

ESTA ALTERACIÓN FISIOLÓGICA SE SUELE PRODUCIR TRAS LA RECOLECCIÓN Y PRODUCE PÉRDIDAS ECONÓMICAS

# Avances en el control del **bitter pit** en manzano

En este trabajo se realiza una sucinta recopilación de los últimos avances en la investigación aplicada al control del bitter pit en la Estación Experimental de Aula Dei (EEAD-

CSIC). Se describen nuevas formulaciones y estrategias de aplicación foliar con calcio, un método físico postcosecha y el método de tinción selectiva de calcio en fruto.

Jesús Val<sup>(1)</sup>, Álvaro Blanco<sup>(1)</sup>  
y Victoria Fernández<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Estación Experimental de Aula Dei (EEAD-CSIC). <sup>(2)</sup> Escuela de Ingeniería Técnica Forestal, Universidad Politécnica de Madrid.

**E**l pardeamiento de los tejidos vegetales es una manifestación de daños mecánicos, ciertas alteraciones fisiológicas, senescencia y reacciones de hipersensibilidad que inducen los microorganismos patógenos. En general se cree que el proceso de pardeamiento se produce a causa de la pérdida de compartimentación celular que provoca la oxidación de los compuestos fenólicos por parte de la polifenoloxidasas, dando como resultado una polimerización de pigmentos similares a la melana

(Vaughn and Duke, 1984). Las alteraciones fisiológicas de los frutos relacionadas con calcio inducen la degradación de la pulpa del fruto en zonas amarronadas corchosas, que en el caso de la manzana da lugar a distintas alteraciones fisiológicas entre las que destaca la denominada como bitter pit.

El bitter pit ha sido tradicionalmente relacionado con la deficiencia de calcio en fruto (Ferguson and Watkins, 1989). Los síntomas se manifiestan generalmente tras la recolección, durante la etapa de conservación en frío, lo que produce importantes pérdidas económicas ya que los frutos afectados deben ser desechados manualmente y la producción no puede destinarse directamente a su consumo en fresco. Numerosos trabajos han demostrado la importancia de una correcta nutrición

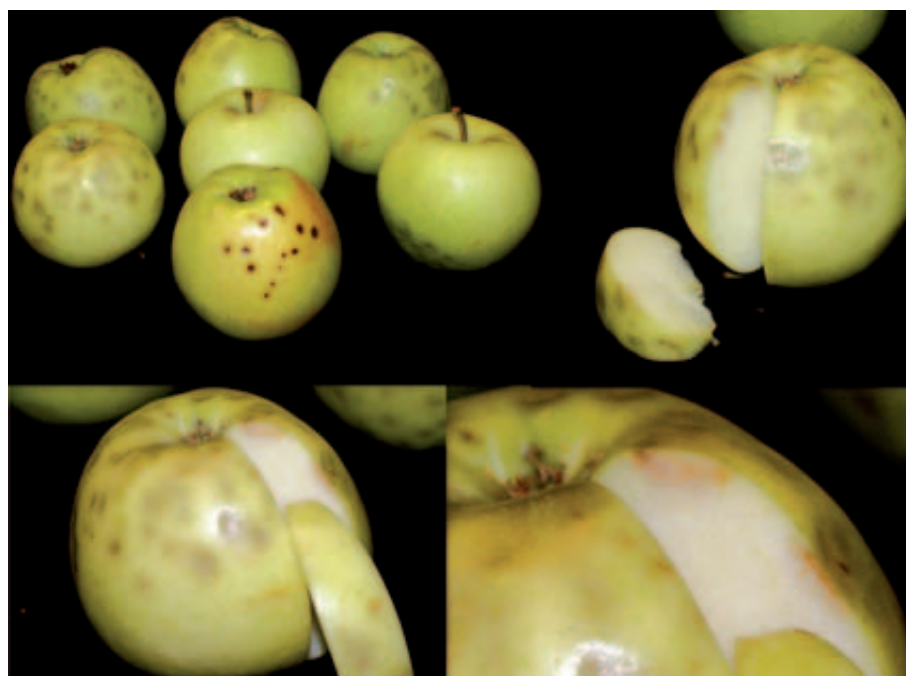
cálcica para obtener producciones hortícolas de calidad (Nielsen and Nielsen, 2003). Además, se han descrito numerosas alteraciones fisiológicas en distintas especies hortofrutícolas relacionadas con desequilibrios en la nutrición cálcica que se manifiestan en los órganos de almacenamiento (Shear, 1975).

Recientes estudios han demostrado que los tejidos acorchados de bitter pit, contienen concentraciones más altas de calcio, magnesio y potasio que los tejidos sanos. Así mismo, estos tejidos tienen mayor actividad polifenoloxidasas y menor concentración de carbohidratos (Val, 2003, Val *et al.*, 2010). Con respecto al perfil de proteínas de los tejidos del afectados por bitter pit, además de otras, se ha descrito la aparición de una nueva proteína en la región de 18 kDa, que también aparece en los tejidos oxidados de los frutos con lesiones mecánicas o atacados por patógenos (Val *et al.*, 2006).

Se han propuesto distintas hipótesis que relacionan la alteración en el homeostato de calcio con la inducción de manchas corchosas en el fruto (por ejemplo, alteraciones en la concentración de giberelinas y/o ácido abscísico) (Saure, 2005, Ferguson and Watkins, 1989). Sin embargo, tras más de cincuenta años de experimentación, todavía no ha sido posible establecer estrategias prácticas de tratamiento que permitan con certeza prevenir o controlar la aparición de calciopatías.

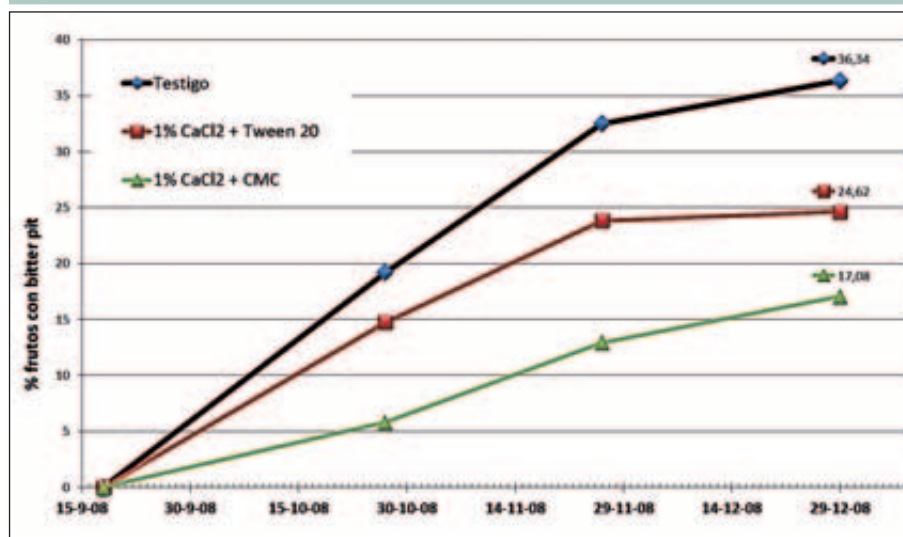
## Tratamientos foliares de calcio

Debido a la limitada capacidad de los frutos para captar el calcio por vía radicular, el bitter pit y otras alteraciones similares del fruto



**FIGURA 1.**

**Porcentaje de afección por bitter pit en distintas fechas postrecolección de los frutos tratados durante la estación de cultivo con distintas formulaciones de calcio (adaptado de Blanco *et al.*, 2010).**



**La adición de aditivos alimentarios a las soluciones de calcio, que conferían propiedades de adherencia y prolongaban el mantenimiento de la humedad en la superficie del fruto, fue la clave para obtener una mejor absorción del calcio en el fruto y una reducción de la tasa de bitter pit**

**CUADRO I.**

Parámetros de calidad de la fruta en la recolección y tras cuatro meses de almacenamiento en frío. Manzanas sometidas a un pretratamiento de diez días a bajo O<sub>2</sub> (LOT), o directamente almacenadas en frío normal (ST).

| Tratamientos  | Firmeza (N) | SST (%)    | AV (mg l <sup>-1</sup> ) | Valores de cromaticidad |             |            |
|---|-------------|------------|--------------------------|-------------------------|-------------|------------|
|   |             |            |                          | L                       | a*          | b*         |
| <b>Post-recolección</b>                             |             |            |                          |                         |             |            |
| Valores medios                                      | 68,5 ± 0,7  | 14,3 ± 0,1 | 5,5 ± 0,2                | 73,0 ± 0,3              | -11,6 ± 0,4 | 41,4 ± 0,2 |
| <b>Después de 4 meses de almacenamiento en frío</b> |             |            |                          |                         |             |            |
| LOT   | 53,0 ± 0,5  | 14,1 ± 0,1 | 5,0 ± 0,1                | 75,6 ± 0,2              | -3,8 ± 0,2  | 47,6 ± 0,1 |
| ST  | 43,1 ± 0,7  | 12,2 ± 0,1 | 3,7 ± 0,1                | 72,7 ± 0,4              | -7,8 ± 0,5  | 47,7 ± 0,4 |
| Significación                                       | ●●●         | ●●●        | ●●●                      | ●●●                     | ●●●         | NS         |

NS: no significativo; ●●●: significativo a p ≤ 0,005 / Los datos son medios ± SE. / SST, sólidos solubles totales; AV, acidez valorable.

se han intentado controlar en campo mediante la aplicación de aspersiones foliares de calcio. En manzano, la bibliografía que describe los principios activos de calcio más utilizados, programas y estrategias de aplicación de tratamientos, es muy abundante (Blanco *et al.*, 2010). Sin embargo, en términos de calidad

de fruto y reducción de la incidencia de bitter pit en los cultivos, los resultados publicados por los distintos autores no siempre son consistentes. En nuestro caso, tras un estudio de tres años en las variedades Smoothie Golden Delicious y Fuji, en el que se ensayaron distintas estrategias de aplicación a lo largo de la

estación del cultivo y en el que la concentración aplicada de calcio fue tan alta que llegó a producir efectos fitotóxicos, concluimos que a pesar de haber obtenido un aumento significativo solo en la piel de los frutos tratados, la efectividad de estos tratamientos para prevenir el bitter pit era todavía muy escasa (Val *et al.*, 2008). En este mismo trabajo se concluyó que la adición de aditivos a la solución de aspersión podría ser la clave para aumentar la eficacia de los tratamientos de calcio evitando los efectos fitotóxicos. En este sentido se prosiguió la investigación en manzano y también en melocotonero tardío de Calanda. La adición de aditivos alimentarios a las soluciones de calcio (**figura 1**), que conferían propiedades de adherencia y prolongaban el mantenimiento de la humedad en la superficie del fruto, fue la clave para obtener una mejor absorción del calcio en el fruto y una reducción de la tasa de bitter pit (Blanco *et al.* 2010).

## Tratamientos físicos postcosecha

A pesar de la implicación del calcio en la aparición de fisiopatías, en el caso de la manzana, se han desarrollado estrategias alternativas que no están fundamentadas en la aplicación de calcio al fruto por vía foliar. La investigadora israelí Edna Pesis (Pesis *et al.*, 2007), trabajando con la variedad Granny Smith, descubrió que aplicando en postcosecha un pretratamiento de bajo oxígeno y temperatura de 20°C, conseguía una considerable reducción de escaldado. El grupo de investigación Nutrición de Cultivos Frutales de la EEAD-CSIC aplicó esta metodología a manzanas Golden Reinders con el fin de verificar su efecto sobre la incidencia de bitter pit (**cuadro I y figura 2**). En efecto, se comprobó que manteniendo las manzanas en una atmósfera de bajo oxígeno a temperatura de 20°C durante diez días, se consiguieron reducciones significativas en el porcentaje de frutos afectados por bitter pit (Val *et al.*, 2010). Además, éste no fue el único efecto observado; tras cuatro meses de conservación en frío convencional, los frutos tratados con bajo oxígeno mostraron valores de firmeza más altos que los testigos a la vez que su coloración fue más brillante y amarilla y más alto su contenido en sólidos solubles (**foto 1**). De estos datos puede dedu-



Foto 1. Apariencia externa de manzanas tras cuatro meses de almacenamiento en frío. Los frutos fueron previamente tratados en bajo  $O_2$ ,  $20\text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 días (derecha) o directamente almacenados en frío convencional (izquierda).

cirse que el pretratamiento a  $20\text{ }^\circ\text{C}$  y bajo oxígeno confirió a los frutos tratados unas características organolépticas y de calidad excepcionales.

## Tinción selectiva de calcio en frutos carnosos

Otra de las aportaciones del Grupo de Investigación al estudio de la distribución

del calcio en el fruto, de especial importancia para el diagnóstico e investigación de las calciopatías, ha consistido en el desarrollo de un método patentado en 2003 (Val, 2003) y publicado en 2008 (Val *et al.*, 2008), que permite evaluar de forma visual tanto el calcio soluble como el insoluble en secciones de fruto (**foto 2**). Además, esta técnica puede aplicarse fácilmente con fines histológicos.

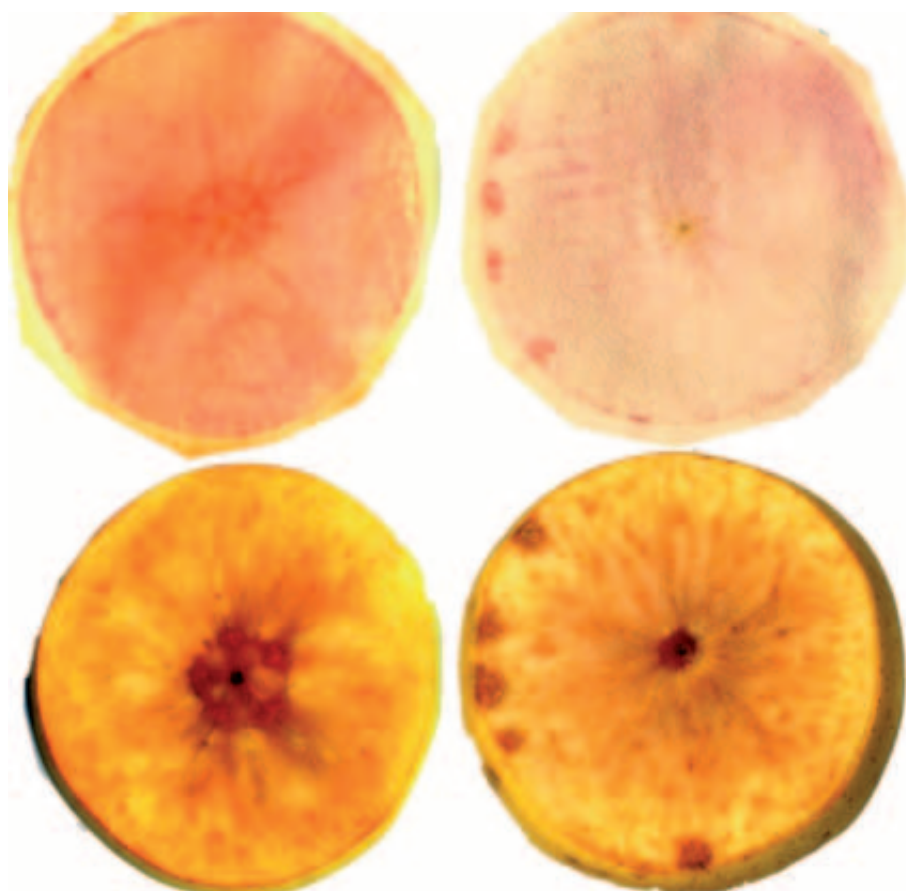
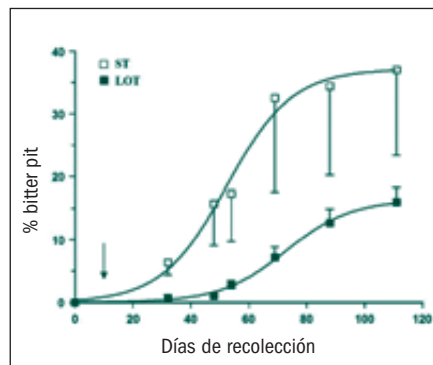


Foto 2. Ejemplo de tinción específica de calcio en secciones de fruto sano (izquierda) y afectado por bitter pit (derecha). En la parte superior se aprecia la huella de calcio soluble transferida a un soporte de papel.

FIGURA 2.

Incidenca de bitter pit durante el período de almacenamiento en frío de manzanas Golden Reinders. Los frutos fueron previamente tratados en bajo  $O_2$  y  $20\text{ }^\circ\text{C}$  (LOT) durante 10 días (final del tratamiento indicado por la flecha) o directamente almacenados en frío normal (ST).



## Consideraciones finales

En los últimos años, el trabajo del grupo de investigación Nutrición de Cultivos Frutales de la EEAD-CSIC, han profundizado en la hipótesis de que el incremento de la nutrición cálcica en el fruto puede permitir mejorar la calidad del mismo y aliviar la incidencia de calciopatías. Por este motivo se han diseñado nuevos tratamientos tendentes a optimizar la eficiencia de las formulaciones de fertilizantes foliares que permiten mejorar la captación de calcio por el fruto a la vez que se deberían evitar los efectos fitotóxicos que se han observado en distintas especies al aplicar concentraciones altas de  $Ca$  ( $>250\text{ mM}$ ) (Val *et al.*, 2008, Val y Fernández, 2011). Esto es especialmente importante en el contexto de nuestras condiciones agroclimáticas de veranos secos y cálidos que no favorecen la persistencia de las soluciones de calcio aplicadas por vía foliar en contacto con la piel del fruto. Debe tenerse presente que el calcio solo puede penetrar en el fruto si se encuentra en forma iónica en una solución acuosa. Las formulaciones foliares deben contener agentes que permitan la adhesión a la superficie del fruto y, a la vez, que mantengan el calcio en solución el mayor tiempo posible. Ésta es la razón por la que se han diseñado nuevas formulaciones con agentes tensoactivos que disminuyen la tensión superficial y permiten la distribución de la solución

## Bibliografía ▼

- ▶ Blanco, A., Fernández, V., y Val, J. (2010). Improving the performance of calcium-containing spray formulations to limit the incidence of bitter pit in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*, 127(1), 23-28.
- ▶ Ferguson, I. B. and C. B. Watkins (1989). Bitter Pit in Apple Fruit. *Horticultural Reviews*, John Wiley & Sons, Inc.: 289-355.
- ▶ Fernández, V., Khayet, M., Montero-Prado, P., Heredia-Guerrero, J. A., Liakopoulos, G., Karabourniotis, G. y Heredia, A. (2011). New Insights into the Properties of Pubescent Surfaces: Peach Fruit as a Model. *Plant Physiology*, 156(4), 2098-2108.
- ▶ Neilsen, G.H. y Neilsen, D. (2003). Nutritional requirements of apple. In: Ferree D.C. and Warrington I.J. (eds), *Apples: Botany, Production and Uses*. Wallington: CABI Publishing, pp. 267-302.
- ▶ Pesis, E., Ebeler, S. y Mitcham, E. (2007) Post-harvest low oxygen pretreatment prevented superficial scald and bitter pit symptoms in 'Granny Smith' apples. *HortScience* 42:882-883.
- ▶ Pesis, E., Ben-Arie, R., Feygenberg, O., Lichter, A., Gadiyeva, O., Antilofyev, I., y Uryupina, T. (2007). A simple pretreatment with low O<sub>2</sub> to alleviate superficial scald in Granny Smith apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(10), 1836-1844
- ▶ Saure, M. C. (2005). Calcium translocation to fleshy fruit: its mechanism and endogenous control. *Scientia Horticulturae* 105 (1): 65-89.
- ▶ Val, J. (2003) Avances recientes en la investigación del bitter pit. *Vida Rural* 165:42-44.
- ▶ Val, J. (2003) "Procedimiento visual de la distribución de calcio en secciones de fruto". Patente Española. N° 009902672
- ▶ Val, J., y Fernández, V. (2011). In-season calcium-spray formulations improve calcium balance and fruit quality traits of peach. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(3), 465-472.
- ▶ Val, J., Gracia, M. A., Monge, E., y Blanco, A. (2008). Visual Detection of Calcium by GBHA Staining in Bitter Pit-affected Apples. *Food Science and Technology International*, 14(4), 315-319.
- ▶ Val, J., Gracia, M.A., Blanco, A., Monge, E. y Pérez, M. (2006). Polypeptide Pattern of Apple Tissues Affected by Calcium-related Physiopathologies. *Food Science and Technology International* 12(5): 417-421.
- ▶ Val, J., Monge, E., Risco, D., y Blanco, A. (2008). Effect of Pre-Harvest Calcium Sprays on Calcium Concentrations in the Skin and Flesh of Apples. *Journal of Plant Nutrition*, 31(11), 1889-1905.
- ▶ Val, J., Fernández, V., López, P., Peiró, J.M., y Blanco, A. (2010). Low oxygen treatment prior to cold storage decreases the incidence of bitter pit in 'Golden Reinders' apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(3): 536-540.
- ▶ Vaughn, K. C. y S. O. Duke (1984). "Function of polyphenol oxidase in higher plants." *Physiologia Plantarum* 60(1): 106-112.

en la superficie del fruto. Sin embargo, este requisito no es suficiente para garantizar la efectividad de la formulación, ya que si la formulación no contuviese un agente adhesivo, la solución de calcio se lixiviaría por gravedad, lo que es especialmente importante en la superficie de los frutos: ricos en ceras, lípidos y otros compuestos hidrofóbicos (Fernandez *et al.*, 2011). Además, también se han introducido agentes gelificantes con alto potencial higroscópico con el propósito de evitar la desecación de la solución de aspersión, que se produce en la superficie del fruto, de forma prácticamente inmediata en los microclimas secos y con alta temperatura ambiental.

Por otra parte, se ha abierto una nueva línea de investigación que permite, de forma efectiva, controlar la incidencia de bitter pit en manzana y mejorar la calidad postcosecha del fruto, utilizando, durante un corto periodo de tiempo, tratamientos físicos como una atmósfera modificada de muy bajo oxígeno y temperaturas de 20°C tras la recolección.

Finalmente, se ha desarrollado el uso del método de tinción específica de calcio, protegido por patente, que puede aplicarse al estudio macroscópico de tejidos de fruto u otros órganos vegetales y también es de gran utilidad en histología. Esta técnica es una herramienta muy útil para la investigación de las alteraciones de calcio en material vegetal. ●

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación: AGL2009-08501/AGR (Programa Nacional de Proyectos de Investigación Fundamental), e INIA (PET2007-09-C5), cofinanciado con fondos FEDER).