



## POLÍMERO DE PVA COMO HERRAMIENTA PARA PREVENIR EL DAÑO POR HELADAS EN YEMAS FLORALES DEL CEREZO *Prunus avium* L.

### PVA POLYMER AS A TOOL TO PREVENT FROST DAMAGE ON CHERRY *Prunus avium* L. FLOWER BUDS

Miguel Valenzuela-Villar<sup>1</sup>, Richard M. Bastías<sup>1\*</sup>, Saddys Rodríguez<sup>2</sup>, y Constanza Sabando<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Av. Vicente Méndez 595, Chillán, Chile.

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

\*Autor para correspondencia: ribastias@udec.cl

#### RESUMEN

El daño por helada en frutales se produce cuando la temperatura inferior a 0°C induce cristalización del hielo en el tejido vegetal. El polímero en base a polivinil alcohol (PVA) ha sido usado para inhibir la cristalización del hielo en condiciones de laboratorio. El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de un polímero en base a PVA para prevenir el daño por heladas en yemas florales del cerezo *Prunus avium* L. Se evaluaron los siguientes tratamientos: i) F1: PVA en dosis de 10 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; ii) F2: (PVA + agente polisorbato) en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; iii) F3-15: (PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona) en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; iv) F3-30: (PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona) en dosis de 30 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>. Como testigo se incluyó un agente anti-helada comercial (AAC) en dosis de 10 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup> 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 siguientes parámetros de calidad de fruta: tamaño (mm), firmeza (g mm<sup>-1</sup>), sólidos solubles (°Brix) y color (escala CITFL). En 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 indican que el uso de polímero PVA es una herramienta promisoriosa para el control de daño por heladas en huertos de cereza.

**Palabras clave:** Agente crioprotector, polímero PVA, polivinil alcohol, cambio climático, *Prunus avium*, heladas.

#### ABSTRACT

Frost damage on fruit trees occurs when temperature below 0°C induces ice crystallization in plant tissue. Polyvinyl alcohol (PVA) based polymer has been used to inhibit ice crystallization under laboratory conditions. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of a PVA-based polymer to prevent frost damage on cherry *Prunus avium* L. flower buds. The following treatments were evaluated: i) F1: PVA at a dose of 10 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; ii) F2: (PVA + polysorbate agent) at a dose of 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; iii) F3-15: (PVA + polysorbate + polyvinylpyrrolidone agent) at a dose of 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; iv) F3-30: (PVA + polysorbate agent + polyvinylpyrrolidone) at a dose of 30 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>. A control treatment consisting of a commercial anti-freeze agent (AAC) at a dose of 10 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup> and distilled water was also included. The trials were conducted under field conditions (localities, cultivars and cyanamide application) and

**laboratory (micro-chamber). In the field trials, the effect of the polymer was quantified according to the following fruit quality parameters: size (mm), firmness (g mm<sup>-1</sup>), soluble solids (°Brix) and color (CITFL scale). For the different trials, the F3 polymer formulation were the most effective in reducing frost damage on cherry flower buds, whose effectiveness varied from 40% to 100%, with no negative effects on fruit quality. These results demonstrate that the use of PVA polymer is a promising tool for frost damage control in cherry orchards.**

**Key words:** Cryoprotective agent, polymer PVA, polyvinyl alcohol, climate change, *Prunus avium*, frost.

## INTRODUCCION

El cultivo del cerezo *Prunus avium* L. se ha transformado en una de las alternativas productivas de mayor rentabilidad económica para los productores de frutas en Chile, alcanzando 30.179 hectáreas plantadas (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 (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). En este mismo sentido, se ha proyectado bajo 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 reportado 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 (variedades), 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 (Matzner et al., 2015). Cuando los cristales de hielo se expanden en las regiones extracelulares, produce un rápido aumento en la concentración de solutos de la solución extracelular, lo que conlleva a un gradiente de potencial 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 el aporte externo de calor con el fin de evitar 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 aspersión, o el movimiento de aire a través de hélices (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, además del gasto energético involucrado (Longstroth y Perry, 1996; Cittadini et al., 2006).

Una segunda alternativa 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 variedades 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). Una alternativa con potencial aplicación es el uso de polímeros parcialmente hidrolizados a base de polivinil alcohol (PVA) que son capaces de inhibir la recristalización del hielo al igual que las proteínas anticongelantes. Este tipo de agentes 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 no ha sido documentada en el control

de daño por heladas en especies como el cerezo.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad de la aplicación de un agente crioprotector en base a PVA en el control del daño por heladas 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), 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 (20 de julio), se asperjó el 50% de los árboles 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 polivinil alcohol (PVA): i) F1: PVA en dosis de 10 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; ii) F2: (PVA + agente polisorbato) en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; iii) F3-15: (PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona) en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; iv) F3-30: (PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona) en dosis de 30 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; v) agente anti-helada comercial (AAC) en dosis de 10 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; vi) agua destilada (control). 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 controladas

Se tomaron al azar de árboles de variedad Sweetheart un total de 24 dardos sanos y desde madera de dos años de edad. Los dardos se tomaron para los estados fenológicos de yema en receso, yema hinchada y brotación. Las muestras fueron colectadas, envueltas en papel húmedo y transportadas en un cooler (Rubbermaid®, Ohio, EE.UU.) de 47 L de capacidad. Posteriormente, el total de las yemas florales se abrieron con la ayuda de un bisturí y los dardos fueron instalados en orificios de bandeja 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 se dispusieron en 4 sectores de la bandeja de 6 dardos por sector. Cada dardo por repetición fue asperjado con las siguientes



Fig. 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).

Fig. 1. Visual appearance of floral spurs placed in the holes of seedling tray with hydrophilic cotton during the phenological stages of bud rest (A), swollen bud (B), and sprouting (C).

formulaciones: F1 en base a PVA, en dosis de 10 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; ii) polímero F2 (NAOH6) en base a PVA, en dosis de 10 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; iii) polímero F3-15 en base a PVA, en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; iv) polímero F3-30 en base a PVA, en dosis de 30 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; v) Cold Killer®, en dosis de 10 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; vi) agua destilada (control), a través de un dispensador manual (Ergo®, China) de 1 L de capacidad. Luego, la bandeja con los dardos asperjados se introdujo 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 se sacó de la micro-cámara para una posterior evaluación.

### Evaluación de incidencia de helada

La incidencia de daño por helada en yemas florales se evaluó 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 se envolvió en papel húmedo y se transportó en un cooler (Rubbermaid®, Ohio, EE.UU.) de 47 L de capacidad para su posterior evaluación. Posteriormente las yemas se abrieron mediante cortes secuenciales en forma transversal, comenzando de la parte superior hacia la base, usando un bisturí y observando visualmente mediante un estereomicroscopio (Olympus®, modelo SZ61, Tokio, Japón) que estaba equipado a una cámara digital (Olympus®, LC30, 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.

### 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 (Onset Corporation®, modelo HOBO Pro v2, Massachusetts, EE.UU.). Mientras que el ensayo de micro-cámara se registró continuamente la temperatura y humedad relativa mínima horaria, a través de sensores (KeyTag Analyser®, modelo KTL-508, China), durante 4 horas de exposición.

### 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 (Stainless Hardened, modelo Y305624, 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

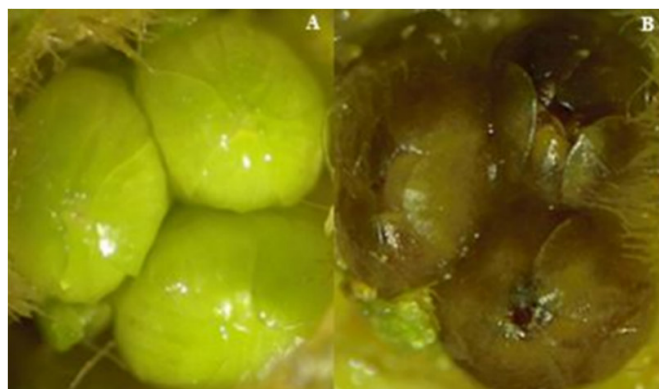


Fig. 2. Apariencia visual de primordios florales en yemas del cerezo, antes (A) y después (B) de la exposición a un evento de helada.

Fig. 2. Visual appearance of floral primordia in cherry buds, before (A) and after (B) exposure to a frost event.



refractómetro digital (Hanna Instrument, modelo HI96801, 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

En la temporada 2017/2018 se apreció en el cultivar Sweetheart que el uso de cianamida incrementó solo parcialmente la cantidad de primordios con daño por helada, en comparación a 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

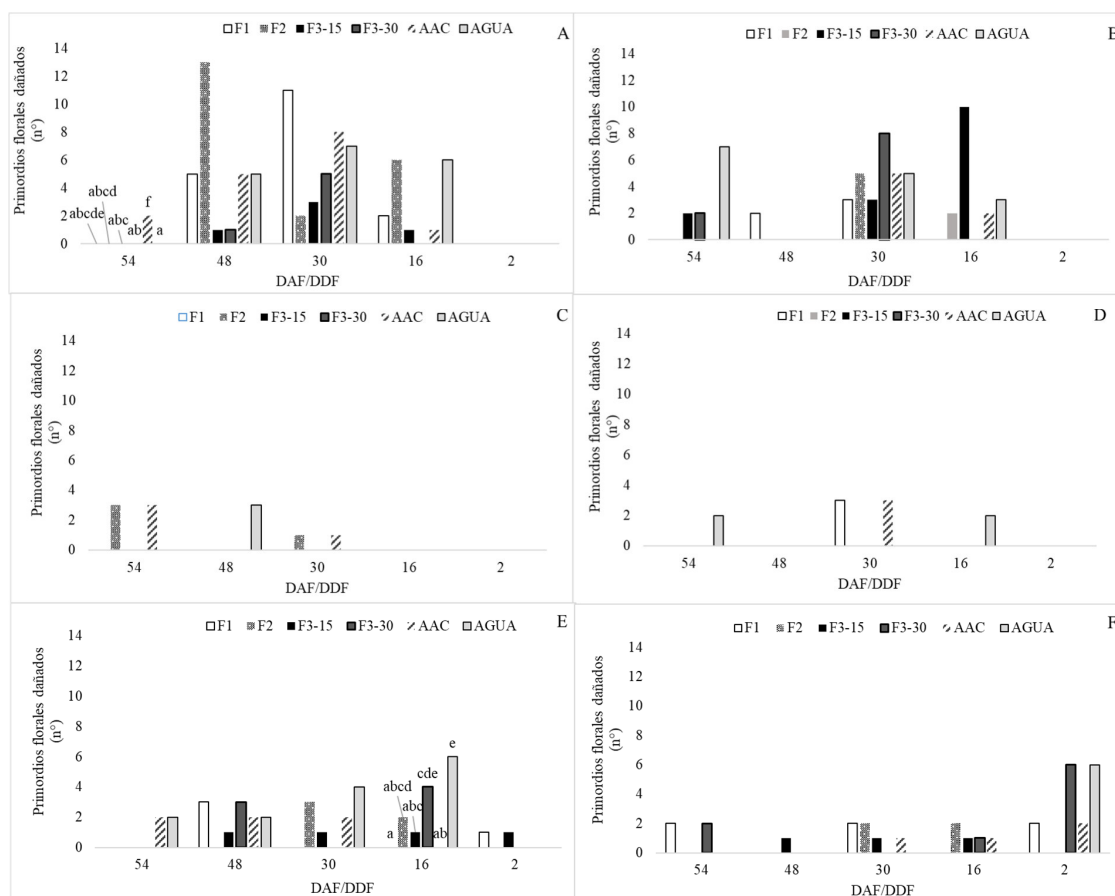


Fig. 3. Influencia de diferentes formulaciones de polímero PVA sobre la cantidad de primordios florales dañados (Nº) para las siguientes condiciones cultivar/cianamida: Sweetheart C/CH (A); Sweetheart S/CH (B); Lapins C/CH (C); Lapins S/CH (D); Regina C/CH (E) y Regina S/CH (F). Temporada 2017-2018. Barras con letras distintas difieren estadísticamente según test de Friedman. Abreviaturas: C/CH: con cianamida hidrogenada; S/CH: sin cianamida hidrogenada; DAF/DDF: días antes y después de floración.

Fig. 3. Influence of different PVA polymer formulations on the amount of damaged floral primordia (Nº) for the following cultivar/cyanamide conditions: Sweetheart C/CH (A); Sweetheart S/CH (B); Lapins C/CH (C); Lapins S/CH (D); Regina C/CH (E) and Regina S/CH (F). 2017-2018 season. Bars with different letters differ statistically according to Friedman's test. C/CH: with hydrogenated cyanamide; S/CH: without hydrogenated cyanamide; DAF/DDF: days before and after flowering.

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. 3B y C). 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).

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

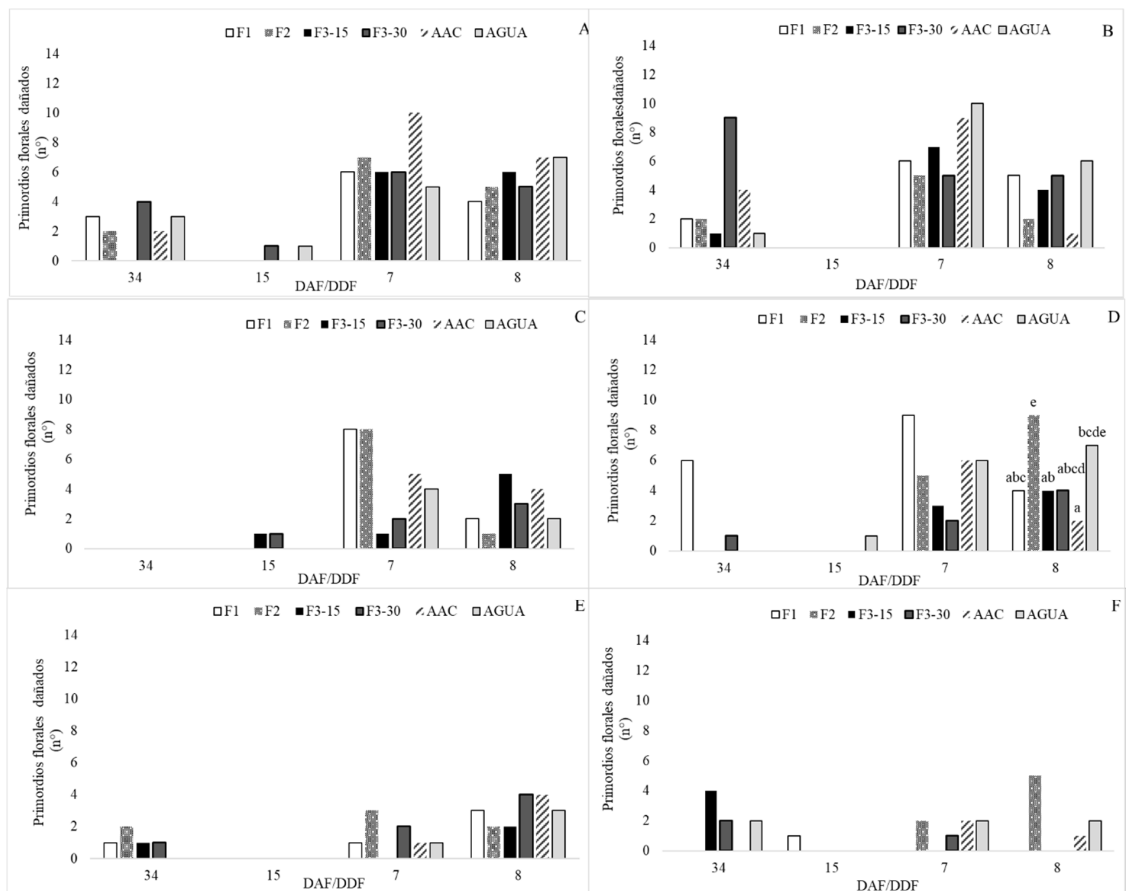


Fig. 4. Influencia de diferentes formulaciones de polímero PVA sobre la cantidad de primordios florales dañados (N°) para las siguientes condiciones cultivar/cianamida: Sweetheart C/CH (A); Sweetheart S/CH (B); Lapins C/CH (C); Lapins S/CH (D); Regina C/CH (E) y Regina S/CH (F). Temporada 2018-2019. Barras con letras distintas difieren estadísticamente según test de Friedman. Abreviaturas: C/CH: con cianamida hidrogenada; S/CH: sin cianamida hidrogenada; DAF/DDF: días antes y después de floración.

Fig. 4. Influence of different PVA polymer formulations on the amount of damaged floral primordia (N°) for the following cultivar/cyanamide conditions: Sweetheart C/CH (A); Sweetheart S/CH (B); Lapins C/CH (C); Lapins S/CH (D); Regina C/CH (E) and Regina S/CH (F). 2018-2019 season. Bars with different letters differ statistically according to Friedman's test. C/CH: with hydrogenated cyanamide; S/CH: without hydrogenated cyanamide; DAF/DDF: days before and after flowering.

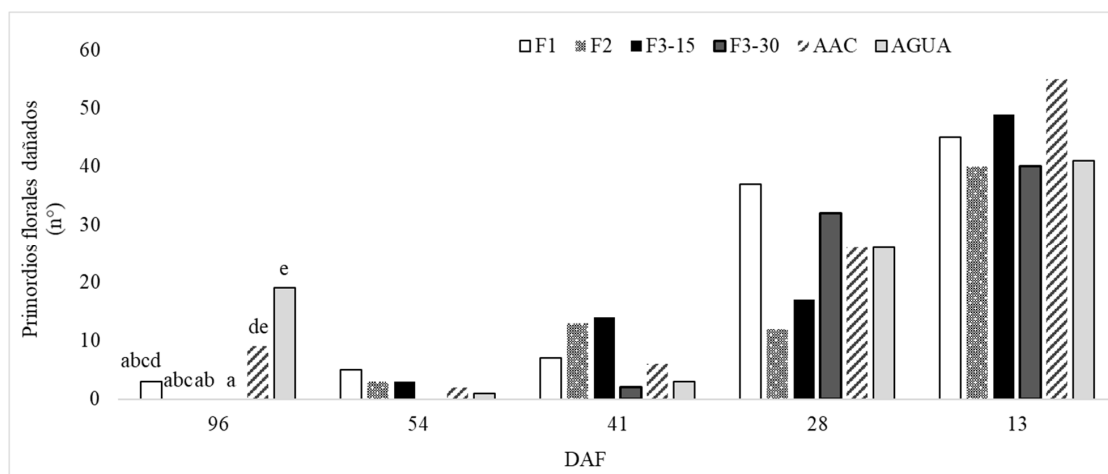
diferencias de daño por helada en árboles tratados con cianamida (Fig. 4C). En este cultivar, a los 8 días después de la floración las formulaciones de polímero PVA F3-15 y F3-30 redujeron significativamente ( $p < 0,05$ ) y en un 43% el daño de primordios en yemas florales, comparado con el control 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 en los tres cultivares ambas formulaciones de polímero PVA F3 mostraron la tendencia más clara en disminuir el daño por heladas en yemas florales.

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, F3-15 y F3-20, 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. 5).

Para la temporada 2017/2018 en el cultivar Lapins, solo 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).

En 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 2017/2018, 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, F3-30, ACC 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



**Fig. 5. Influencia de diferentes formulaciones de polímero PVA sobre la cantidad de primordios florales dañados (Nº) en dardos del cultivar Sweetheart expuestos durante 4 horas a  $-5^{\circ}\text{C}$ . Barras con letras distintas difieren estadísticamente según test de Friedman. DAF: días antes de floración.**

**Fig. 5. Influence of different PVA polymer formulations on the amount of damaged floral primordia (Nº) in spurs of Sweetheart cultivar exposed to  $-5^{\circ}\text{C}$  for 4 hours. Bars with different letters differ statistically according to Friedman's test. DAF: days before flowering.**

**Tabla 1. Influencia de diferentes formulaciones de polímero PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Lapins' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2017-2018.****Table 1. Influence of different PVA polymer formulations on fruit quality in 'Lapins' cherries treated with and without hydrogenated cyanamide. 2017-2018 season.**

Tratamientos	Con cianamida				Sin cianamida			
	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm <sup>-1</sup> )	Color (1-7)	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm <sup>-1</sup> )	Color (1-7)
F1	26,3ab	14,8	303,2	3,9	26,8a	13,9	329,9	2,4 <sup>a</sup>
F2	25,0c	15,4	317,5	4,3	26,0ab	13,9	332,5	2,3 <sup>a</sup>
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	2,3 <sup>a</sup>
AAC	26,7ab	14,6	287,4	3,9	26,6ab	13,8	341,9	2,3 <sup>a</sup>
Agua	25,9bc	14,8	297,4	3,6	25,6ab	13,3	351,6	2,2 <sup>a</sup>
Significancia	**	ns	ns	Ns	**	ns	ns	*

Filas con letra distinta difieren estadísticamente según test de Tukey al 95%. F1: PVA; F2: PVA + agente polisorbato en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; F3-15: PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; F3-30: PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona en dosis de 30 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; AAC: agente anti-helada comercial.

**Tabla 2. Influencia de diferentes formulaciones de polímero PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Lapins' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2018-2019.****Table 2. Influence of different PVA polymer formulations on fruit quality in 'Lapins' cherries treated with and without hydrogenated cyanamide. 2017-2018 season.**

Tratamientos	Con cianamida				Sin cianamida			
	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm <sup>-1</sup> )	Color (1-7)	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm <sup>-1</sup> )	Color (1-7)
F1	29,2a	17,5a	315,5	5,6	29,8a	16,1ab	323,4	5,3ab
F2	27,5b	17,6a	340,0	5,7	29,0abc	16,8a	333,5	5,7 <sup>a</sup>
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%. F1: PVA; F2: PVA + agente polisorbato en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; F3-15: PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; F3-30: PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona en dosis de 30 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; AAC: agente anti-helada comercial.

4% el color de frutos, en comparación a F3-15, F3-30 y AAC (Tabla 2).

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 14% 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 12% en relación al testigo (agua) (Tabla 3). En la temporada 2018/2019 y en este mismo cultivar no



**Tabla 3. Influencia de diferentes formulaciones de polímero PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Sweetheart' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2017-2018.****Table 3. Influence of different PVA polymer formulations on fruit quality in 'Sweetheart' cherries treated with and without hydrogenated cyanamide. 2017-2018 season.**

Tratamientos	Con cianamida				Sin cianamida			
	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm <sup>-1</sup> )	Color (1-7)	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm <sup>-1</sup> )	Color (1-7)
F1	27,0ab	13,9b	291,2	3,3	26,6b	14,8ab	346,4a	2,7
F2	27,9 <sup>a</sup>	15,1ab	303,5	3,4	27,5ab	14,0ab	323,7ab	2,7
F3-15	27,4 <sup>a</sup>	14,9ab	306,4	3,3	27,9a	15,2a	329,9ab	2,6
F3-30	27,9 <sup>a</sup>	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	27,6 <sup>a</sup>	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%. F1: PVA; F2: PVA + agente polisorbato en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; F3-15: PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; F3-30: PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona en dosis de 30 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; AAC: agente anti-helada comercial.

se apreció un efecto significativo ( $p > 0,05$ ) de las formulaciones de polímero PVA en la calidad de frutos (Tabla 4).

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)

## DISCUSIÓN

La incidencia de daño por heladas en primordios florales fue diferente en los tratamientos para los tres cultivares, durante ambas temporadas (Fig. 3 y 4), ya que el daño por helada se debe principalmente por temperaturas de congelación antes o después de la brotación en la primavera (Rodrigo, 2000). En la temporada 2018-2019 hubo 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 acumulación de temperaturas mínimas diarias ( $< 0^{\circ}\text{C}$ ) comparada con la temporada 2017-2018, según el registro realizado en este estudio (Fig. 6). 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  $0^{\circ}\text{C}$  (Fig. 6). Estudios anteriores indican 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 el grado de exposición de la yema a condiciones de baja temperatura es mayor (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 el presente 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 la cristalización del agua, por diferentes mecanismos. Estudios previos han mostrado que el tratamiento con polímero de PVA sintético al 0,1% y 1% mejoraron significativamente la supervivencia de plantas de papa durante el proceso de criopreservación (Zhao et al., 2005). Estos resultados indican que

**Tabla 4. Influencia de diferentes formulaciones de polímero PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Sweetheart' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2018-2019.****Table 4. Influence of different PVA polymer formulations on fruit quality in 'Sweetheart' cherries treated with and without hydrogenated cyanamide. 2018-2019 season.**

Tratamientos	Con cianamida				Sin cianamida			
	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm <sup>-1</sup> )	Color (1-7)	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm <sup>-1</sup> )	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%. F1: PVA; F2: PVA + agente polisorbato en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; F3-15: PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; F3-30: PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona en dosis de 30 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; AAC: agente anti-helada comercial.

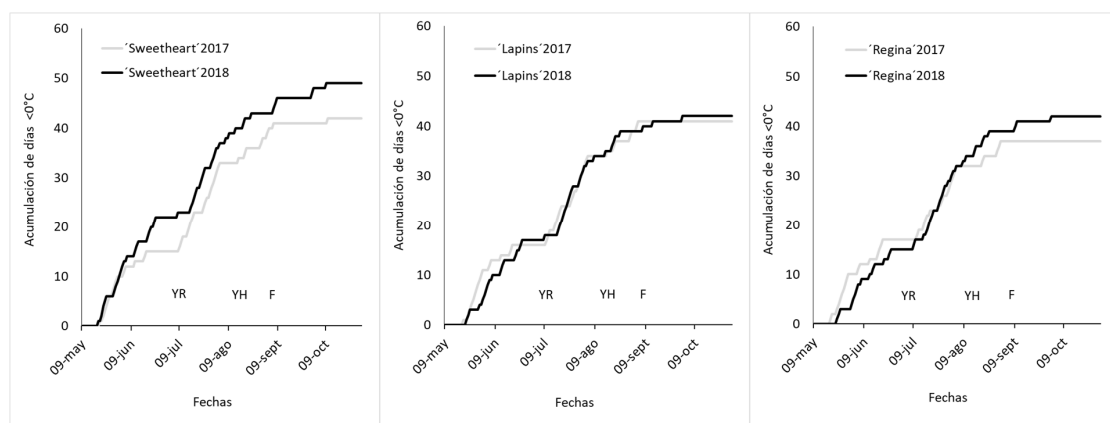
**Tabla 5. Influencia de diferentes formulaciones de polímero PVA sobre la calidad de frutos en cerezas 'Regina' tratados con y sin cianamida hidrogenada. Temporada 2018-2019.****Table 5. Influence of different PVA polymer formulations on fruit quality in 'Regina' cherries treated with and without hydrogenated cyanamide. 2018-2019 season.**

Tratamientos	Con cianamida				Sin cianamida			
	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm <sup>-1</sup> )	Color (1-7)	Diámetro (mm)	SS (°Brix)	Firmeza (g mm <sup>-1</sup> )	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%. F1: PVA; F2: PVA + agente polisorbato en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; F3-15: PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona en dosis de 15 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; F3-30: PVA + agente polisorbato + polivinilpirrolidona en dosis de 30 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>; AAC: agente anti-helada comercial.

bajos niveles de PVA sintético podrían inhibir la formación de hielo durante la criopreservación (Wolk 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, debido a su capacidad de presentar histéresis térmica (Inada y Lu, 2004). Otros estudios reportaron 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. 3-5). Esta mayor efectividad de la formulación F3 puede deberse a que las cadenas laterales de esta formulación pueden ser más efectivas en la disminución de la recristalización del hielo (Congdon et al., 2013). También puede deberse al carácter hidrófobo dando como resultado que el elemento poli (vinilo) permanezca más cerca del hielo, causando una inhibición más efectiva (Liu y Ben, 2005; Gibson



**Fig. 6. Acumulación de temperatura mínima diaria ( $< 0^{\circ}\text{C}$ ) en los huertos de los cultivares Sweetheart, Lapins y Regina. Temporadas 2017-2018 y 2018-2019. YR: yema en receso; YH: yema hinchada; F: inicio de floración.**

**Fig. 6. Cumulative minimum daily temperature ( $< 0^{\circ}\text{C}$ ) in the orchards of Sweetheart, Lapins and Regina cultivars. 2017-2018 and 2018-2019 growing seasons. YR: bud dormancy; YH: swollen bud; F: start of flowering.**

et al., 2009; Congdon et al., 2013; Congdon et al., 2016). Otro aspecto que podría ser relevante en la mayor efectividad de la formulación F3 es la combinación de surfactante y emulsionante que se adicionaron en esta formulación al polímero de 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 (Wang y Liu, 2007).

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).

## CONCLUSIÓN

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  $0^{\circ}\text{C}$  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 de las características químicas particulares de estas formulaciones, y que incluye la adición de ciertos surfactantes y emulsionantes específicos.

La aplicación de los polímeros de polivinil alcohol 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.

## LITERATURA CITADA

- Albrecht, E., M. Schmitz-Eiberger, M. Brauckmann, W. Rademacher, and G. Noga. 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.
- Augspurger, C. 2013. Reconstructing patterns of temperature, phenology, and frost damage over 124 years: Spring damage risk is increasing. *Ecology* 94:41-50.
- Balzarini, M., L. González, M. Tablada, F. Casanoves, J. Di Rienzo, and C.W. Robledo. 2008. InfoStat: software estadístico. Manual del usuario. Versión 2008. Brujas, Córdoba, Argentina.

- Budke, C., and T. Koop. 2006. Ice recrystallization inhibition and molecular recognition of ice faces by poly (vinyl alcohol). *Chem. Phys. Chem.* 7:2601–2606.
- Burkey, A., C. Riley, L. Wang, T. Hatridge, and N. Lynd. 2018. Understanding poly (vinyl alcohol)-mediated ice recrystallization inhibition through ice adsorption measurement and pH effects. *Biomacromolecules* 19:248–255.
- Brillante, L., N. Belfiore, F. Gaiotti, L. Lovat, L. Sansone, S. Poni, et al. 2016. Comparing kaolin and pinolene to improve sustainable grapevine production during drought. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156631>.
- Charrier, G., J. Ngao, M. Saudreau, and T. Améglio. 2015. Effects of environmental factors and management practices on microclimate, winter physiology, and frost resistance in trees. *Frontiers in Plant Science* 259:1–18.
- Cittadini, E., N. Ridder, P. Peri, and H. Van Keulen. 2006. A method for assessing frost damage risk in sweet cherry orchards of South Patagonia. *Agricultural and Forest Meteorology* 141:235–243.
- Congdon, T., R. Notman, and M. Gibson. 2013. Antifreeze (glyco) protein mimetic behavior of poly (vinyl alcohol): detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. *Biomacromolecules* 14:1578–1586.
- Congdon, T., R. Notman, and M. Gibson. 2016. Influence of Block Copolymerization on the antifreeze protein mimetic ice recrystallization inhibition activity of poly (vinyl alcohol). *Biomacromolecules* 17:3033–3039.
- Evans, R.G. 2000. The art of protecting grapevines from low temperature injury. p. 60-72. *Proc. ASEV 50th Anniversary Annual Meeting. 19-23 June 2000. American Society for Enology and Viticulture (ASEV), Seattle, Washington, USA.*
- Fadón, E., M. Herrero, and J. Rodrigo. 2015. Desarrollo floral de cerezo según escala BBCH. XIV Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. 3 al 5 de junio. Orihuela, Alicante, España.
- Ghaemi, A., M. Rafiee, and A. Sepaskhah. 2009. Tree-temperature monitoring for frost protection of orchards in semi-arid regions using sprinkler irrigation. *Agricultural Sciences in China* 8:98–107.
- Gibson, M., C. Barker, S. Spain, L. Albertin, and N. Cameron. 2009. Inhibition of ice crystal growth by synthetic glycopolymers: implications for the rational design of antifreeze glycoprotein mimics. *Biomacromolecules* 10:328–333.
- Inada, T., and S. Lu. 2003. Inhibition of recrystallization of ice grains by adsorption of poly (vinyl alcohol) onto ice surfaces. *Crystal Growth and Design* 3:747–752.
- Inada, T., and S. Lu. 2004. Thermal hysteresis caused by non-equilibrium antifreeze activity of poly (vinyl alcohol). *Chemical Physics Letters* 394:361–365.
- Lemus, G., S. Gálvez, y J. Valenzuela. 1989. Floración y brotación con cianamida hidrogenada. *IPA La Platina* 52:19 – 30.
- Liu, S., and R.N. Ben. 2005. C-linked galactosyl serine AFGP analogues as potent recrystallization inhibitors. *Org. Lett.* 7:2385–2388.
- Longstroth, M., and R. Perry. 1996. Selecting the orchard site, orchard planning and establishment. p. 203-221. In A. Webster and N. Looney (eds.) *Cherries: Crop physiology, production and uses.* CAB International, Cambridge, UK.
- Longstroth, M. 2013. Assessing frost and freeze damage to flowers and buds of fruit trees. Michigan State University Extension. Available at [http://msue.anr.msu.edu/news/assessing\\_frost\\_and\\_freeze\\_damage\\_to\\_flowers\\_and\\_buds\\_of\\_fruit\\_trees](http://msue.anr.msu.edu/news/assessing_frost_and_freeze_damage_to_flowers_and_buds_of_fruit_trees) (Accessed 08 July 2017)
- Luedeling, E. 2012. Climate change impacts on winter chill for temperate fruit and nut production: A review. *Scientia Horticulturae* 144:218–229.
- Matzneller, P., K. Götz, and F. Chmielewski. 2015. Spring frost vulnerability of sweet cherries under controlled conditions. *Int. J. Biometeorology* 60:123–130.
- Mosedale J, R. Wilson, and I. Maclean. 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. Disponible en <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/estadisticas-productivas> (Consulta 10 marzo 2019)
- Raffo, M., L. Mañueco, A. Candan, A. Santagni, and F. Menni. 2014. Dormancy breaking and advancement of maturity induced by hydrogen cyanamide: a strategy to improve profits in sweet cherry production. *Acta Horticulturae* 1020:497–502.
- Rodrigo, J. 2000. Spring frosts in deciduous fruit trees – morphological damage and flower hardiness. *Scientia Horticulturae* 85:155–173.

- Salazar-Gutierrez, M., B. Chaves, J. Anothai, M. Whiting, and G. Hoogenboom. 2014. Variation in cold hardiness of sweet cherry flower buds through different phenological stages. *Scientia Horticulturae* 172:161–167.
- Salazar-Gutiérrez, M., B. Chaves, and G. Hoogenboom. 2016. Freezing tolerance of apple flower buds. *Scientia Horticulturae* 198:344–351
- Strang, J., P. Lombard, M. Westwood, and C. Weiser. 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., L. Brunner, S. Nabernegg, K.W. Steininger, A.K. Steiner, E. Stabentheiner, et al. 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>.
- Wang, C., and Z. Liu. 2007. Foliar uptake of pesticides. Present status and future challenge. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87:1 – 8.
- Wowk, B., E. Leidl, C. Rasch, N. Mesbah-Karimi, S. Harris, and G. Fahy. 2000. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 40:228–236.
- Wowk, B., and G. Fahy. 2002. Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers. *Cryobiology* 44:14–23.
- Yuri, J.A., V. Lepe, y A. Sepúlveda. 2018. Heladas en fruticultura. Una mirada desde Chile. *Revista de Fruticultura* 66:7–17.
- Zhao, M., Y. Xhu, S. Dhital, D. Khu, Y. Song, M. Wang, et al. 2005. An efficient cryopreservation procedure for potato (*Solanum tuberosum* L.) utilizing the new ice blocking agent, Supercool X1000. *Plant Cell Rep.* 24:477–481.