

# El calcio nutriente para las plantas. Bitter pit en manzano

por E. MONGE, J. VAL, M. SANZ, A. BLANCO y L. MONTAÑÉS

Departamento de Nutrición Vegetal (E.M., J.V., M.S., L.M.) y Departamento de Pomología (A.B.),  
Estación Experimental de Aula Dei (C.S.I.C.), Apdo 202, 50080 Zaragoza

Recibido: 28-10-1994

*Palabras clave: mineral nutrition, calcium, apple tree, bitter pit.*

## ABSTRACT

*E. Monge; J. Val; M. Sanz; A. Blanco and L. Montañés (1994). Calcium as a nutrient for plants. The bitter pit in apple. An. Estac. Exp. Aula Dei (Zaragoza) 21(3): 189-201.*

*At present, bitter pit is an unsolved problem despite of the different points of view under which it has been approached. It appears in some orchards in an intermittent way. In this paper, some of the factors that induce or contribute to the development of this disorder are discussed. These factors depend on the soil (high availability of K and/or Mg, hot and dry soils), on the plant (inhibited transpiration, excessive imbalance between leaf mass and fruit, restricted root growth, rootstocks and varieties) and on the management techniques and environmental conditions (excessive nitrogen supply, especially the ammonium forms, intensive pruning, premature harvest, fruits in shady zones, high temperatures). Also, some of the metabolic, functional and structural alterations that cause calcium deficiency, particularly in apple tree are described and some directions for its diagnostic, prevention and treatment, are presented.*

## INTRODUCCION

Sprengel fue el primer investigador que, hacia mediados del pasado siglo, demostró la esencialidad del calcio para las plantas, donde está presente en forma de sales inorgánicas, ácidos orgánicos o bien inmovilizado.

La nutrición cálcica en el reino vegetal ha suscitado siempre un fuerte interés, tanto desde un punto de vista científico como económico, este último aspecto asociado con la hortofruticultura y la agricultura intensiva. Así por ejemplo, una mala nutrición cálcica en el cultivo de la lechuga ocasiona quemaduras en los bordes de las hojas y consecuentemente una difícil comercialización; la falta de calcio produce en el apio una coloración negruzca de su médula, mientras que en otras especies hortícolas, como el tomate o la sandía, ocasiona la podredumbre del fruto. La deficiencia de este macronutriente tiene especial incidencia en el manzano, ocasionando la aparición de un moteado parduzco en la parte calicina del fruto, (Fig. 1) alteración típica de la enfermedad conocida como mancha amarga (bitter pit); ésto ocasiona una lógica disminución del valor comercial del producto ya que, además del moteado, las manzanas pueden presentar una piel grasa, un deterioro de la textura de la pulpa y un descenso de ácidos y azúcares. Todo ello lleva aparejada su difícil salida al mercado.

## EL CALCIO EN EL SUELO

El calcio es un catión divalente, con un radio iónico hidratado de 0,412 nm y una energía de hidratación de 1577 J/mol. Es uno de los elementos más abundantes en la litosfera y puede encontrarse en los suelos en muy variada proporción, dependiendo en gran medida de la roca madre. Sus formas minerales más frecuentes son: carbonatos, fosfatos, sulfatos y algunos silicatos; los dos primeros con una solubilidad muy variable y prácticamente insolubles el resto.

Este elemento suele ser el catión más abundante en el complejo de cambio del suelo, pero la proporción utilizable depende del grado de saturación. En numerosos suelos, el calcio fijado en el complejo coloidal y el unido a los compuestos húmicos son las formas naturales más abundantes. Incluso en suelos ácidos casi siempre hay cantidades suficientes para la adecuada nutrición de las plantas cultivadas, sobre todo cuando las especies son poco exigentes. En general, para regiones templadas y húmedas, el calcio intercambiable es unas diez veces más abundante que el potasio cambiante.

El contenido de iones totales en la solución del suelo varía según el tipo del mismo pero, en la mayoría de los casos, el 60-80% del total de estos iones se encuentra

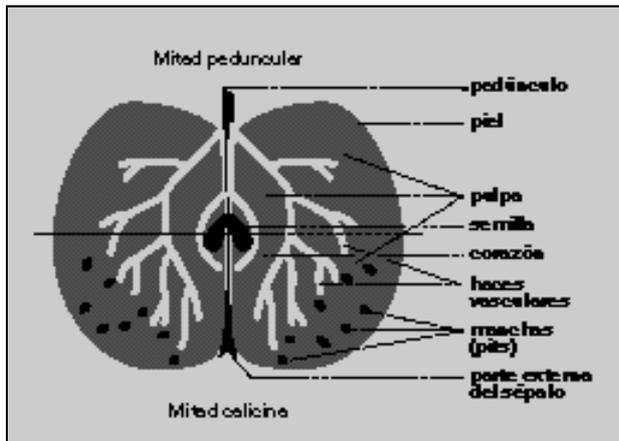
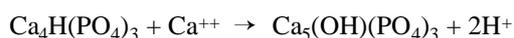
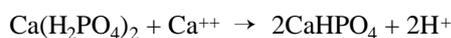


Figura 1.- Sección transversal de una manzana en la que se detallan sus distintas partes.

como  $\text{Ca}^{++}$  y, aunque las raíces aprovechan menos del 3% del calcio disponible, esta cantidad es suficiente para satisfacer las demandas que, por ejemplo, tienen los frutales (Barber et al., 1963).

Calcio y magnesio constituyen la fracción más importante del complejo de cambio catiónico, en tanto que los cationes monovalentes se hallan en menor proporción. Entre estos últimos, el potasio está retenido más fuertemente que el sodio por lo que su lixiviado es escaso y por tanto su nivel, en los suelos regularmente fertilizados, suele ser elevado. Incluso a lo largo del tiempo, puede provocarse un enriquecimiento en potasio, con el consiguiente efecto antagónico sobre la toma de calcio y de magnesio por parte de las raíces. De acuerdo con los resultados obtenidos recientemente por Jackobsen (1993a), el antagonismo potasio-calcio se hace particularmente evidente cuando, durante el crecimiento del fruto, el valor de la relación entre ambos nutrientes en el extracto acuoso del suelo (1:2) es superior a 10.

Los iones calcio, por otra parte, pueden reaccionar con los iones fosfato del suelo formando precipitados de distinta solubilidad (Jackobsen 1993b):



## EL CALCIO EN LA PLANTA

Entre las especies vegetales existen notables diferencias en cuanto a sus requerimientos de calcio, lo que ha motivado el establecimiento de dos grupos totalmente diferenciados. Algunas especies precisan un medio edá-

fico en el que abunde este elemento y constituyen el grupo de plantas calcícolas, entre las que se encuentran la remolacha azucarera, la zanahoria, algunas leguminosas, etc.; otras se desarrollan mejor cuando son escasas las formas más o menos solubles de calcio y está poco saturado el complejo absorbente, constituyendo el grupo de las especies acidófilas (altramuz, sandía, etc.). La mayor parte de las plantas cultivadas se sitúan entre ambos extremos, es decir, viven mejor y les basta con que el complejo de cambio esté suficientemente saturado con una adecuada proporción de calcio (Sánchez y Dios Vidal, 1976).

## Demanda, absorción y traslocación

El contenido de calcio en las plantas varía entre el 0,1 y el 5 % de su peso seco, dependiendo de la especie, del órgano y de las condiciones de crecimiento. Por otro lado, los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  libre en el citoplasma y en los cloroplastos deben ser muy bajos, para evitar la precipitación del fósforo inorgánico y la inactivación o activación incontrolada de ciertas enzimas como la fosfolipasa y la NAD-quinasa (Dieter, 1984). Estos niveles de calcio celular se consiguen merced a membranas plasmáticas que actuarían de barrera frente a la penetración de iones  $\text{Ca}^{++}$ ; como consecuencia, la concentración de este elemento en el citosol puede mantenerse dentro de niveles bajos. Esta incorporación regulada del  $\text{Ca}^{++}$  al citosol se realiza a través de la calmodulina (Dieter, 1984); proteína de bajo peso molecular (20.000 KDa) a la que se une el calcio de forma reversible con alta afinidad y selectividad.

La formación de oxalato cálcico en las vacuolas ayuda a mantener un nivel bajo de calcio libre en el citosol y en el cloroplasto lo que permite la regulación de la presión osmótica.

A nivel celular, las plantas son genótipicamente diferentes en su demanda de calcio (absorción, transporte y compartimentación). Esta se halla estrechamente relacionada con la capacidad de cambio catiónico que presentan las paredes celulares y especialmente con la cantidad de grupos carboxílicos libres (ácido poligalacturónico). En general, las plantas dicotiledóneas presentan mayor capacidad de cambio catiónico y mayor demanda de calcio. Esta es una de las razones por las que la deficiencia de calcio se manifiesta casi exclusivamente en plantas dicotiledóneas. En los vegetales que producen gran cantidad de oxalato, la disponibilidad de calcio para otras funciones, especialmente para la estabilidad de las membranas, decrece considerablemente.

La necesidad de calcio en el caso particular del manzano, calculando una producción anual de 5-6 Tm de materia seca por hectárea, podría estimarse en unos 25 kg  $\text{ha}^{-1}$ . La proporción de calcio (en % de materia seca) en las distintas partes de un frutal puede ser la siguiente (Vang-Petersen, 1980):

Raíces y tallos.....	1,20
Ramas.....	0,60
Hojas.....	0,90
Frutos.....	0,02

Para que los minerales del suelo sean absorbidos por las plantas deben, en primer lugar, pasar de la solución del suelo al interior de las células de la raíz. El calcio absorbido atraviesa la epidermis, el parénquima cortical a través de los canales citoplasmáticos que conectan las células, la endodermis y el parénquima vascular, penetrando en los vasos leñosos del xilema (Fig. 2).

Las raíces toman el calcio del suelo en forma iónica, y su absorción depende de factores exógenos y endógenos. Entre los primeros destacan los del suelo: contenido de agua, pH, grado de aireación, temperatura, concentración de  $\text{Ca}^{++}$  y proporción de otros elementos. De los factores endógenos merecen señalarse los relacionados con: la pared celular, respiración, fotosíntesis, transpiración y efectos específicos (antagonismo y/o sinergismo) de otros iones.

La toma de calcio y su distribución por los distintos órganos se incrementa a medida que lo hace la tasa de transpiración. Por el contrario, la inhibición de esta transpiración disminuye la traslocación de calcio, especialmente a los brotes apicales y a los frutos, aunque también puede hacerlo al resto de la planta (Armstrong y Kirkby, 1979).

Se ha demostrado (Marschner, 1983) que la movilidad del calcio es mucho mayor en la compartimentación extracelular de la planta, constituida por el apoplasto (conjunto de las paredes celulares, incluidas las células del xilema) que en la compartimentación intracelular, el simplasto (comunidad de protoplastos vivos, incluidos los tubos del floema).

El transporte de calcio a las hojas parece estar más relacionado con la tasa de crecimiento de las raíces que con la de los brotes (Scaife y Clarkson, 1978). Por otra parte, el calcio tiende a reducir la permeabilidad de las raíces jóvenes, lo que provoca la expansión de éstas y también la de sus pelillos radiculares, lo que potencia una mayor y más eficaz exploración del suelo.

Los iones calcio y boro son transportados casi exclusivamente por los vasos del xilema, mientras que potasio, magnesio, compuestos nitrogenados y fosforados, son transportados principalmente por el floema. En efecto, análisis de las savias del floema y del xilema, han demostrado que la traslocación se produce principalmente a través de este último, bien en forma iónica o acompañado con ácidos málico o cítrico (Vang-Petersen, 1980).

Por otra parte, la concentración de calcio en el floema es muy baja y su traslocación muy lenta y no responde ni a niveles hormonales ni a un exceso de transpiración. Teniendo en cuenta la elevada concentración de fosfatos en la savia del floema y su pH (7-8), la solubilidad del  $\text{Ca}^{++}$  en este fluido se ha calculado inferior a 0,5 mM (Goor y Wieresma, 1974), aunque su concentración puede también depender de la presencia de agentes acomplejantes.

Las fluctuaciones en el estado hídrico de los distintos órganos de una planta están correlacionadas con la dinámica del transporte de calcio (Wiebe et al., 1977). Así, los órganos con amplia superficie (hojas frente a frutos) o los que están más directamente expuestos al medio ambiente (hojas exteriores frente a las interiores) reciben agua y calcio a través del xilema. Este abastecimiento hídrico está influenciado por la presión osmótica de la solución del suelo, así como por las condiciones que favorecen una alta tasa de transpiración; por tanto, el transporte de agua y calcio, vía xilema, a hojas y frutos puede quedar temporal o permanentemente (caso de sustratos salinos) restringido (Ende et al., 1975).

La tasa de traslocación del calcio en el xilema viene regulada por intercambio catiónico más que por el flujo hídrico, respondiendo a los distintos gradientes de humedad, así como a las diferentes concentraciones de nutrientes (principalmente nitrógeno). Sin embargo, este flujo no está correlacionado con la cantidad de calcio transportado (Marschner, 1983).

## Almacenamiento: calcio en el fruto

La traslocación del calcio también está influenciada por el grado de madurez de las plantas y de sus órganos. Dos factores parecen ser los responsables: 1) un incremento de agua en el fruto a través del floema; 2) una disminución en la sustitución del  $\text{Ca}^{++}$  intercambiable del apoplasto, en el caso de hojas totalmente desarrolladas. Esta sustitución depende principalmente de la cantidad y tipo de sales cálcicas almacenadas en las vacuolas, pero hay que tener en cuenta que la capacidad de almacenamiento de sales solubles de calcio (nitrato, malato, etc.) en las vacuolas queda restringida por la presión osmótica.

El calcio es poco móvil y tiende a acumularse en los órganos más viejos, mientras que los de mayor actividad metabólica (hojas en crecimiento, flores, frutos y meristemas apicales) son los tejidos que necesitan un mayor aporte (Fig. 2); por tanto la deficiencia de este macronutriente afecta en primer lugar a las partes en formación y meristemas en crecimiento, donde queda fijado y prácticamente inmóvil en sus paredes celulares. Debido a esta inmovilidad, las hojas viejas pueden tener concentraciones normales de calcio, mientras que las hojas jóvenes, frutos u otros órganos, pueden presentar niveles por debajo de la normalidad (Chiu y Bould, 1977).

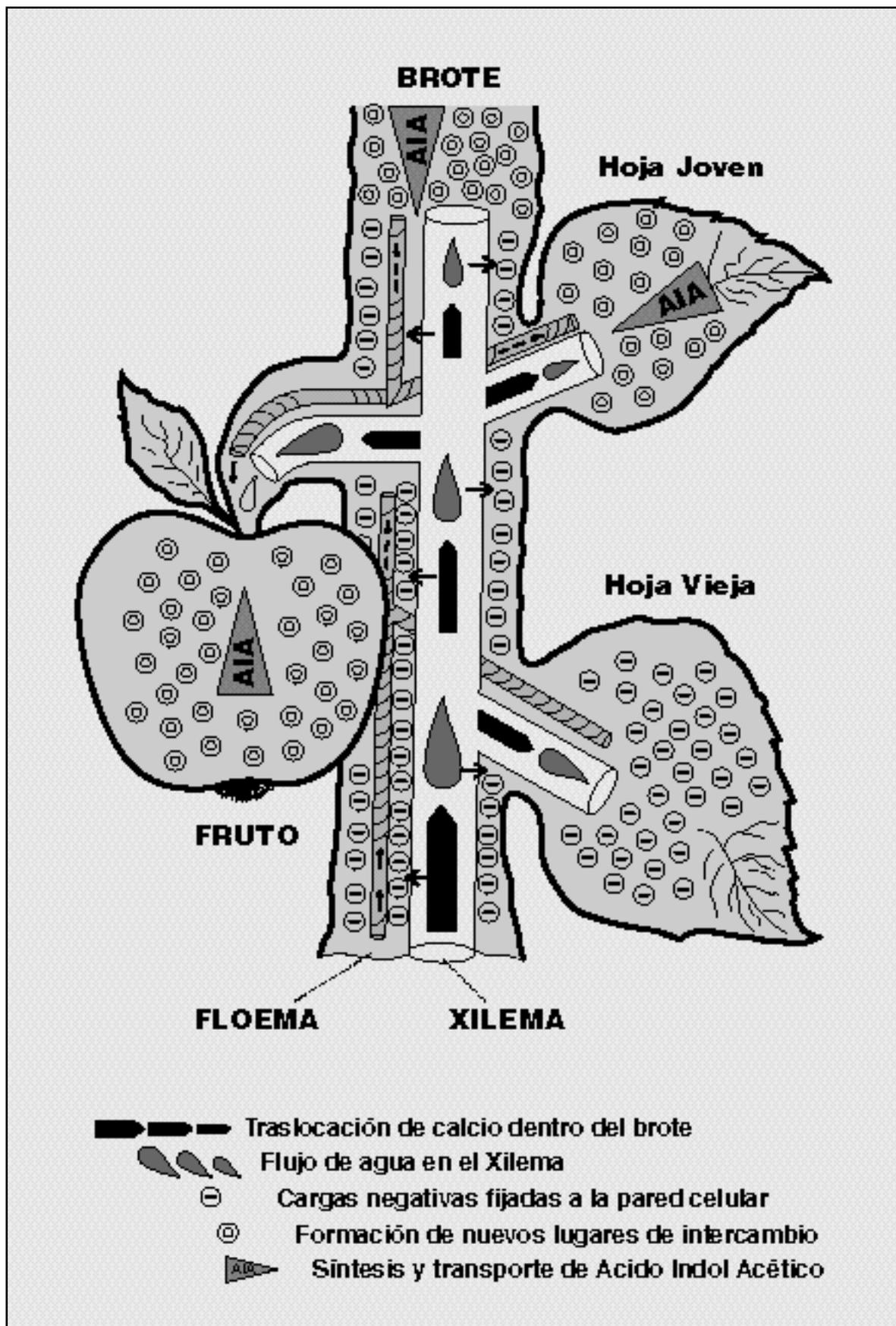


Figura 2.- Representación esquemática del transporte y almacenamiento del calcio en el manzano.

Mientras que la toma de algunos macroelementos por parte del fruto se realiza de forma continuada, permaneciendo metabólicamente activos durante la vida del mismo, análisis de calcio realizados en manzanas de la variedad Cox's Orange Pippin, con distinto grado de maduración, han demostrado que el paso de calcio al fruto se realiza en dos fases. En la primera, conforme el elemento llega al fruto (a través del xilema) se va acumulando, hasta que se produce un cambio metabólico que coincide con el fin de la división celular y el comienzo de la elongación. A esta fase le sigue una segunda, con entrada y salida de calcio en el fruto, donde su concentración aumenta muy poco o permanece prácticamente constante, y el aporte de agua se realiza entonces a través del floema donde, como ya se ha comentado, la concentración de calcio es muy baja (Link, 1976).

Una de las causas de la escasa concentración de calcio en el fruto, en relación con la existente en el resto de órganos, de nuevo parece ser la baja tasa de transpiración (Link, 1974), si bien, aun en condiciones normales, la entrada de calcio a través del pedúnculo es más lenta que la del resto de nutrientes; su salida, sin embargo, puede ser rápida y abundante, cuando la transpiración es excesiva, alcanzando pérdidas de hasta 10 mg Kg<sup>-1</sup> de peso fresco (Wilkinson, 1970). Ello se debe a la fuerte competencia por este elemento entre los frutos y los brotes en crecimiento (meristemas apicales y nuevas hojas).

La distribución del calcio que penetra en el fruto resulta bastante irregular, ya que la mayor parte permanece inmovilizado como oxalato en el floema peciolar, en la zona de inserción con el fruto (Stebbins et al., 1972); su concentración suele ser mínima inmediatamente debajo de la piel y en la zona calicina, que precisamente son los lugares donde suele manifestarse el bitter pit (Ferguson y Watkins, 1989).

## **ALTERACIONES METABOLICAS, BIOQUIMICAS Y ESTRUCTURALES EN LA DEFICIENCIA DE CALCIO**

El papel que juega el calcio en funciones estructurales, en la regulación de la permeabilidad de la membrana y en la rigidez de las paredes celulares podría dar la clave de cómo se inicia el desarrollo del bitter pit (Hetch-Buchholz, 1979). La escasez de calcio en las membranas incrementa su permeabilidad a ácidos y fenoles, los cuales pueden penetrar más fácilmente en el citoplasma y destruir o coagular enzimas de mitocondrias o de otras partículas subcelulares (Ferguson, 1990).

El hecho de que las células afectadas por bitter pit conserven intactas sus paredes, entre las que aún quedan retenidos granos de almidón y mitocondrias en perfecto estado, sin que manifiesten falta de adhesión o acorchamiento, podría significar que, por algún motivo, no se mantiene la semipermeabilidad de la membrana celular.

Sus fibras se disgregan y acumulan corpúsculos de grasa, lo que ocasiona una pérdida de turgencia (Blasco, 1977).

El calcio, al estabilizar las membranas celulares mediante uniones a los grupos fosfato de los fosfolípidos o de las proteínas, provoca interacciones entre ambos tipos de moléculas, preferentemente en la superficie de las membranas; esto altera el tamaño de los poros que las atraviesan y también la permeabilidad específica a los electrólitos (Legge et al., 1982). Así pues, el principal papel fisiológico del calcio está relacionado con su capacidad de coordinación, que le proporciona la posibilidad de formar uniones intermoleculares reversibles. Los grupos R-COO<sup>-</sup> de las pectinas (polímeros del ácido poligalacturónico) se unen al Ca<sup>++</sup> para formar la sal correspondiente (pectato cálcico). La degradación de estos pectatos se produce por acción de la poligalacturonasa, enzima que es inhibida por altas concentraciones de calcio. Los tejidos deficientes presentan un incremento en la actividad de la citada enzima (Konno et al., 1984), lo que provoca la degradación de las paredes celulares. Por otra parte, el ablandamiento que se produce en los tejidos al madurar se debe a la rotura enzimática de las protopectinas que componen el almacén de la pared celular, las cuales, degradadas por agentes oxidantes, liberan ácido. De esta forma dichas paredes se reticulan, las células pierden compartimentación y el fruto firmeza (Sharples y Johnson, 1977).

La deficiencia de calcio no tiene efecto sobre los contenidos de pectina y de hemicelulosa en las paredes celulares de la raíz, pero la concentración de celulosa queda reducida casi en un 20%. En las partes aéreas, sin embargo, la celulosa se incrementa y lo mismo ocurre en el fruto, donde este aumento provoca el desarrollo de estructuras más rígidas y una mayor susceptibilidad al agrietamiento.

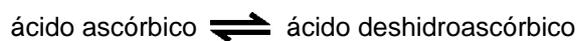
Una peculiaridad de los tejidos deficientes en calcio es el incremento de su tasa de respiración, que podría deberse al aumento de la permeabilidad de las membranas en los tejidos deficientes, lo que provocaría una liberación más fácil de los principales substratos respiratorios (ácido málico y azúcares) desde las vacuolas a las enzimas respiratorias del citoplasma y a las mitocondrias (Bangerth, 1974). Otra teoría apunta como causa del aumento de la tasa respiratoria que el calcio participa también en otros procesos, como la síntesis de algunas proteínas que son capaces de controlar la respiración (Bangerth, 1974).

La acción del calcio en la transpiración es antagónica con la del potasio, si bien la relación de equilibrio entre ambos cationes varía con la especie e incluso entre variedades. Por ello, el efecto del calcio aportado con el encañado (especialmente en condiciones de déficit hídrico) puede ser perjudicial si al mismo tiempo no se adiciona potasio.

El calcio puede estimular o inhibir la actividad de ciertas enzimas como la de la ATPasa unida a la mem-

brana. Igualmente importante es su papel como activador de la amilasa, lo que podría explicar el alto contenido de almidón en tejidos con bitter pit, como resultado de una actividad baja de esta enzima en condiciones de déficit (Bangerth, 1974).

El calcio afecta la distribución subcelular del ácido ascórbico. Tratamientos realizados con calcio, antes de la recolección, en tres variedades de manzano demostraron que el contenido de ácido ascórbico en frutos se incrementaba de un 20 a un 40%; con tratamientos después de la recolección el incremento solo fue del 5-10% (Bangerth, 1974). Es posible que esto tenga algún significado en el desarrollo del bitter pit, debido a que el sistema redox:



podría jugar un importante papel en la prevención de la oxidación de los tejidos de la manzana. La polifenol-oxidasa (PPO) cataliza la oxidación a quinonas de los o-dihidroxifenoles, los cuales en una posterior polimerización provocan la formación de pigmentos marrones (Reyes y Luh, 1960). Trabajos realizados sobre "Golden Delicious" demostraron la relación entre esta enzima, el calcio y el desencadenamiento del bitter pit (Hopfinger et al., 1984).

Fukumoto y Nagai (1983) observaron que manzanas con bitter pit, procedentes de frutales cultivados en solución nutritiva, contenían menor cantidad de Ca que los frutos sanos, si bien la fracción mitocondrial del mismo era mayor. Este hallazgo junto a la mayor actividad de la succinato:citocromo c oxidoreductasa demuestra que la funcionalidad mitocondrial se incrementa con el desarrollo de la enfermedad.

Por otra parte, parece ser que el  $\text{Ca}^{++}$  desempeña un importante papel en el mecanismo regulador de la apertura y cierre estomáticos; se ha observado que, con antelación al cierre estomático, los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  citoplasmático aumentan considerablemente en las células guarda por efecto del ácido abscísico (ABA). Como hipótesis, se propone que el  $\text{Ca}^{++}$  actuaría de mensajero durante la estimulación de dicho cierre estomático (De Silva, et al. 1985) poniendo en marcha la maquinaria intracelular responsable de una reducción de turgencia en las citadas células (Mansfield, et al 1990). El aumento de  $\text{Ca}^{++}$  citoplasmático podría ser el resultado de un exagerado flujo de  $\text{Ca}^{++}$  y/o de su masiva liberación desde los lugares de almacenamiento. Este hecho también ha sido puesto de manifiesto en otras células (mesofílicas, epidérmicas, etc.) y en diferentes órganos de algunas especies (raíces y coleoptilo de maíz y de tabaco, hipocotilos de perejil) lo que podría sugerir que se trata de un fenómeno generalizado (Gehring et al., 1990).

## FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESENCADENAMIENTO DEL BITTER PIT

### Nutrición mineral

La deficiencia de calcio es, con toda seguridad, la principal causa del bitter pit. La relación entre el calcio y el desarrollo de esta enfermedad ya fue establecida por DeLong en 1936. Una vez manifestada, su corrección es posible mediante aplicaciones de nitrato cálcico en las zonas afectadas durante el desarrollo del fruto; mientras, en la parte de las manzanas no sometida a este tratamiento apareció sintomatología característica del bitter pit (Chittenden et al., 1969).

Como el  $\text{Ca}^{++}$  en el suelo está en equilibrio generalmente con el  $\text{NO}_3^-$ , las concentraciones de ambos iones en distintos órganos del frutal (hojas y frutos) se hallan altamente correlacionadas. Cuando el nitrógeno es aplicado como nitrato, mediante aspersión foliar, se incrementa la acumulación de calcio en hojas viejas, mientras que si se aplica en forma amoniacal aumenta en las jóvenes (Vang-Petersen et al., 1973).

Lüdders (1979) demostró que un aporte de sales de amonio a árboles cultivados en arena, incrementaba la incidencia del bitter pit durante el almacenamiento del fruto, aunque no se observaban manchas antes de la recolección. Fukumoto y Nagai (1983), con manzanos desarrollados en solución nutritiva que contenía sales amónicas en lugar de nitrato, encontraron una mayor susceptibilidad de los frutos a desarrollar la enfermedad, mostrando además una menor concentración de calcio y mayor contenido de nitrógeno (compuestos amónicos).

El antagonismo de otros iones con el calcio puede ponerse de manifiesto tanto en los mecanismos de absorción, traslocación y almacenamiento, como posteriormente, dentro ya del mismo fruto.

Respecto a la relación de otros elementos con el bitter pit, Sadowski y Czescik (1977), por ejemplo, encontraron, en tejidos afectados, un menor contenido de calcio y una mayor concentración de magnesio, fósforo y potasio. Este último, como antagonista del calcio, retarda su absorción, y la concentración de calcio, tanto en frutos como en hojas, está correlacionada negativamente con el aporte de potasio (Forsyth y Webster, 1971). También la aplicación de magnesio, bien al suelo o por vía foliar, disminuye la concentración de calcio en hojas y raíces (Vang-Petersen, 1974). Infiltraciones al vacío realizadas en frutos de manzano, utilizando soluciones de  $\text{MgCl}_2$ , demostraron que el ion  $\text{Mg}^{++}$  induce la aparición de los síntomas de bitter pit, mientras que infiltraciones con sales de  $\text{Ca}^{++}$  previenen su desarrollo (Burmeister y Dilley, 1993). Es de destacar que estos antagonismos se suelen producir fundamentalmente en los frutos, donde la relación entre  $\text{Mg}+\text{K}/\text{Ca}$  es 20-50:1; mientras que en hojas esta relación es de 1-2:1 (Bangerth, 1974b).

Carvalho et al. (1963) determinaron el grado de afinidad de algunos cationes por las membranas plasmáticas y demostraron que el  $H^+$  era el catión con mayor afinidad (aproximadamente 100 veces las de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ ) y que las de  $K^+$  y  $Na^+$  eran 100 veces inferiores a la de  $Ca^{++}$ . Estos resultados sugieren que la concentración de  $H^+$  influye en la integridad de la membrana, debido al antagonismo entre estos dos iones ( $Ca^{++}$  e  $H^+$ ), grave problema en frutos con alto contenido de ácidos libres, que en el caso del manzano puede desembocar en el desarrollo del bitter pit.

Woodbridge et al. (1974) apreciaron un incremento en la absorción de calcio cuando existía suficiente boro en el sustrato. En la misma línea, Lidster et al. (1975) encontraron una correlación negativa entre la incidencia de bitter pit y concentraciones crecientes de boro, y más recientemente Granelli y Ughini (1988) han demostrado una influencia positiva de la fertilización con boro sobre algunas características determinantes de la calidad del fruto.

Estudios realizados sobre la composición mineral de distintos órganos han demostrado que la concentración de calcio en fruto a comienzos de julio, no puede preverse en base a los valores en hoja de muestras tomadas en mayo o a finales de junio, y que la única vía para conocer la composición mineral del fruto es a través de su propio análisis químico (Marcelle, 1990).

Dada la particular localización de los síntomas, se pudo postular la teoría osmótica del desarrollo del bitter pit. Smock (1941) encontró que la presión osmótica en la parte inferior de la manzana era menor que en la mitad próxima al pedúnculo (Fig. 1) y por consiguiente, el tejido del parénquima de la primera debería ser más propenso al estrés hídrico.

Por último, Marcelle (1993) en su reciente revisión destaca la necesidad de un control estricto de las relaciones  $K/Ca$  y  $N/Ca$  como parámetros a considerar dentro de la relación nutrición mineral-fruto.

## Carga de cosecha y crecimiento vegetativo

Incrementos en el aporte de calcio a los frutales conducen a un aumento de su concentración foliar, pero no en otros órganos de la planta. Las plantas han desarrollado mecanismos para restringir el transporte de calcio hacia esos órganos, manteniendo baja su concentración en savia, mediante la precipitación como oxalato en los vasos conductores. La misma consecuencia produce el fenómeno de dilución derivado del crecimiento vegetativo (Mix y Marschner, 1976). Sin embargo, las elevadas tasas de crecimiento de algunos órganos incrementan el riesgo de que el contenido de calcio se sitúe por debajo del nivel crítico para la integridad de la membrana, provocando desordenes metabólicos como el bitter pit en manzano. Los frutos grandes contienen más y mayores células y

menor concentración relativa de calcio que los frutos pequeños (Fig. 3).

Altas densidades de cosecha producen una mayor concentración de calcio tanto en frutos como en hojas; por ello, los frutos pequeños presentan menor incidencia de bitter pit (Chiu y Bould, 1977); sin embargo, un reducido tamaño de fruto suele ocasionar su depreciación en el mercado.

Considerado un árbol en su conjunto, la relación superficie foliar/carga de cosecha es un parámetro que puede muy bien reflejar tanto el cuajado del fruto como las condiciones nutricionales en que se ha desarrollado su crecimiento. Por consiguiente, incidiendo sobre los componentes de la citada relación se podrá influir de manera directa sobre el proceso de división celular o de alimentación de la planta y, en consecuencia, sobre el tamaño medio del fruto. Así, todas aquellas prácticas culturales encaminadas a incrementar el valor de dicha relación, tales como abonados nitrogenados fuertes o poco uniformes, podas severas o aclareos excesivos, al provocar un aumento de vigor, tenderán a fomentar el desarrollo del bitter pit, pero no necesariamente por que se vayan a formar frutos más grandes. En este sentido ya Sharples (1964) apuntó que, en general, otros factores y no solo el tamaño, eran responsables de la mala calidad de los frutos procedentes de árboles con bajas cosechas. De igual forma, Link (1973) señaló que el tamaño no se podía considerar un factor importante con respecto a la susceptibilidad del fruto al bitter pit, sino que la incidencia dependería más de la relación hoja/fruto y, en particular, de la intensidad del crecimiento vegetativo durante los primeros meses del ciclo anual.

Tales consideraciones fueron confirmadas por Blasco (1976) en un ensayo con manzanos adultos de la variedad Cox's Orange Pippin sobre varios patrones. A los árboles se les impusieron diferentes cargas de cosecha y los resultados mostraron que los frutos de mayor calibre, procedentes de árboles con menos carga, no desarrollaron significativamente más bitter pit que los de menor tamaño, procedentes de árboles sobrecargados, a pesar de que a igualdad de tamaño, la concentración de calcio en los primeros era menor.

## Patrón

Las características genéticas de las raíces son factores importantes en los cultivos porque determinan su vigor, tolerancia a diferentes tipos de suelo y de ambientes, resistencia a enfermedades cuyo origen está en el suelo, compatibilidad con la variedad, asimilación y equilibrio de nutrientes y, finalmente, a factores de producción como la calidad del fruto y la cantidad de cosecha (Westwood et al., 1973)

Blasco (1976) analizó el efecto del patrón sobre frutos almacenados 100 días en cámara frigorífica, y encontró diferencias significativas entre los patrones ensayados, en lo que respecta al desarrollo del bitter pit. Lewis et al. (1977) estudiando la composición química de hojas y frutos demostraron igualmente que estaba influenciada por el patrón.

Más recientemente, Duarte (1993) ha comprobado la influencia del patrón sobre las concentraciones no solo de Ca sino también de otros nutrientes como N, P, K, Mg y Mn.

Estos experimentos permiten afirmar que el portainjerto ejerce una influencia selectiva sobre la traslocación de ciertos elementos, en particular el calcio, con la consiguiente repercusión sobre el desarrollo posterior del bitter pit.

### Reguladores de crecimiento

El metabolismo del calcio está también influenciado por determinadas fitohormonas. Según Dekock et al. (1982), durante el crecimiento de la planta se producen una serie de hormonas, como las citoquininas, que bajan el nivel de calcio, mientras que otras, como el ácido abscísico, inhibidor del crecimiento, tienen el efecto opuesto.

Los reguladores del crecimiento pueden influir en el desarrollo del bitter pit a través de cuatro vías de actuación: a) controlando el vigor vegetativo y por consiguiente reduciendo la competencia por el calcio; b) reduciendo el tamaño del fruto; c) actuando sobre la maduración; d) controlando la movilización de nutrientes.

Existen buenas perspectivas para el control del bitter pit mediante la aplicación de reguladores de crecimiento que permitan controlar el vigor del árbol, lo que puede ser de gran interés si consideramos que la enfermedad aparece fundamentalmente en frutos procedentes de árboles con fuerte crecimiento vegetativo.

La aplicación de inhibidores del crecimiento, como la daminozida (Alar) o el paclobutrazol (Cultar), a los manzanos provoca aumentos en los niveles de calcio tanto en hoja como en fruto (Miller y Swietlik, 1986). Por el contrario, el tratamiento con giberelinas como el GA4+7, puede reducir el calcio del fruto (Looney, 1979).

En el mercado existen reguladores capaces de provocar una reducción de la competencia brote-fruto, razón por la que se han experimentado para el control del bitter pit. Así, Sansavini et al. (1986) pudieron reducir la incidencia de la enfermedad en manzano, mediante aspersiones foliares de paclobutrazol durante tres años. Sin embargo, a pesar de unos primeros resultados esperanzadores, se necesitarán nuevos estudios en esta línea si se desea generalizar el uso de reguladores como alternativa para la prevención y/o tratamiento del bitter pit, ya que todavía existen serias dudas acerca de los mecanismos de acción que tienen realmente estas sustancias.

### Balance hídrico

La experiencia demuestra que en los veranos secos la incidencia del bitter pit es mayor que en los húmedos, lo

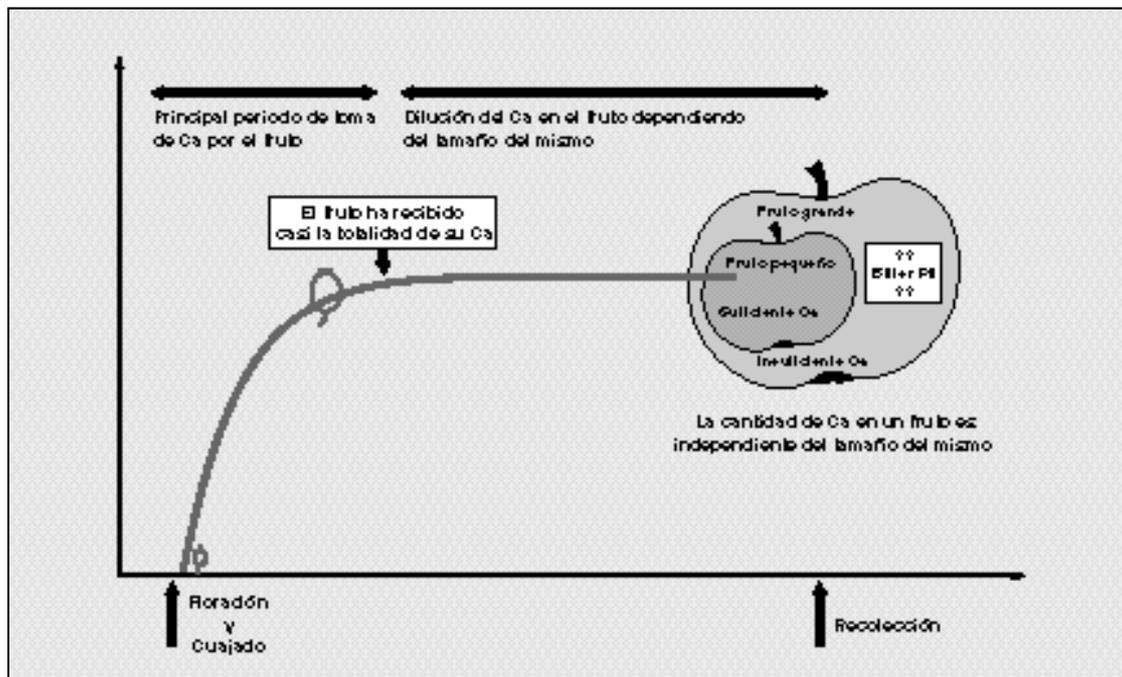


Figura 3.- Representación gráfica de la absorción de calcio en manzana (Shear and Faust, 1971).

que lleva a pensar que la clave fundamental para una absorción y traslocación más homogéneas de los nutrientes es, el correcto balance hídrico. Fochessati (1975) encontró una relación muy estrecha entre contenido cálcico de frutos y hojas y la cantidad total de agua suministrada, de forma que la máxima concentración de nutrientes correspondería a los árboles que habían recibido un volumen de agua óptimo a lo largo del período de crecimiento. Esto sugiere que, en general, el problema del bitter pit podría deberse a dificultades para el mantenimiento del adecuado nivel de humedad en el suelo. En estudios realizados con distintos niveles hídricos en macetones, Failla et al. (1990) concluyen que una deficiencia hídrica ligera reduce la aparición de bitter pit, con un efecto muy escaso sobre el tamaño del fruto y un fuerte control sobre el crecimiento vegetativo.

## DIAGNOSTICO Y CORRECCION DEL BITTER PIT

En el manzano, los síntomas de la deficiencia de calcio suelen hacerse patentes principalmente en los meses de verano: hojas adultas curvadas en forma de copa, con la concavidad dirigida hacia el suelo, y en las hojas jóvenes, clorosis y manchas o rayado marrón (Shear, 1971).

El bitter pit en los frutos se manifiesta desarrollando unas manchas típicas, pequeñas áreas (de 2 a 6 mm de diámetro) inicialmente incoloras, que posteriormente se vuelven parduzcas. Estas manchas se localizan, por lo general, en zonas aisladas del exterior del mesocarpio, preferentemente a 1-2 mm por debajo de la piel. Las manchas, en número variable, están constituidas por células que, aunque muertas y deshidratadas, conservan intactas sus paredes (Wilkinson, 1972). Estando aún el fruto en el árbol, el daño puede pasar desapercibido, especialmente si el régimen hídrico es el adecuado; pero los síntomas se manifiestan claramente al exterior con posterioridad y, de forma más acusada, tras un periodo de 6 a 12 semanas de conservación en cámara a 3-4°C; a veces como manchas negruzcas del tamaño de lenticelas, en las zonas más coloreadas de la epidermis, que afean el aspecto del fruto y le dan un característico sabor amargo (Blasco, 1977). Además, pueden aparecer profundas grietas longitudinales debidas a una reducción de la flexibilidad de las paredes celulares (Shear, 1971).

La incidencia del bitter pit puede preverse (finales de julio), con un aceptable grado de fiabilidad mediante análisis de hoja, sólo cuando además se tienen en cuenta otros parámetros como masa foliar, crecimiento de brotes, producción, tamaño del fruto, etc. (Pouwer, 1974). De igual forma, la predicción del bitter pit basada en el análisis mineral del fruto, inmediatamente antes de su recolección, es bastante insegura.

Pouwer (1974) propuso un coeficiente para la predicción de la enfermedad, cuyo valor se obtiene multiplicando el peso del fruto por el valor de la relación K/Ca en hoja. Cuando este valor se sitúa por debajo de 150, es poco probable el desarrollo del bitter pit; si por el contrario, es superior a 250 existen muchas probabilidades de que aparezca la enfermedad. Por último, también es posible la predicción del bitter pit hasta 2 semanas antes de la recolección tratando los frutos con una solución que contenga 2000 ppm de Ethrel (ácido cloroetilfosfónico ó CEPA) y conservándolos a 20 °C. (Hilkenbäuner y Naumann, 1974), si bien parece ser que el grado de incidencia pronosticado suele superar al que posteriormente se desarrolla. El método fue modificado realizando el muestreo en el momento de la recolección, eliminando el tratamiento con Ethrel y manteniendo los frutos a 20 °C durante dos semanas; los resultados ofrecen una buena predicción de la incidencia del bitter pit y puede considerarse como un método aceptable para frutos que vayan a ser almacenados durante largo tiempo.

En la actualidad, la terapia más comunmente utilizada para el control del bitter pit está basada en aspersiones de calcio sobre las hojas o frutos (p. ej.  $\text{CaCl}_2$  al 5%, y/o  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  al 0.65-0.80%). En ocasiones, son necesarias más de 10 aspersiones para evitar el bitter pit. Así, Quast (1983) después de 13 tratamientos (entre junio y noviembre), primero con nitrato cálcico y luego con cloruro cálcico encontró que del 1 al 5% de los frutos de la variedad Cox's Orange desarrollaron bitter pit. Debe señalarse, no obstante, que en general, las aplicaciones foliares por sí solas no tienen efecto o éste es imperceptible, debido a que la cantidad de calcio que se trasloca desde las hojas a los frutos es muy escasa (Schumacher et al., 1976).

Rease y Drake (1993) realizaron aspersiones con  $\text{CaCl}_2$  (1.36 ó 1.8 kg/378 L de agua) sobre frutos de 'Delicious' y 'Golden Delicious' con lo que elevaron los niveles de calcio, al menos en un 10%. Estas aplicaciones deben efectuarse cuando la humedad del aire es baja a fin de facilitar la penetración del nutriente.

La inmersión de los frutos en soluciones de calcio, tiene un efecto muy similar al que se consigue con aspersiones (Schumacher et al., 1976). La inmersión durante 10 minutos en solución 0.125M  $\text{CaCl}_2$  parece ser más recomendable que sí se realiza en  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , debido al riesgo de que en las manzanas queden residuos de iones nitrato. Conway y Sams (1983) infiltraron por vacío o bajo presión distintas soluciones de  $\text{CaCl}_2$  en manzanas Golden, encontrando que el tratamiento idóneo era la infiltración bajo presión con una solución del 4%. Este tipo de tratamiento puede ocasionar problemas en manzanas que tienen abierta la cavidad calicina (Fig. 1), ya que la solución puede penetrar al corazón del fruto y provocar su podredumbre.

Debido a la fuerte competencia entre brotes y frutos, para evitar o paliar el desarrollo del bitter pit se recomienda una poda de verano o despunte 3 ó 4 semanas antes de la recolección. Esta práctica permite aumentar la concentración de calcio en el fruto en aproximadamente un 10%, lo que ocasiona un fuerte descenso de la enfermedad en los frutos almacenados (Preston y Perring, 1974).

## EL BITTER PIT EN RELACION CON LA CALIDAD Y CONSERVACION DEL FRUTO: COMPORTAMIENTO VARIETAL

De todos los nutrientes minerales, el calcio del fruto parece ser el elemento de mayor importancia en la calidad para la conservación. El umbral de riesgo para el desarrollo del bitter pit se sitúa alrededor de 50 mg kg<sup>-1</sup> de peso fresco de fruto, si se trata de conservación normal en frío, aunque este valor puede quedar reducido hasta 45 mg kg<sup>-1</sup> para conservación en atmósfera controlada.

A título informativo se ofrecen en el Cuadro 1 unos valores de concentración de minerales en hoja y fruto de manzano que pueden servir de referencia interpretativa para esta especie (Sharples, citado por Bergmann, 1992).

Una de las medidas más eficientes para evitar el bitter pit durante el almacenamiento es la recolección de frutos en el momento adecuado. La fecha exacta de recolección se puede predecir siguiendo el método de Zachariae (Bünemann, 1974), basado en el incremento de la emisión de compuestos aromáticos volátiles, al inicio del periodo preclimático de la respiración, medidos por cromatografía gaseosa y utilizando como indicador butilacetato. Una recolección inadecuada produce alteraciones fisiológicas en el fruto. Así, cuando se realiza antes de tiempo, se desarrolla el bitter pit y la coloración verde de la piel va cambiando hasta alcanzar un tono amarillento; por el contrario, una recolección demasiado tardía produce una descomposición interna del corazón (breakdown), conocida también como manzanas "cluecas" (Murga y Pala-

zón, 1984). El desplazamiento de determinados compuestos hacia la piel desde otras partes del fruto puede considerarse el agente iniciador de la enfermedad. Para evitar esta traslocación es recomendable mantener los frutos en la oscuridad (Bünemann, 1974).

Aunque las condiciones de almacenamiento no inciden directamente en la aparición del bitter pit, en general, prácticas orientadas a mantener baja la tasa de respiración, que conducen a un retraso en la maduración del fruto, o tendentes a preservar un alto grado de humedad, retardan el comienzo de la enfermedad. Asimismo, se ha demostrado que el almacenamiento en atmósfera reductora o inerte no solamente retrasa el comienzo del bitter pit sino que también disminuye su incidencia (Sharples, 1968).

Las distintas variedades de manzano presentan diferente grado de susceptibilidad al bitter pit, dependiendo, como se ha indicado, del portainjerto y de determinados factores ambientales, puesto que se trata de una enfermedad "de añada". Salmerón (1967) clasificó las variedades de manzano como muy sensibles (Reineta de Reinetas, Bella de Boskoop, Canadá blanca, Calvilla, Richard y Delicious) y medianamente sensibles (Golden y Reineta de Maus). Más recientemente Bergmann (1992) diferencia las variedades de manzanas según su potencial para desarrollar esta enfermedad, en cuatro grupos:

Altamente susceptibles: Albrechts, Auralia, Blenheim Renette, Carola, Clivia, Cox's Orange Pippin, Gold Parmaine, Harbert Renette, Herma, Ingrid Marie, James Grieve y Maigold.

Moderadamente susceptibles: Alkmene, Apollo, Breuhahn, Roba, Rogo, Red Boskoop y Starcrimson.

Ligeramente susceptibles: Bancroft, Belgolden, Champagne, Renette, Gloster, Helios, Jonagold, Jonathan, Juno, Landsberger, Laxton Superb, Macaun, Ontario, Redspur Delicious, Swiss Orange, Starking Delicious y Yellowspur Delicious.

Cuadro 1.- Optimos nutricionales en hojas y frutos de manzano Cox's Orange Pippin.

Concentraciones en hoja (agosto)	% Peso seco				
	N	P	K	Ca	Mg
Alta producción	2.4-2.8	0.20-0.25	1.3-1.6	-	0.25-0.30
Almacenamiento (óptimos)	2.6 max.	0.24 min.	1.6 max.	-	0.25 min
Concentraciones en pulpa (fruto)	% Peso fresco				
	N	P	K	Ca	Mg
Almacenamiento (óptimos)	0.05-0.07	0.011	0.13-0.16	0.005	0.005

Muy poco susceptibles: Berlepsch, Golden Delicious, Idared, Red McIntosh y Spartan.

## RESUMEN

En la actualidad el bitter pit es un problema sin resolver a pesar de los distintos puntos de vista bajo los que ha sido abordado, apareciendo en algunas plantaciones de forma intermitente.

En este trabajo se discuten algunos de los factores desencadenantes o coadyuvantes en el desarrollo de esta enfermedad, dependientes unos del suelo (alta disponibilidad de K y/o Mg, suelos secos y calientes), otros de la planta (transpiración inhibida, frutos de excesivo tamaño, desproporción entre masa foliar y fruto, crecimiento radicular restringido, patrones y variedades) y otros de las condiciones de manejo y medioambientales (excesivo abonado nitrogenado en especial las formas amoniacales, poda intensa, recolección prematura, frutos en zonas de umbría, altas temperaturas). Se describen algunas de las alteraciones metabólicas, funcionales y estructurales que ocasiona la deficiencia de calcio, haciendo especial hincapié en el manzano y presentando algunas orientaciones para su diagnóstico, prevención y tratamiento.

## REFERENCIAS

- Armstrong MJ, Kirkby EA** (1979) The influence of humidity on mineral composition of tomato plants with special reference to calcium distribution. **Plant and Soil** 52: 427-435.
- Bangerth F** (1974a) The function of calcium in the cell and in the subcellular units of apple fruit. **Acta Hort.** 45: 43-47.
- Bangerth F** (1974b) Antagonism between calcium and other elements in the apple fruit. **Acta Hort.** 45:49-52.
- Barber SA, Walker JM, Vasey EH** (1963) Mechanisms for the movement of plant nutrients from the soil and fertilizer to the plant root. **Agric. Food Chem.** 11: 204-207.
- Bergmann W ed** (1992) Nutritional Disorders of Plants. G. Fischer. Jena (Alemania) pp: 132-150.
- Blasco AB** (1976) Rootstock effects on growth and cropping of apples, with special reference to fruit quality. Tesis Doctoral Universidad de Londres. 224 pp.
- Blasco AB** (1977) "Bitter pit": una revisión de los factores que influyen sobre su incidencia. **ITEA** 27: 2-7.
- Bünemann G** (1974) Harvesting and storing in relation to bitter pit. **Acta Hort.** 45: 29-32.
- Burmeister DM, Dilley DR** (1993) Characterization of Mg<sup>2+</sup> - induced bitter pit - like symptoms on apples: A model to study bitter pit initiation and development. **J. Agric. Food Chem.** 41: 1203-1207.
- Carvalho AP, Sanui H, Pace N** (1963) Calcium and magnesium binding properties of cell membrane materials. **J. Cell and Comp. Physiol.** 62: 311-317.
- Chittenden ET, Stanton DJ, Watson J** (1969) Bitter pit in Cox's Orange Pipping apples. **N.Z.J. Agric. Res.** 12: 240-247.
- Chiu TE, Bould C** (1977) Sand-culture studies on the calcium nutrition of young apple trees with particular reference to bitter pit. **J. Hort. Sci.** 52: 19-28.
- Conway WS, Sams CE** (1983) Calcium infiltration of golden delicious apples and its effect on decay. **Phytopathology** 73: 1068-1071.
- De Silva DLR., Hetherington AM, Mansfield TA** (1985) Synergism between calcium ions and abscisic acid in preventing stomatal opening. **New Phytol.** 100: 473-482.
- Dekock PC, Boggie R, Inkson RHE** (1982) The effect of water stress and form of nitrogen on the incidence of blossom-end rot in tomatoes. **J. Sci. Food Agric.** 33:509-515.
- Delong WA** (1936) Variations in the chief ash constituents of apples affected with blotchy cork. **Plant Physiol.** 11: 453-456.
- Dieter P** (1984) Calmodulin and calmodulin-mediated process in plants. **Plant Cell Environ.** 7: 371-380.
- Duarte L** (1993) The rootstock effect on some nutrient levels in leaves of apple tree cv. Granny Smith. In: Optimization of Plant Nutrition (Fragoso MAC, Beusichem ML, Houwers A, eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (Holanda). pp 517-521.
- Ende van der J, Koornneef P, Sonneveld C** (1975). Osmotic pressure of the soil solution. Determination and effects on some glass-house crops. **Neth J. Agric. Sci.** 23: 181-190.
- Failla O, Poma Treccani C, Mignani I** (1990) Water status, growth and calcium nutrition of apple trees in relation to bitter pit. **Sci. Hort.** 42: 55-64.
- Ferguson IB, Watkins CB** (1989) Bitter pit in apple fruit. **Hort. Rev.** 11: 289-355.
- Ferguson IB** (1990) Calcium nutrition and cellular response. In: Calcium in Plant Growth and Development. (Leonard RT, Hepler PK, eds). ASPP. Symp. Series. Vol.4.
- Fochessati A** (1975) Bitter pit in apples. **Decidious Fruit Grower** 25: 47-54.

- Forsyth FR, Webster DH** (1971) Volatiles from McIntosh apple fruits as affected by phosphorus and potassium nutrition. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 96: 259-263.
- Fukumoto M, Nagai K** (1983) Possible roles of calcium and ammonium in the development of bitter pit in apple. *Physiol. Plant.* 59: 171-176.
- Gehring CA, Irving HR, Parish RW** (1990) Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9645-9649.
- Goor van BJ, Wieresma D** (1974) Redistribution of potassium, calcium, magnesium and manganese in the plant. *Physiol. Plant.* 31: 163-168.
- Granelli G, Camatini M** (1986) Boric fertilization trials on orchard in boron deficient soil. II Symposium International sur le rôle des oligoéléments en agriculture. Toulouse (France).
- Granelli G, Ughini V** (1988) Harvest and postharvest apple quality influenced by boron application. *Acta Hort.* 258: 43-47.
- Hecht-Buchholz** (1979) Calcium deficiency and plant structure. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 10: 67-81.
- Hilkenbäuner F, Naumann G** (1974) Summary of second discussion meeting on bitter pit in apples. *Acta Hort.* 45: 61-64.
- Hopfinger JA, Poovaiah BW, Patterson ME** (1984) Calcium and magnesium interactions in browning of "golden delicious" apples with bitter pit. *Sci. Hort.* 23: 345-351.
- Jakobsen ST** (1993a) Interaction between plant nutrients. III. Antagonism between Potassium, Magnesium and Calcium. *Acta Agric. Scand.* 43: 1-5.
- Jakobsen ST** (1993b) Interaction between plant nutrients. IV. Interaction between calcium and phosphate. *Acta Agric. Scand.* 43: 6-10.
- Konno H, Yamaya T, Yamasaki Y, Matsumoto H** (1984) Pectic polysaccharide break-down of cells walls in cucumber root grown with calcium starvation. *Plant Physiol.* 76: 633-637.
- Legge RL, Thompson E, Baker JE, Lieberman M** (1982). The effect of calcium on the fluidity and phase properties of microsomal membranes isolated from postclimacteric Golden Delicious apples. *Plant Cell Physiol.* 23: 161-169.
- Lewis TL, Martin D, Cerny D, Ratkowsky A** (1977) The effects of a sheltered environment on the mineral element composition of Merton Worcester apple fruits and leaves and on the incidence of bitter pit at harvest. *J. Hort. Sci.* 52: 401-407.
- Lidster PD, Porritt SW, Easton GW, Mason J** (1975) Spartan apple breakdown as affected by orchard factors, nutrient content and fruit quality. *Can. J. Plant. Sci.* 55: 443-446.
- Link H** (1973) Effect of fruit thinning on some components of fruit quality in apples. *Acta Hort.* 34: 445-448.
- Link H** (1974) Uptake and translocation of calcium. *Acta Hort.* 45: 53-64.
- Link H** (1976) Ca-uptake and- translocation by plants with special regard to apple trees. *Acta Hort.* 45: 53-60.
- Looney NE** (1979) Some effects of gibberellins A(4+7) plus benzyladenine on fruit weight, shape, quality, Ca content and storage behaviour of "Spartan" apple. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 104: 389-391.
- Lüdders P** (1979) The effect of nitrogen nutrition on bitter pit in apples. *Comm. Soil. Sci. Plant Analysis* 10: 401-415.
- Mansfield TA, Hetherington AM, Atkinson CJ** (1990) Some current aspects of stomatal physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 55-75.
- Marcelle RD** (1990) Comparison of the mineral composition of leaf and fruit in apple and pear cultivars. *Acta Hort.* 274: 315-320.
- Marcelle RD** (1993) Mineral Nutrition and fruit quality. *Acta Hort.* 383: 219-225.
- Marschner H** (1983) General Introduction to the mineral nutrition In: Inorganic Plant Nutrition (Läuchli A, Bielecki RL, eds.), Springer-Verlag, Berlin (Germany) pp 5-60.
- Miller GS, Swietlik D** (1986) Long-term response of bearing apple trees to paclobutrazol. *Hortscience* 21: 851 (abstract).
- Mix GP, Marschner H** (1976) Calciumgehalte in Früchten von Paprika, Bohnen, Quitteln und Hagebutte im Verlauf des Fruchtwachstums. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 139: 537-549.
- Murga J, Palazón I** (1984) Manual de inspección de peras y manzanas. S.O.I.V.R.E-I.N.I.A. Madrid.
- Pouwer A** (1974) Fruit analysis for prediction of bitter pit. *Acta Hort.* 45: 39-42.
- Preston AP, Perring MA** (1974) The effect of summer pruning and nitrogen on growth, cropping and storage quality of Cox's Orange Pippin apple. *J. Hort. Sci.* 49: 77-83.
- Quast P** (1983) Auswirkungen intensiver Calciumspritzungen auf die Qualität verschiedener Apfelsorten in den Jahren 1981 und 1982. *Mitt. Obstbauversuchs. Alten Landes* 38: 274-280.
- Reyes P, Luh BS** (1960) Characteristics of browning enzymes in Fay Elberta freestone peaches. *Food Technol.* 14: 570-575.
- Sadowski A, Czescik M** (1977) Studies on bitter pit of apples. V. Osmotic concentration and mineral content in different parts of fruit and incidence of pits. *Zesz. Nauk. SGGW "Ogrodnictwo"* 10: 73-92.

- Salmerón J** (1967) Anomalías de los frutos producidas en la fructificación. **Hojas divulgadoras** (Ministerio de Agricultura, Madrid) 24-67H: 12.
- Sánchez B, Dios G** (1976) Macronutrientes. En: Las tierras cultivadas del municipio de Pontevedra. Misión Biológica de Galicia (C.S.I.C. ) pp:184-190.
- Sansavini S, Bonomo R, Finotti A, Folchi A** (1986) Un triennio di esperienze col paclobutrazolo sul melo cv "Gloster". **Riv. Ortoflorofrutt. It.** 70: 109-123.
- Scaife MA, Clarkson DT** (1978) Calcium-related disorders in plants - a possible explanation for the effect of weather. **Plant Soil** 50: 723-725.
- Schumacher R, Fankhauser F, Stadler W** (1976) Versuche mit calcium chlorid, antitranspiranten und bor-saure zu verminderung der stippebildung. **Schweiz. Z. Obst-Weinbau.** 112: 3-7.
- Sharples RO** (1964) Cell characteristics of Cox's Orange Pippin apple from different commercial orchards. **Rep. E. Malling. Res. Stn for.:** 143-148.
- Sharples RO** (1968) Fruit-thinning effects on the development and storage quality of Cox's orange Pippin apple fruits. **J. Hort. Sci.** 43: 359-371.
- Sharples RO, Johnson DS** (1977) The influence of calcium on senescence changes in apple. **Ann. Appl. Biol.** 85: 450-453.
- Shear CB** (1971) Symptoms of calcium deficiency on leaves and fruit of York Imperial apple. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 96: 415-417.
- Shear CB, Faust M** (1971) Value of various tissue analyses in determining the calcium status of the apple tree and fruit. **Plant Anal. Fert. Probl. Rec. Adv. Plant Nutr.** 1: 75-98.
- Smock RM** (1941) Studies on bitter pit of the apple. Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Memoir. 234 pp.
- Stebbins RL, Dewey DH** (1972) Role of transpiration and problem transport in accumulation of  $^{45}\text{Ca}$  in leaves of young apple trees. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 97: 471-474.
- Vang-Petersen O, Poulsen E, Hansen P** (1973) The nutritional state of Danish fruit orchards as shown by leaf analysis. **I. Tidsskr. Planteavl.** 77: 37-47.
- Vang-Petersen O** (1974) Magnesium til aeble. **I. Tidsskr. Planteavl.** 78: 627-634.
- Vang-Petersen O** (1980) Calcium nutrition of apple trees: a review. **Sci. Hort.** 12: 1-9.
- Westwood MN, Chaplin MH, Roberts AN** (1973) Effects of rootstock on growth, bloom, yield, maturity and fruit quality of prune (*Prunus domestica* L.). **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 98: 352-357.
- Wiebe HJ, Schätzler HP, Kühn W** (1977) On the movement and distribution of calcium in white cabbage in dependence on water status. **Plant Soil** 48: 409-416.
- Wilkinson BG** (1970) The effect of evaporation on storage disorders of apples. **An. Rep. E. Malling Res. Sta.** 1969: 125-127.
- Wilkinson BG** (1972) Mineral composition of apples in relation to storage disorders. Proc. XVIIIth Inter. Hort. Congress: 1-7.
- Woodbridge CG, Wieneke J, Fuhr F** (1974) The interaction between calcium and boron in apple seedlings. **Z. Pflanzenernahr. Bodenkd.** 137: 7-188.