glushakova, A.M. and A.V. Kachalkin. 2017. Endophytic yeasts in *Malus domestica* and *Pyrus communis* fruits under anthropogenic impact. *Microbiology.* 86(1): 128–135.
13. Gomomo, Z., M. Fanadzo, M. Mewa-Ngongang, J. Hoff, M. van Der Rijst, V. Okudoh, J. Kriel and H. Du Plessis. 2022. Control of mould spoilage on apples using yeasts as biological control agents. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 72(2): 119–128.
14. González, F., C. Salinas, B. Pinilla and A. Castillo. 2020. First report of apple Bull's-Eye Rot caused by *Neofabraea perennans* in Chile. *Plant Dis.* 104(5): 1537.
15. Henriquez, J.L. 2005. First report of apple rot caused by *Neofabraea alba* in Chile. *Plant Dis.* 89: 1360-1360.
16. Henriquez, J.L., D. Sugar and R. A. Spotts. 2004. Etiology of Bull's Eye Rot of pear caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington, and California. *Plant Dis.* 88(10): 1134–1138.

17. Janisiewicz, W.J. and L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40(1): 411–441.
18. Jurick, W.M., O. Macarasin, V.L. Gaskins, E. Park, J. Yu and W. Janisiewicz. 2017. Characterization of postharvest fungicide-resistant *Botrytis cinerea* isolates from commercially stored apple fruit. *Phytopathology®*. 107(3): 362–368.
19. Kim, S.X., G. Çamdere, X. Hu, D. Koshland and H. Tapia. 2018. Synergy between the small intrinsically disordered protein Hsp12 and trehalose sustain viability after severe desiccation. *Elife*. 7.
20. Kosar, F., N.A. Akram, M. Sadiq, F. Al-Qurainy and M. Ashraf. 2019. Trehalose: A key organic osmolyte effectively involved in plant abiotic stress tolerance. *J. Plant Growth Regul.* 38(2): 606–618.
21. Leibinger, W., B. Breuker, M. Hahn and K. Mendgen. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology®*. 87(11): 1103–1110.
22. Li, B. Q. and S.P. Tian. 2006. Effects of trehalose on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Cryptococcus laurentii*. *J. Appl. Microbiol.* 100(4): 854–861.
23. Lolas, M. 2005. Enfermedades de verano en manzanas Pink Lady. Centro de Pomáceas de la Universidad de Talca. 5(2): 3-4.
24. Lolas, M., M. Cáceres, J.A. Reyes and G.A. Díaz. 2021. Bull's eye rot development in storage is related to the timing of apple fruit infection by *Neofabraea vagabunda* in the orchard in Chile. *Acta Hortic.* 1325: 73–76.
25. Lolas, M. y G. Díaz. 2016. Enfermedades de pre y postcosecha en manzanos. Centro de Pomáceas de la Universidad de Talca. 16(5): 5 – 6.
26. Lolas, M., G. Díaz, R. Mendez, M. Cáceres and L. Neubauer. 2016. Evaluation of the efficacy of fungicide fludioxonil in the postharvest control of bull's eye rot (*Neofabraea alba*) in Chile. *Acta Hortic.* 1144: 461–464.
27. Mesquita, A., M. Weinberger, A. Silva, B. Sampaio-Marques, B. Almeida, C. Leão, V. Costa, F. Rodrigues, W. C. Burhans and P. Ludovico. 2010. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(34): 15123–15128.
28. Mewa-Ngongang, M., H. Du Plessis, C. Boredi, U. Hutchinson, K. Ntwampe, V. Okudoh and N. Jolly. 2021. Physiological and Antagonistic Properties of

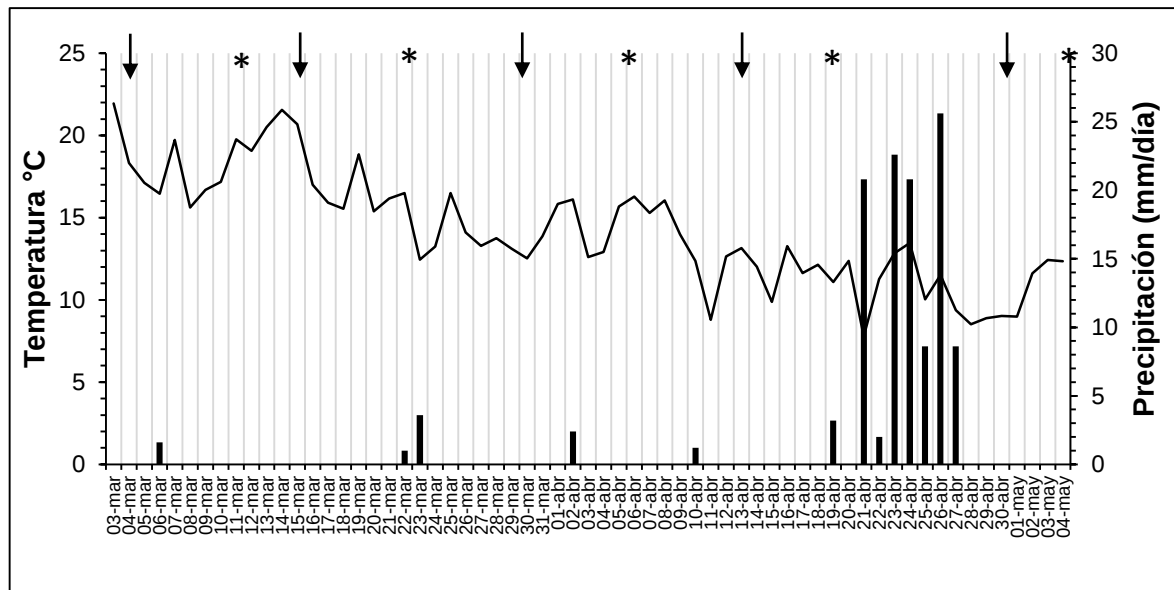
Pichia kluyveri for Curative and Preventive Treatments Against Post-Harvest Fruit Fungi. Polish J. Food Nutr. Sci. 71(3): 245–253.

29. Neri, F., L. Cappellin, E. Aprea, F. Biasioli, F. Gasperi, A. Spadoni, I. Cameldi, A. Folchi and E. Baraldi. 2019. Interplay of apple volatile organic compounds with *Neofabraea vagabunda* and other post-harvest pathogens. Plant Pathol. 68(8): 1508–1524.
30. Nie, X., C. Zhang, C. Jiang, R. Zhang, F. Guo and X. Fan. 2019. Trehalose increases the oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* in the microenvironment of pear wounds. Biol. Control. 132: 23–28.
31. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias ODEPA. 2023. Boletín frutícola. [en línea]. <<https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-fruta-julio-2023>> [Consulta: 10 de agosto 2023].
32. Péter, M., P. Gudmann, Z. Kóta, Z. Török, L. Vigh, A. Glatz and G. Balogh. 2021. Lipids and Trehalose Actively Cooperate in Heat Stress Management of *Schizosaccharomyces pombe*. Int. J. Mol. Sci. 22(24): 13272.
33. Qin, X., H. Xiao, C. Xue, Z. Yu, R. Yang, Z. Cai and L. Si. 2015. Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. Postharvest Biol. Technol. 100: 160–167.
34. Sanzani, S., M. M. Sgaramella, S. Mosca, M. Solfrizzo and A. Ippolito. 2021. Control of *Penicillium expansum* by an epiphytic Basidiomycetous yeast. Horticulturae. 7(11): 473.
35. Ceballos, R., S. Vero, M. D. López and M. Vargas. 2022. Endophytic yeasts for the biocontrol of *Phyctema vagabunda* in Apples. Horticulturae. 8(6): 535.
36. Settler-Ramírez, L., G. López-Carballo, P. Hernández-Muñoz, A. Fontana-Tachon, C. Strub and S. Schorr-Galindo. 2022. Apple-based coatings incorporated with wild apple isolated yeast to reduce *Penicillium expansum* postharvest decay of apples. Postharvest Biol. Technol. 185: 111805.
37. Soto-Alvear, S., M. Lolas, I. M. Rosales, E. R. Chávez and B. A. Latorre. 2013. Characterization of the Bull's Eye Rot of Apple in Chile. Plant Dis. 97(4): 485–490.
38. Soto-Alvear, S., M. Rosales y M. Lolas. 2012. Identificación y Control de “Ojo de Buey”. Biblioteca digital INIA. <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/68333/NR38378.pdf?sequence=28&isAllowed=y>

39. Spadaro, D. and S. Droby. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci Technol.* 47: 39–49.
40. Spotts, R.A., K.A. Seifert, K.M. Wallis, D. Sugar, C.L. Xiao, M. Serdani and J.L. Henriquez. 2009. Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing districts in the Pacific Northwest USA. *Mycol. Res.* 113(11): 1301–1311.
41. Syed Ab Rahman, S. F., E. Singh, C. M. J. Pieterse and P. M. Schenk. 2018. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Sci.* 267: 102–111.
42. Vero, S., P. Mondino, J. Burgueño, M. Soubes and M. Wisniewski. 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biol. Technol.* 26(1): 91–98.
43. Wenneker, M. and B. P. H. J. Thomma. 2020. Latent postharvest pathogens of pome fruit and their management: From single measures to a systems intervention approach. *Eur. J. Plant Pathol.* 156(3): 663–681.
44. Zhou, Y., L. Deng and K. Zeng. 2014. Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia membranaefaciens* by hot water treatment in postharvest diseases of citrus fruit. *Crop Prot.* 63: 89–96.

ANEXOS

Anexo 1. Condiciones climáticas durante el ensayo de campo. Precipitaciones se muestran por columnas y la temperatura media por líneas. Flechas indica aplicación de tratamientos.



Asteriscos (*) indican fechas de muestreo. Fuente: Dirección Meteorológica de Chile.