

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**ALINE DOS SANTOS**

**ESTUDO DE MÉTODOS DE AMOSTRAGEM E DA DISTRIBUIÇÃO  
MINERAL EM MAÇÃS COMO FERRAMENTA PARA SEGREGAR FRUTOS  
COM PREDISPOSIÇÃO AO “BITTER PIT”**

**LAGES, SC**

**2015**

**ALINE DOS SANTOS**

**ESTUDO DE MÉTODOS DE AMOSTRAGEM E DA DISTRIBUIÇÃO  
MINERAL EM MAÇÃS COMO FERRAMENTA PARA SEGREGAR FRUTOS  
COM PREDISPOSIÇÃO AO “BITTER PIT”**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador:

PhD. Cassandro Vidal  
Talamini do Amarante

Co-orientador:

Dr. Cristiano André Steffens

**LAGES, SC**

**2015**

**ALINE DOS SANTOS**

**ESTUDO DE MÉTODOS DE AMOSTRAGEM E DA DISTRIBUIÇÃO  
MINERAL EM MAÇÃS COMO FERRAMENTA PARA SEGREGAR FRUTOS  
COM PREDISPOSIÇÃO AO “BITTER PIT”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca examinadora:

Orientador:

---

Prof. PhD. Cassandro Vidal Talamini do Amarante  
CAV/UDESC

Co-orientador:

---

Dr. Cristiano André Steffens  
CAV/UDESC

Membros:

---

PhD. Sergio Tonetto de Freitas  
Embrapa Semiárido

---

Dra. Aquidauana Miqueloto  
CAV/UDESC

**Lages, 27 de fevereiro de 2015**

## AGRADECIMENTOS

Dedico esta dissertação aos meus pais Rogério e Rose, por todo o amor e carinho que sempre tiveram, por serem os melhores pais que eu poderia ter, por nunca desistirem de mim e nem me deixarem desistir dos meus sonhos. Vocês são meus exemplos e inspiração, obrigada por tudo! Ao meu irmão Róger e à minha avó, dona Olívia, que também sempre estiveram presentes, me apoiando sempre que preciso.

Aos meus amigos Josi, Matheus, Mariana, Daniel, Viko, Milton, Angélica, Crizane, Fran, Mariuccia e tantos outros, que foram amigos nos bons e maus momentos, mostrando-me o verdadeiro sentido da palavra amizade. Obrigada por todo o apoio psicológico, pela compreensão e por tudo o que passamos juntos.

Ao professor Cassandro, pela excelente orientação, pela paciência, por todos os ensinamentos e por tanta confiança depositada em mim. Ao professor Cristiano, por tudo o que me ensinou e por sua disponibilidade, me ajudando sempre que preciso.

A todos os colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Tecnologia Pós-Colheita, pela ajuda em todos os experimentos, pelo apoio sempre que preciso e pela amizade que criamos durante todo este tempo trabalhando juntos. Em especial à Aquidauana, por todos os ensinamentos, toda a ajuda em momentos de desespero e por (mesmo longe) sempre estar presente. A realização deste trabalho não seria possível sem a ajuda de vocês. À professora Cris, por todo o apoio, todas as cartas de recomendação (foram muitas) e por sempre ter uma palavra de conforto em momentos de desespero.

À UDESC, pelo ensino de qualidade, e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos. Às empresas Fischer e Yakult e ao produtor Sérgio Justi, pela parceria e concessão dos frutos.

A todos vocês, minha eterna gratidão.

## RESUMO

SANTOS, Aline dos. **ESTUDO DE MÉTODOS DE AMOSTRAGEM E DA DISTRIBUIÇÃO MINERAL EM MAÇÃS COMO FERRAMENTA PARA SEGREGAR FRUTOS COM PREDISPOSIÇÃO AO “BITTER PIT”**. 2015. 66 p. Mestrado (Dissertação em Produção Vegetal – Área: Biologia e Tecnologia Pós-Colheita) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2015.

Este trabalho teve por objetivos: 1) determinar as diferenças entre maçãs ‘Fuji’ (com baixa suscetibilidade ao “bitter pit”) e ‘Catarina’ (com alta suscetibilidade ao “bitter pit”) para a taxa de crescimento do fruto, concentrações, conteúdos e relações minerais; 2) determinar o gradiente mineral de Ca, Mg e K existente nas diferentes regiões em maçãs ‘Gala’; 3) determinar qual o método de amostragem de tecidos do fruto (casca e polpa) na região distal, para quantificação das concentrações nas frações total e solúvel de Ca e Mg, mais indicado para segregar maçãs ‘Gala’ quanto à ocorrência de “bitter pit”; e 4) identificar atributos minerais e físico-químicos relacionados à ocorrência de “bitter pit” em maçãs ‘Gala’. No primeiro capítulo, utilizou-se maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’, provenientes de um pomar comercial do município de São Joaquim, SC. Os frutos foram colhidos semanalmente dos 40 aos 131 dias após a plena floração (DAPF), e posteriormente em intervalos de 15 dias até os 188 DAPF. Estes frutos foram avaliados quanto a massa fresca (g), concentrações ( $\text{mg kg}^{-1}$  massa fresca) e conteúdos ( $\text{mg fruto}^{-1}$ ) de Ca, Mg, K e N. As concentrações de Ca, Mg, K e N foram avaliadas nas regiões proximal, mediana e distal dos frutos. No segundo capítulo, foram realizados dois experimentos. No experimento I, utilizou-se maçãs ‘Gala’, provenientes do município de Fraiburgo, SC. Os frutos foram cortados longitudinalmente, separados em 12 regiões (nove para a polpa e três para casca) e analisados quanto às concentrações de Ca, Mg e K nas frações total e solúvel. No experimento II, maçãs ‘Gala’, provenientes do município de Guarapuava, PR, foram separados em lotes sem e com a incidência de “bitter pit” e avaliados para parâmetros físico-químicos (pH, sólidos solúveis, acidez titulável e firmeza de polpa) e minerais (Ca e Mg, nas frações total e solúvel da região distal do fruto). No primeiro capítulo, maçãs ‘Catarina’ tiveram crescimento superior à ‘Fuji’. Na média dos valores avaliados ao longo do crescimento dos frutos, a concentração de Ca foi superior na ‘Fuji’ nas três regiões, proximal, mediana e distal. As maiores relações N/Ca,

$(K+Mg)/Ca$  e  $(K+Mg+N)/Ca$  foram encontradas para a cultivar ‘Catarina’ na região distal. A análise canônica discriminante (ACD) mostrou que a concentração de Ca, independente da região do fruto, é o atributo que melhor promove segregação entre as duas cultivares. No segundo capítulo, experimento I, observou-se que as concentrações de Ca, Mg e K na fração total são superiores no tecido da casca, e na fração solúvel são maiores na polpa. As concentrações totais de Ca, Mg e K são inferiores na região do córtex. Além disto, esta região apresenta um gradiente longitudinal, onde as maiores concentrações totais de Ca, Mg e K encontram-se na região proximal dos frutos. As relações  $Mg/Ca$ ,  $K/Ca$  e  $(K+Mg)/Ca$  foram superiores, em todos os tecidos avaliados, na região distal. No experimento II, frutos com “bitter pit” apresentaram maior acidez titulável, menor pH e menor firmeza de polpa, assim como alta relação  $Mg/Ca$  nas frações total e solúvel da polpa. A ACD indicou que a relação  $Mg/Ca$  solúvel na polpa e o Mg total na polpa para os atributos minerais, e a acidez titulável para os atributos físico-químicos, promovem melhor segregação entre frutos sem e com “bitter pit”.

**Palavras-chave:** *Malus domestica* Borkh, pós-colheita, distúrbio fisiológico, análise mineral, cálcio.

## ABSTRACT

SANTOS, Aline dos. **ASSESSMENT OF SAMPLING METHODS AND MINERAL DISTRIBUTION IN APPLES AS A TOOL TO SEGREGATE FRUIT FOR “BITTER PIT” PREDISPOSITION.** 2015. 66 p. Master (Dissertation in Vegetable Production - Area: Biology and Post-Harvest) - University of Santa Catarina State. Graduate Program in Vegetable Production, Lages, 2015.

This study aimed: 1) to determine the differences of growth rate, concentration, content and mineral relations in the fruit between 'Fuji' (with low susceptibility to bitter pit) and 'Catarina' (with high susceptibility to bitter pit) apples; 2) to assess the mineral gradient of Ca, Mg and K in different regions of 'Gala' apples; 3) to identify the best tissue sampling method (peel and pulp) in the distal region of the fruit to quantify the concentrations of Ca and Mg in total and soluble fractions, to segregate 'Gala' apples for the occurrence of bitter pit; and 4) to identify minerals and physic-chemical attributes related to the occurrence of bitter pit in 'Gala' apples. In the first chapter, 'Fuji' and 'Catarina' apples were harvested in a commercial orchard in São Joaquim, SC. The fruits were harvested weekly from 40 to 131 days after full bloom (DAFB), and subsequently every 15 days up to 188 DAFB. Fruit were evaluated for fresh mass (g) and concentrations ( $\text{mg kg}^{-1}$  fw) and contents ( $\text{mg fruit}^{-1}$ ) of Ca, Mg, K and N. Concentrations of Ca, Mg, K and N were evaluated in the proximal, medial and distal regions of the fruit. In the second chapter, two experiments were carried out. In the first experiment, 'Gala' apples were harvested in Fraiburgo, SC. Fruit were cut longitudinally, divided into 12 regions (nine for the pulp and three to peel), and then analyzed for concentrations of Ca, Mg and K in total and soluble fractions. In the second experiment, 'Gala' apples were harvested in Guarapuava, PR. Fruit were divided into lots without and with incidence of bitter pit and evaluated for physico-chemical attributes (pH, soluble solids content, titratable acidity and firmness) and Ca and Mg concentrations (in the total and soluble fractions of the distal region of the fruit). In Chapter I, the results show that 'Catarina' apple fruit has a higher growth rate than 'Fuji'. Along the fruit growth, the average concentration of Ca was higher in 'Fuji' than in 'Catarina' the three regions: proximal, medial and distal. The highest N/Ca, (K+Mg)/Ca and (Mg+K+N)/Ca ratios occurred in 'Catarina' at the distal region. The canonical discriminant analysis (CDA) showed that Ca concentration,

regardless of the fruit region, is the best attribute to segregate between the two cultivars. In Chapter II, experiment I, the results showed that the concentrations of Ca, Mg and K in the total fraction were higher in the skin than in the flesh, while the concentrations of these mineral in the soluble fraction were higher in the flesh than in the skin. The total concentrations of Ca, Mg and K are lower in the cortex than in the skin. In addition, the cortex has a longitudinal gradient, with the highest total concentrations of Ca, Mg and K in the proximal region of the fruit. The Mg/Ca, K/Ca and (K+Mg)/Ca ratios were higher in all tissues evaluated at the distal region of the fruit. In the second experiment, fruits with bitter pit had higher titratable acidity, lower pH and lower firmness, as well as high Mg/Ca ratio in the total and soluble fractions of the flesh. The ACD showed that the Mg/Ca ratio in soluble fraction of the flesh and the Mg in total fraction of the flesh for mineral attributes, and titratable acidity for the physico-chemical attributes, promoted a better segregation between fruit without and with bitter pit.

**Key-words:** *Malus domestica* Borkh, postharvest, physiological disorder, mineral analysis, calcium.



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Concentrações de Ca, Mg, K e N (em mg kg<sup>-1</sup> massa fresca), e as relações Mg/Ca, K/Ca e N/Ca, quantificados nas regiões proximal, mediana e distal dos frutos (valores médios obtidos durante o período de 40 a 188 dias após a plena floração), em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’ .....26
- Tabela 2 - Valores de coeficiente canônico padronizado (CCP), correlação canônica (*r*) e coeficiente da taxa de discriminação paralela (TDP) para a função canônica discriminante 1 (FCD<sub>1</sub>), referente aos atributos minerais descritos na Tabela 1 (concentrações de Ca, Mg, K e N, em mg.kg<sup>-1</sup> massa fresca, e as relações Mg/Ca, K/Ca e N/Ca), quantificados nas regiões proximal, mediana e distal dos frutos (valores médios obtidos durante o período de 40 a 188 dias após a plena floração), para discriminar entre ‘Fuji’ e ‘Catarina’ .....34
- Tabela 3 – Valores de acidez titulável (AT), teores de sólidos solúveis (SS), pH e firmeza de polpa em maçãs ‘Gala’ sem e com “bitter pit”, armazenadas por cinco meses à 0 ± 1 °C e UR 90-95% .....54
- Tabela 4 – Concentrações de Ca e Mg (mg kg<sup>-1</sup> de massa fresca) e valores da relação Mg/Ca, nas frações total e solúvel da casca e da polpa em maçãs ‘Gala’, em frutos sem e com “bitter pit”, armazenadas por 5 meses em AR (0 ± 1 °C e UR 90-95%).....55
- Tabela 5 - Coeficiente canônico padronizado (CCP), correlação canônica (*r*) e coeficiente da taxa de discriminação paralela (TDP) para a função canônica discriminante 1 (FCD<sub>1</sub>), referente aos atributos físico-químicos [sólidos solúveis (SS), pH, acidez titulável (AT) e firmeza de polpa], em maçãs ‘Gala’ armazenadas por cinco meses à 0 ± 1 °C e UR 90-95% .....56

Tabela 6 - Coeficiente canônico padronizado (CCP), correlação canônica ( <i>r</i> ) e coeficiente da taxa de discriminação paralela (TDP) para a função canônica discriminante 1 (FCD1) para os atributos minerais de Ca e Mg e a relação Mg/Ca, nas frações total e solúvel da polpa, e fração total da casca, na região distal de maçãs ‘Gala’, armazenadas por 150 dias à $0 \pm 1$ °C e UR 90-95%.....	57
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Massa fresca (g) de maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’, durante o período de crescimento (dos 40 aos 188 DAPF) .....	25
Figura 2 - Concentrações médias ( $\text{mg kg}^{-1}$ de massa fresca) de Ca, Mg, K e N em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’, durante o período de crescimento (dos 40 aos 188 DAPF). Linha pontilhada indica o nível crítico de Ca ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ), abaixo do qual aumenta o risco de ocorrência de “bitter pit”.....	28
Figura 3 – Concentrações ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de Ca, Mg, K e N nas regiões proximal, mediana e distal em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’, durante o período de crescimento (dos 40 aos 188 dias após a plena floração) .....	29
Figura 4 – Conteúdos ( $\text{g fruto}^{-1}$ ) de Ca, Mg, K e N em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’, durante o período de crescimento (dos 40 aos 188 DAPF) .....	31
Figura 5 – Valores das relações $\text{N/Ca}$ , $(\text{K}+\text{Mg})/\text{Ca}$ e $(\text{K}+\text{Mg}+\text{N})/\text{Ca}$ nas regiões proximal, mediana e distal em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’, durante o período de desenvolvimento dos frutos (dos 40 aos 188 dias após a plena floração).....	33
Figura 6 - Coeficientes canônicos padronizados (CCP) das funções canônicas discriminantes 1 e 2 ( $\text{FCD}_1$ e $\text{FCD}_2$ ), em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’, nas regiões proximal, mediana e distal, considerando os atributos minerais descritos na Tabela 2.....	35
Figura 7 – Secção longitudinal de maçãs ‘Gala’ (A) e separação das amostras (sem a região carpelar do fruto) para análise das concentrações minerais nas diferentes regiões do fruto (B) .....	41

- Figura 8 – Secção longitudinal do fruto, com separação das regiões (proximal, mediana e distal) para análise das concentrações minerais. O corte 1 corresponde a casca, e os cortes 2, 3 e 4 diferentes porções da polpa.....42
- Figura 9 – Frutos de maçã ‘Gala’, após 5 meses de armazenamento em AR, sem (A) e com (B) a presença de “bitter pit” .....44
- Figura 10 – Concentrações totais de Ca, Mg e K ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), e as relações  $(\text{K}+\text{Mg})/\text{Ca}$ ,  $\text{Mg}/\text{Ca}$  e  $\text{K}/\text{Ca}$ , nas regiões proximal, mediana e distal no tecido de casca, em maçãs ‘Gala’ .....47
- Figura 11 – Concentrações totais de Ca, Mg e K ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), e as relações  $(\text{K}+\text{Mg})/\text{Ca}$ ,  $\text{Mg}/\text{Ca}$  e  $\text{K}/\text{Ca}$ , nas regiões proximal, mediana e distal, cortes 2, 3 e 4 do tecido de polpa de maçãs ‘Gala’ .....48
- Figura 12 – Concentrações solúveis de Ca, Mg e K ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), e as relações  $(\text{K}+\text{Mg})/\text{Ca}$ ,  $\text{Mg}/\text{Ca}$  e  $\text{K}/\text{Ca}$ , nas regiões proximal, mediana e distal no tecido de casca, em maçãs ‘Gala’ .....51
- Figura 13 – Concentrações solúveis de Ca, Mg, K ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), e as relações  $(\text{K}+\text{Mg})/\text{Ca}$ ,  $\text{Mg}/\text{Ca}$  e  $\text{K}/\text{Ca}$  nas regiões proximal (2, 3 e 4), mediana (2, 3 e 4) e distal (2, 3 e 4) no tecido de polpa em maçãs ‘Gala’ .....52

## LISTA DE ABREVIACÕES

°Brix	Grau Brix
°C	Grau Celsius
AR	Atmosfera refrigerada
AT	Acidez titulável
Ca	Cálcio
CV	Coeficiente de variação
DAPF	Dias após a plena floração
g	Grama
h	Hora
$h^\circ$	Ângulo <i>hue</i>
K	Potássio
kg	Quilograma
Mg	Magnésio
N	Normalidade
N	Newton
N <sub>2</sub>	Gás nitrogênio
mm	Milímetro
s	Segundo
μL	Microlitro
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potencial de hidrogênio
p	Probabilidade
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
SS	Sólidos solúveis
UR	Umidade relativa
S	Sul
W	Oeste
mg	Miligrama
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
SC	Santa Catarina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
min	Minuto
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	Etileno

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1 DISTRIBUIÇÃO DE Ca, Mg, K E N EM MAÇÃS ‘FUJI’ E ‘CATARINA’ DURANTE O CRESCIMENTO DOS FRUTOS E SUA RELAÇÃO COM A PREDISPOSIÇÃO DIFERENCIADA DAS CULTIVARES AO “BITTER PIT”.....</b>	<b>20</b>
1.1 RESUMO.....	20
1.2 ABSTRACT.....	21
1.3 INTRODUÇÃO.....	21
1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
1.6 CONCLUSÕES.....	33
<b>2 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE Ca E Mg EM FRUTOS SEM E COM “BITTER PIT”, E DETERMINAÇÃO DOS GRADIENTES MINERAIS DE Ca, Mg E K, NAS FRAÇÕES TOTAL E SOLÚVEL, EM MAÇÃS ‘GALA’.....</b>	<b>37</b>
2.1 RESUMO.....	37
2.2 ABSTRACT.....	38
2.3 INTRODUÇÃO.....	38
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
2.5.1. Experimento I.....	45
2.5.2. Experimento II.....	52
2.6 CONCLUSÕES.....	57
<b>3 CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>58</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>59</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>

## INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus domestica*, Borkh) é o fruto de clima temperado mais produzido no Brasil, concentrando sua produção nos três Estados da região Sul. Segundo Petri et al. (2011), o Estado de Santa Catarina é o maior produtor brasileiro do fruto, seguido por Rio Grande do Sul e Paraná, com destaque para os municípios de Vacaria-RS, São Joaquim-SC e Fraiburgo-SC. Atualmente, a cultura da macieira está expandindo-se para outras regiões, inclusive para regiões não tradicionais ao cultivo de frutas de clima temperado como a região semiárida do Vale do São Francisco (PETRI et al., 2011).

A produção anual do fruto, estimada pelo último senso divulgado pelo IBGE (2011), é de aproximadamente 1.300.000 mil toneladas, onde cerca de 99% da produção é destinada ao armazenamento, possibilitando a oferta de maçã com boa qualidade durante todo o ano (ABPM, 2004).

Segundo Petri et al. (2011), o número de cultivares de maçã existentes mundialmente é muito grande, devido ao melhoramento genético e desenvolvimento de novos clones. Porém, aproximadamente 90% da produção brasileira concentra-se entre as cultivares Gala e Fuji e seus clones, devido à alta aceitação destas pelo consumidor e a facilidade de exportação.

Entretanto, o índice de perdas na vida pós-colheita dos frutos é alto, devido, principalmente, ao manejo inadequado dos frutos, causando danos mecânicos, armazenamento inadequado e incidência de doenças pós-colheita e de distúrbios fisiológicos, como “bitter pit” (BP).

Em anos de alta incidência, o BP pode causar perdas de até 30% da produção (BASSO, 2002), e é caracterizado por manchas escuras na polpa, logo abaixo da casca, que desidratam e formam depressões marrons na epiderme do fruto (AMARANTE et al., 2006a; 2011).

Segundo Saure (2005), o aparecimento do BP está relacionado a fatores de manejo do pomar, como, por exemplo, uso de porta-enxertos vigorosos, plantas com excesso de vigor, raleio severo na planta (deixando uma baixa carga de frutos), adubação nitrogenada em excesso, deficiência hídrica e safras em que o verão é extremamente quente. Além disso, diversos autores concordam que baixas concentrações de Ca, associados a elevadas concentrações de Mg, K e N nos frutos, constituem o principal fator que predispõe a ocorrência de BP em maçãs (FERGUSON; WATKINS, 1989; ARGENTA; SUZUKI,

1994; NACHTIGALL; FREIRE, 1998; PAVICIC et al., 2004; AMARANTE et al., 2006a; 2006b).

O Ca é transportado para o fruto através do xilema, na presença de água, durante a fase de divisão celular (TAIZ; ZEIGER, 2006), o que ocorre até aproximadamente 40 dias após a plena floração (AMARANTE, et al, 2006b). Devido ao crescimento das células do parênquima, os vasos condutores do xilema são comprimidos (LANG & RYAN, 1994), perdendo sua funcionalidade, o que favorece a redução do aporte de Ca nos frutos (DRAŽETA et al., 2001, 2004). O movimento de Ca para o fruto também pode diminuir em função da redução do gradiente hidrostático necessário para estimular o fluxo de seiva no xilema do fruto (BONDADA et al., 2005). Entretanto, Mg, K e N continuam sendo translocados para o fruto, por serem transportados via floema, que permanece ativo, ao contrário do Ca, que é transportado em quantidades insignificantes via floema (VANG-PETERSEN, 1980; FERGUSON; WATKINS, 1989; ARGENTA; SUZUKI, 1994; NACHTIGALL; FREIRE, 1998; AMARANTE et al., 2006a, 2006b, 2012).

Maçãs que apresentem concentrações de Ca abaixo de 40 mg kg<sup>-1</sup> possuem maior risco de ocorrência de distúrbios fisiológicos na região Sul do Brasil (ARGENTA; SUZUKI, 1994; AMARANTE et al., 2012). Além disso, frutos com concentrações de Mg e K acima de 40 mg kg<sup>-1</sup> e 950 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, também apresentam maior risco de ocorrência de distúrbios fisiológicos associados a deficiência de Ca (TERBLANCHE, 1981; AMARANTE et al., 2012).

O Ca é um nutriente que permanece na forma iônica, assim como K e Mg, e é requerido como cofator por algumas enzimas envolvidas na hidrólise de ATP e fosfolípidos (TAIZ; ZIEGER, 2006), podendo, em altas concentrações, ocasionar precipitação de Pi, ATP e outros compostos fosforilados (PLIETH, 2001; WHITE; BROADLEY, 2003). O Ca também é importante na estabilidade e estrutura da parede celular, pois estabelece ligações com grupamentos carboxílicos dos ácidos galacturônicos presentes na pectina (FREITAS et al., 2010) e reduz a atividade de enzimas que degradam polissacarídeos de parede celular, o que permite a manutenção da firmeza da polpa nos frutos (WHITE; BROADLEY, 2003). Além disto, este nutriente estabelece ligações com grupos fosfatos e carboxílicos de fosfolípidos, glicolípidos e glicoproteínas presentes na superfície de membranas celulares, constituindo importante fator de preservação da estabilidade e permeabilidade seletiva destas (FREITAS et al., 2010). O Ca é um elemento considerado essencial às células, mas sua concentração em diferentes compartimentos celulares deve ser regulada de forma precisa pela célula, para não haver morte celular.



A concentração de Ca no apoplasto deve ser maior que 0,1mM, de forma a manter um equilíbrio adequado entre Ca ligado à parede celular e ligado à membrana plasmática (PLIETH, 2001; WHITE; BROADLEY, 2003). Segundo Saure (2005), no interior de organelas, concentrações de Ca em torno de 10 mM têm sido relacionadas com o balanço da distribuição de Ca e equilíbrio iônico celular. No citosol, as concentrações de Ca devem ser mantidas em torno de 0,1-0,2  $\mu$ M, sendo que oscilações citosólicas de Ca estão envolvidas em respostas celulares aos estímulos bióticos e abióticos (PLIETH, 2001). A ocorrência do BP pode estar relacionada com a homeostase do Ca (MIQUELOTO et al, 2011a e 2011b), pois o importante não é o nível total do nutriente no fruto, mas sim a sua localização celular em cada tecido (HO; WHITE, 2005).

Os minerais Ca e Mg são íons com estrutura molecular similares, apresentando, portanto, forte competição em vários processos celulares, como em sítios de ativação de certas enzimas e de ligação às membranas celulares (WHITE; BROADLEY, 2003). Mesmo apresentando esta similaridade, o Mg não desempenha o mesmo papel do Ca em determinados processos celulares, o que pode explicar a ocorrência de elevada relação Mg/Ca em tecidos de fruto com sintomas de deficiência de Ca (FREITAS et al., 2010). Dessa forma, a quantificação das concentrações de Ca e Mg nos frutos pode representar uma ferramenta importante na predição da ocorrência de BP em maçãs (AMARANTE et al., 2009).

Estudos mostram que o resultado da análise das concentrações minerais nos frutos, com vistas a predição do risco de ocorrência de BP, é influenciado pelo tecido do fruto amostrado (AMARANTE et al., 2006a, 2006b e 2011; MIQUELOTO et al., 2011a e 2011b) e pela fração mineral, solúvel ou total, analisada (PAVICIC et al., 2004; AMARANTE et al., 2013b).

O risco de ocorrência do BP é determinado, geralmente, pela análise das concentrações minerais totais do fruto, utilizando a metodologia tradicional de amostragem, onde retira-se uma fatia longitudinal dos frutos, e mantem-se os tecidos de casca e polpa juntos (ARGENTA; SUZUKI, 1994). Entretanto, este método pode não ser o mais indicado, pois envolve a amostragem de tecidos diferentes, com níveis minerais diferenciados. As concentrações de Ca, Mg e K, em uma seção radial, é superior na casca e no centro do fruto (próximo a semente), e inferior no córtex (FERGUSON; WATKINS, 1983). Além disso, há um gradiente longitudinal, onde a concentração de Ca diminui do pedúnculo para o cálice (LEWIS; MARTIN, 1973).

De acordo com Pavicic et al. (2004), a análise das concentrações minerais pode ser feita em duas frações diferentes, sendo elas solúvel e insolúvel em água, que desempenham atividades fisiológicas distintas. White e Broadley (2003) afirmam que na fração insolúvel, o Ca encontra-se complexado com polissacarídeos, lipídeos e proteínas na parede celular, presente no interior do vacúolo, complexado a fenóis, oxalatos e fosfatos, portanto não se encontra disponível para a regulação da atividade celular (HARKER; VENIS, 1991). As concentrações solúveis e insolúveis, conjuntamente, compõem a fração mineral total.

De acordo com Taiz e Zeiger (2006), o vacúolo celular é um compartimento dentro da célula no qual encontram-se água e solutos (ácidos orgânicos, açúcares, enzimas) e é envolto por uma membrana denominada tonoplasto. Conforme o desenvolvimento das células, os vacúolos dos tecidos meristemáticos vão fundindo-se, gerando vacúolos maiores, que crescem de acordo com o envelhecimento das células (TAIZ; ZIEGER, 2006). Grande parte do Ca presente na forma de íon na célula é armazenado no vacúolo, através da atividade do transportador  $\text{Ca}^{2+}\text{-H}^{+}$  antiporte, que utilizam a diferença no potencial eletroquímico para transportar Ca para dentro do vacúolo (BUSH, 1995). Quando dentro do vacúolo, o Ca complexa-se, de forma irreversível, às proteínas, fenóis e outros componentes orgânicos (WHITE; BROADLEY, 2003), tornando-se fisiologicamente inativo. Isto explica a diferença entre concentrações totais e solúveis no mineral, bem como a queda gradativa nas concentrações solúveis de Ca.

O Ca fisiologicamente ativo, ou seja, disponível para o desempenho de sua função de regulador da atividade celular, encontra-se na fração solúvel, associado a ácidos orgânicos, cloretos e nitratos, ou então na forma trocável, associado à pectinas e proteínas solúveis (MANGANARIS et al., 2006 e 2007) sendo, portanto, capaz de prevenir o aparecimento de BP (PAVICIC et al., 2004; SAURE, 2005) e degenerescência de polpa (SAKS et al., 1990) em maçãs.

A utilização de métodos de análise univariada é muito comum para identificar as diferenças nos atributos físico-químicos e atributos minerais entre frutos com e sem BP. Porém, este tipo de método não faz a análise considerando o efeito de todos os atributos conjuntamente (AMARANTE et al., 2011a). Neste caso, os métodos de análise multivariada são mais eficientes para diferenciar esses atributos em diferentes níveis de severidade do distúrbio. A análise canônica discriminante (ACD) é um método de análise multivariada, que permite a visualização das diferenças entre níveis de ocorrência do

distúrbio, avaliando todos os atributos nutricionais (CRUZ-CASTILLO et al., 1994). Portanto, consiste em um método interessante para identificar quais atributos minerais melhor segregam os níveis de severidade do distúrbio (AMARANTE et al., 2006a).

Este trabalho teve por objetivos: 1) determinar as diferenças entre ‘Fuji’ (baixa suscetibilidade ao BP) e ‘Catarina’ (alta suscetibilidade ao BP) quanto à taxa de crescimento e concentrações minerais; 2) quantificar o gradiente de concentração de Ca, Mg e K existente nas diferentes regiões dos frutos de maçãs ‘Gala’; 3) determinar o método de amostragem de tecidos do fruto (casca ou polpa) para quantificar Ca e Mg nas frações total e solúvel mais preciso para segregar maçãs ‘Gala’ quanto à ocorrência de BP; e 4) identificar atributos minerais e físico-químicos relacionados à ocorrência de BP em maçãs ‘Gala’.

# 1 DISTRIBUIÇÃO DE Ca, Mg, K E N EM MAÇÃS ‘FUJI’ E ‘CATARINA’ DURANTE O CRESCIMENTO DOS FRUTOS E SUA RELAÇÃO COM A PREDISPOSIÇÃO DIFERENCIADA DAS CULTIVARES AO “BITTER PIT”

## 1.1 RESUMO

Maçãs ‘Catarina’ possuem resistência à sarna da macieira, porém são altamente suscetíveis à ocorrência de “bitter pit” (BP), enquanto maçãs ‘Fuji’ possuem baixa suscetibilidade à ocorrência do distúrbio. O objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças entre as cultivares Fuji e Catarina quanto à taxa de crescimento e composição mineral dos frutos. Os frutos foram colhidos no município de São Joaquim – SC, em intervalos de 7 (sete) dias, entre os 40 até os 131 dias após a plena floração (DAPF), e a partir de então em intervalos de 15 dias até a maturação comercial (188 DAPF). Para as duas cultivares, a taxa de crescimento apresentou comportamento exponencial dos 40 aos 60 DAPF e parcialmente linear após os 60 DAPF, porém maçãs ‘Catarina’ tiveram crescimento superior à ‘Fuji’, atingindo aos 188 DAPF aproximadamente 170 g e 120 g, respectivamente. Na média dos valores avaliados ao longo do crescimento dos frutos, a concentração de Ca foi superior na ‘Fuji’ nas três regiões dos frutos (proximal, mediana e distal), enquanto as concentrações de Mg, K e N não diferiram entre as cultivares. Na região distal, a ‘Catarina’ apresentou concentrações de Ca abaixo do nível crítico ( $<40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) aos 130 DAPF e a ‘Fuji’ aos 170 DAPF. Os frutos apresentaram maior conteúdo ( $\text{mg fruto}^{-1}$ ) de K, seguido por N, Ca e Mg, em ambas cultivares. As maiores relações N/Ca, (K+Mg)/Ca e (K+Mg+N)/Ca foram encontradas para a cultivar ‘Catarina’ na região distal. De acordo com a análise canônica discriminante o Ca, independente da região, é o atributo que melhor diferencia as duas cultivares quanto à predisposição à ocorrência do distúrbio.

**Palavras-chave:** *Malus domestica* Borkh, cultivar, distúrbio fisiológico, conteúdo mineral, concentração mineral, crescimento.

## 1.2 ABSTRACT

'Catarina' apples have resistance to apple scab, but are highly susceptible to the occurrence of "bitter pit" (BP), while 'Fuji' apples have low susceptibility to the occurrence of the disorder. The objective of this study was to evaluate the differences between Fuji and Catherine cultivars for growth rate and mineral composition of the fruits. The fruits were harvested in São Joaquim - SC, at seven days intervals, between 40 to 131 days after full bloom (DAFB), and thereafter at intervals of 15 days to the commercial maturity (188 DAFB). For both cultivars, the growth rate showed an exponential behavior in 40 to 60 DAFB and partially linear after 60 DAFB, but apples 'Catarina' grew higher than 'Fuji', reaching the 188 DAFB approximately 170 g and 120 g, respectively. The average of the values evaluated over fruit growth, the concentration of Ca was higher in 'Fuji' in the three regions of the fruits (proximal, medial and distal), while Mg, K and N did not differ among cultivars. In the distal region, 'Catarina' showed Ca concentrations below the critical level ( $<40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) to 130 DAFB and 'Fuji' to 170 DAFB. The fruits showed higher levels ( $\text{mg fruit}^{-1}$ ) K, followed by N, Ca and Mg in both cultivars. The highest ratios  $\text{N/Ca}$ ,  $(\text{K}+\text{Mg})/\text{Ca}$  and  $(\text{Mg}+\text{K}+\text{N})/\text{Ca}$  were found for 'Catarina' in the distal region. According to the canonical discriminant analysis, Ca, regardless of region, is the attribute that best differentiates the two cultivars for susceptibility to the occurrence of the disorder.

**Key-words:** *Malus domestica* Borkh, cultivar, physiological disorder, mineral content, mineral concentration, growth.

## 1.3 INTRODUÇÃO

O “bitter pit” (BP) é um dos principais distúrbios fisiológicos que ocorrem em maçãs, desenvolvendo-se durante o armazenamento dos frutos e caracterizando-se, inicialmente, por pequenas depressões que ocorrem na região distal dos frutos, logo abaixo da casca (MEHERIUK et al., 1994). A ocorrência do distúrbio pode ser influenciada por fatores relacionados a condução do pomar como raleio severo, adubação nitrogenada em excesso, utilização de porta-enxertos vigorosos e condições climáticas (SAURE, 2005). Além disto, a ocorrência de BP está intimamente relacionada a baixa

concentração de Ca no fruto, assim como elevadas concentrações de outros nutrientes, como por exemplo Mg, K e N (ARGENTA; SUZUKI, 1994; FERGUSON; WATKINS, 1989; NACHTIGALL; FREIRE, 1998; AMARANTE et al, 2006a, 2006b, 2010).

O Ca é transportado para o fruto através do xilema, na presença de água, durante a fase de divisão celular (TAIZ; ZEIGER, 2006). O fluxo de água na planta, bem como de Ca, é determinado pelo gradiente de potencial hídrico, gerado como resposta às diferentes taxas de transpiração dos tecidos (FREITAS, et al., 2014; TAYLOR; LOCASCIO, 2004; HO; WHITE, 2005). Desta forma, a taxa de crescimento e transpiração mais elevadas podem reduzir o potencial hídrico do tecido, resultando em maior absorção de água e Ca através do sistema radicular (FREITAS, et al., 2014). Durante o crescimento e desenvolvimento dos frutos, os elementos de vaso de xilema tendem a perder sua funcionalidade (DRAŽETA et al., 2001), devido ao crescimento das células do parênquima, que comprimem os feixes vasculares de xilema, ao passo que, o tecido vascular do floema permanece funcional (LANG; RYAN, 1994). Segundo Dražeta et al. (2004), esta interrupção na funcionalidade do xilema, devido ao crescimento do fruto também ocorre em maçãs, ocasionando a redução no aporte de Ca e no fluxo de água.

As elevadas concentrações de Mg, K e N no fruto ocorrem devido à sua alta mobilidade, por serem transportados via floema, resultando em um transporte contínuo destes minerais até o fruto, ao contrário do Ca que é transportado em quantidades insignificantes via floema (VANG-PETERSEN, 1980; FERGUSON; WATKINS, 1989; ARGENTA; SUZUKI, 1994; NACHTIGALL; FREIRE, 1998; AMARANTE et al., 2006a, 2006b, 2012). Os elementos Mg e K competem diretamente com o Ca pelos sítios de ligação na membrana plasmática, devido à similaridade iônica, porém, não desempenham a função de manutenção da integridade das membranas, exercida pelo Ca (FREITAS et al., 2010).

A avaliação do estado nutricional do pomar é um importante fator a ser considerado, para que se faça possível a estimativa da retirada de nutrientes do solo, podendo ser realizada através de curvas de concentração de nutrientes (NACHTIGALL; DECHEN, 2006), sendo feita em folhas e/ou frutos, dependendo da finalidade da avaliação. A concentração de 40 mg kg<sup>-1</sup> foi definida como nível crítico mínimo para o Ca para a região Sul do Brasil, sendo que frutos que apresentem concentrações abaixo disto possuem maior risco de ocorrência de distúrbios fisiológicos (ARGENTA; SUZUKI, 1994; AMARANTE et al., 2012), enquanto que para Mg e K, os níveis

máximos são, respectivamente, 40 mg kg<sup>-1</sup> e 950 mg kg<sup>-1</sup> (TERBLANCHE, 1981; AMARANTE et al., 2012).

A cultivar Catarina foi obtida através do cruzamento entre as cultivares Fuji e PWR37T133, apresenta resistência à sarna da macieira, porém alta suscetibilidade ao BP (CAMILO & DENARDI, 2002; AMARANTE et al., 2006b; AMARANTE et al., 2013b), e pode apresentar o distúrbio ainda em pré-colheita (AMARANTE et al., 2006b), enquanto a cultivar Fuji apresenta baixa suscetibilidade ao distúrbio (AMARANTE et al., 2013b).

Embora a análise univariada seja comumente utilizada para identificar diferenças nutricionais e de estágio de maturação, ela não considera o efeito de todos os atributos atuando em conjunto (AMARANTE et al., 2011a). Devido a isto, a análise multivariada torna-se uma eficiente ferramenta estatística, para identificar os atributos que melhor segregam diferentes severidades do distúrbio (AMARANTE et al., 2006a). Segundo Cruz-Castillo et al. (1994), a análise canônica discriminante (ACD) é um método de análise multivariada, que facilita a visualização das diferenças entre níveis de ocorrência do distúrbio, avaliando todos os atributos nutricionais, discriminando o melhor para segregar frutos sem e com BP.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças entre as cultivares Fuji e Catarina quanto à taxa de crescimento e composição mineral nas diferentes regiões dos frutos, que podem estar relacionadas à suscetibilidade diferenciada entre as duas cultivares.

#### 1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos foram colhidos em um pomar comercial, localizado no município de São Joaquim-SC, na safra de 2009/2010. Utilizou-se macieiras ‘Fuji’ e ‘Catarina’, ambas com 13 anos de idade, sobre porta-enxerto ‘Marubakaido’ com filtro EM-9, conduzidas em líder central, sob sistema de média densidade, com espaçamento de 2,0 m x 6,0 m. Os frutos foram colhidos semanalmente até os 131 dias após a plena floração (DAPF), e quinzenalmente até os 188 DAPF (maturação comercial. No laboratório, estes frutos foram selecionados, eliminando-se aqueles com defeitos ou com dano mecânico, e então homogeneizados.

Os frutos foram avaliados quanto à massa fresca (g), concentrações (mg kg<sup>-1</sup> de massa fresca) e conteúdos (g fruto<sup>-1</sup>) de Ca, Mg, K e N. A partir dos valores de

concentração dos elementos minerais, foram calculadas as relações N/Ca, K/Ca, Mg/Ca, (K+Mg)/Ca e (K+Mg+N)/Ca.

Para análise mineral, os frutos foram cortados em seções radiais, retirando-se as sementes e separando as regiões proximal, mediana e distal, que foram amostradas e analisadas separadamente. Após, as amostras foram submetidas ao processamento em uma multiprocessadora de alimentos, marca Phillips Wallita, modelo RI 7625, e homogeneizados com auxílio de um mixer (modelo Braun Multiquick MR40). Deste, pesou-se 5 g da amostra em cadinhos de porcelana M-2, que foram submetidos ao forno mufla, a 600°C por 5h, para calcinação do tecido. Às cinzas, adicionou-se 15 mL de solução de ácido clorídrico (1,8 N), formando o extrato original.

Para a determinação de Ca total, retirou-se uma alíquota de 3 mL do extrato original e se adicionou 3 mL de lantânio, conforme metodologia descrita por Tedesco et al. (1995), efetuando a leitura em equipamento de absorção atômica (modelo AAnalyst 200). Para Mg total, utilizou-se 2 mL do extrato original adicionados a 10 mL de água destilada. Desta solução, retirou-se 3 mL, seguindo a mesma metodologia descrita para a determinação de Ca. Para o K, 1 mL do extrato original foi adicionado a 7 mL de água destilada e as amostras lidas em fotômetro de chama (Digimed DM-61). O N foi determinado pelo método semimicro Kjeldahl, via digestão úmida do tecido, seguindo a metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

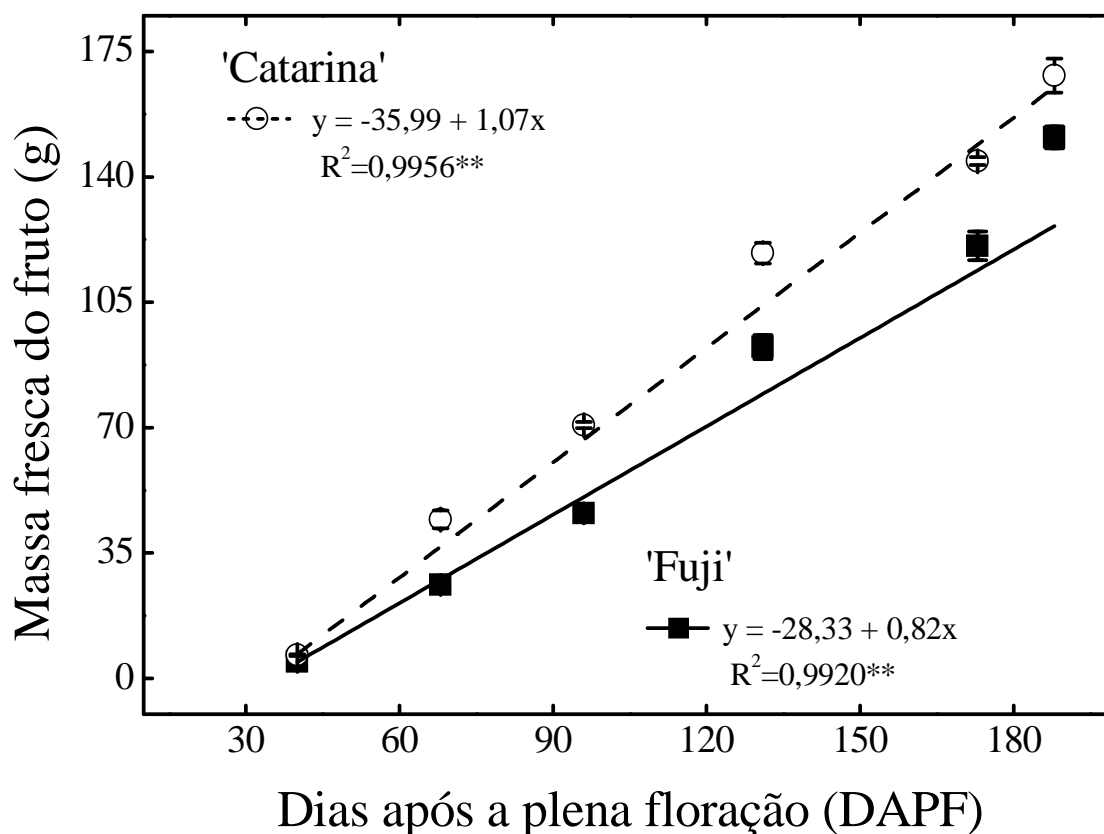
Foram coletados 25 frutos de cada cultivar para cada data de colheita. Os dados de crescimento dos frutos foram submetidos à análise de regressão linear, e os atributos minerais à análise de variância (ANOVA), através do programa estatístico SAS (SAS Institute, 2002). Todos os valores avaliados de concentrações de Ca, Mg, K e N, e das relações N/Ca, K/Ca e Mg/Ca, nas regiões proximal, mediana e distal, ao longo do crescimento dos frutos, foram submetidos à análise canônica discriminante (ACD), para identificar o atributo mineral que melhor segrega as cultivares.

## 1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para ambas cultivares, houve ajuste de modelo de regressão linear, entre DAPF e o acúmulo de massa fresca (g). A cultivar Catarina possui um acúmulo de massa fresca (g) superior à cultivar Fuji (Figura 1), apresentando, em média, frutos com aproximadamente 170 g na colheita comercial (188 DAPF), enquanto a ‘Fuji’ apresentou



frutos com aproximadamente 130 g. Miqueloto et al. (2014), relacionando a perda de funcionalidade do xilema ao crescimento dos frutos, observaram comportamento semelhante para ambas cultivares.



**Figura 1** – Massa fresca (g) de maçãs 'Fuji' e 'Catarina', durante o período de crescimento (dos 40 aos 188 DAPF).

Maçãs 'Catarina' apresentaram menores concentrações de Ca, quando comparadas à 'Fuji' (Tabela 1), para as três regiões do fruto analisadas (proximal, mediana e distal), enquanto as concentrações de Mg, K e N não diferiram entre as cultivares, nas diferentes regiões do fruto. As relações K/Ca, Mg/Ca e N/Ca para as regiões proximal e distal, e a relação N/Ca para a região mediana, foram diferentes entre as cultivares, devido a evidente diferença nas concentrações de Ca nas duas cultivares.

**Tabela 1** - Concentrações de Ca, Mg, K e N (em mg kg<sup>-1</sup> massa fresca), e as relações Mg/Ca, K/Ca e N/Ca, quantificados nas regiões proximal, mediana e distal dos frutos (valores médios obtidos durante o período de 40 a 188 dias após a plena floração), em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’.

Atributo mineral	‘Fuji’	‘Catarina’	Probabilidade*	CV (%)
Proximal				
Ca	67,71	52,18	0,0266	41,4
Mg	37,68	38,86	ns	30,0
K	1.264,3	1.330,1	ns	45,3
N	568,1	567,5	ns	34,9
K/Ca	0,595	0,855	0,0057	46,5
Mg/Ca	19,05	28,67	0,0064	52,9
N/Ca	8,93	12,29	0,0214	48,5
Mediana				
Ca	64,41	47,47	0,0048	39,0
Mg	43,55	39,83	ns	37,5
K	1.419,1	1.369,1	ns	32,6
N	527,0	610,0	ns	38,5
K/Ca	0,753	0,853	ns	37,8
Mg/Ca	27,66	29,00	ns	54,9
N/Ca	9,04	12,97	0,0015	41,2
Distal				
Ca	56,59	42,20	0,0116	41,5
Mg	43,46	38,91	ns	36,9
K	1.152,0	1.386,5	ns	42,9
N	551,5	558,8	ns	35,3
K/Ca	0,808	1,072	0,0140	41,0
Mg/Ca	21,81	38,56	0,0008	61,1
N/Ca	11,12	15,14	0,0376	52,3

\*Probabilidade para a diferença entre maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’. ns: não significativo (p>0,05).

Esta diferença pode estar relacionada ao crescimento mais acelerado da ‘Catarina’, que devido a maior alongação celular em relação à ‘Fuji’ ocasionou compressão dos vasos de xilema, sistema vascular responsável pelo transporte de Ca (TAIZ; ZEIGER, 2006). Amarante et al. (2013b), estudando funcionalidade de xilema em maçãs ‘Catarina’ e ‘Fuji’, constatou que ‘Fuji’ apresentou uma redução gradual na funcionalidade dos vasos, enquanto a ‘Catarina’ tem uma perda mais pronunciada, resultando em um menor aporte de Ca para os frutos nesta cultivar, tornando-se mais suscetível à ocorrência do BP. Além disto, maçãs ‘Catarina’, por apresentarem frutos

maiores, podem ter sua concentração de Ca diluída em um maior número de células, resultando em uma menor concentração do mineral nas diferentes regiões do fruto.

Para o Ca, as duas cultivares apresentaram comportamentos distintos, onde a 'Fuji' teve maior concentração em relação à 'Catarina', permanecendo acima do nível considerado crítico ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) até aproximadamente os 170 DAPF (Figura 2). A 'Catarina', no entanto, apresentou níveis inferiores aos 150 DAPF. Observou-se queda (acentuada para 'Fuji' e discreta para 'Catarina') nas concentrações de Ca durante o desenvolvimento dos frutos, que está associada à diluição do nutriente devido ao crescimento e expansão das células (NACHTIGALL et al., 2006).

As duas cultivares demonstraram queda nas concentrações de Mg após 68 DAPF, sendo que 'Catarina' e 'Fuji' atingiram o nível crítico ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) próximo aos 130 e 150 DAPF, respectivamente. Esta queda também está relacionada à diluição do nutriente dentro do fruto, devido ao crescimento dos mesmos (NACHTIGALL et al., 2006).

Quanto ao K, ambas cultivares apresentaram comportamento semelhante, embora a cultivar Fuji tenha apresentado maior concentração em relação à 'Catarina' aos 48 DAPF (cerca de  $2400 \text{ mg kg}^{-1}$  para 'Fuji' e  $2000 \text{ mg kg}^{-1}$  para 'Catarina') (Figura 2). Entre 68 e 173 DAPF, as concentrações de K foram praticamente iguais, tendendo à estabilidade, com leve aumento no período de colheita comercial (188 DAPF). Em todo o período de desenvolvimento dos frutos, independente da cultivar, o K permaneceu com concentrações acima do nível crítico, de  $950 \text{ mg kg}^{-1}$  (TERBLANCHE, 1981).

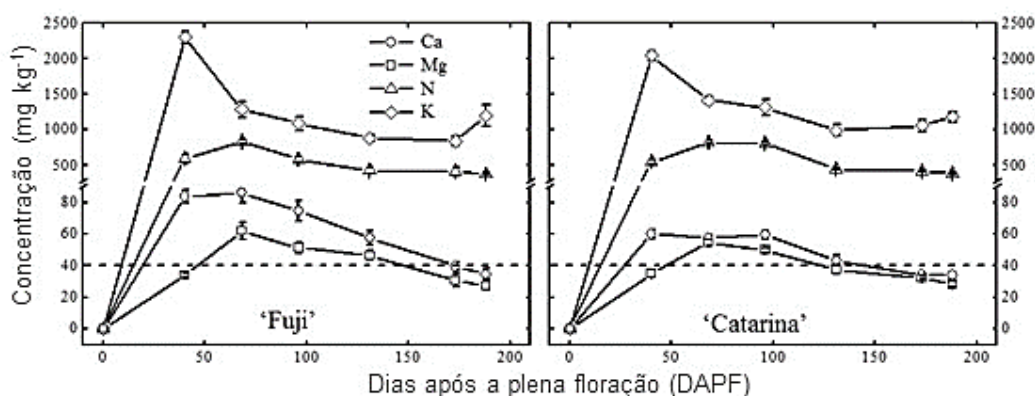
As duas cultivares apresentaram comportamento semelhante quanto à concentração média de N, onde houve um aumento até aproximadamente os 96 DAPF, seguido de uma leve queda até os 131 DAPF, e então tendendo à estabilização em aproximadamente  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  aos 188 DAPF (Figura 2).

As diferenças nas concentrações minerais entre as duas cultivares torna-se muito evidente quando se secciona os frutos em regiões, analisando-as separadamente.

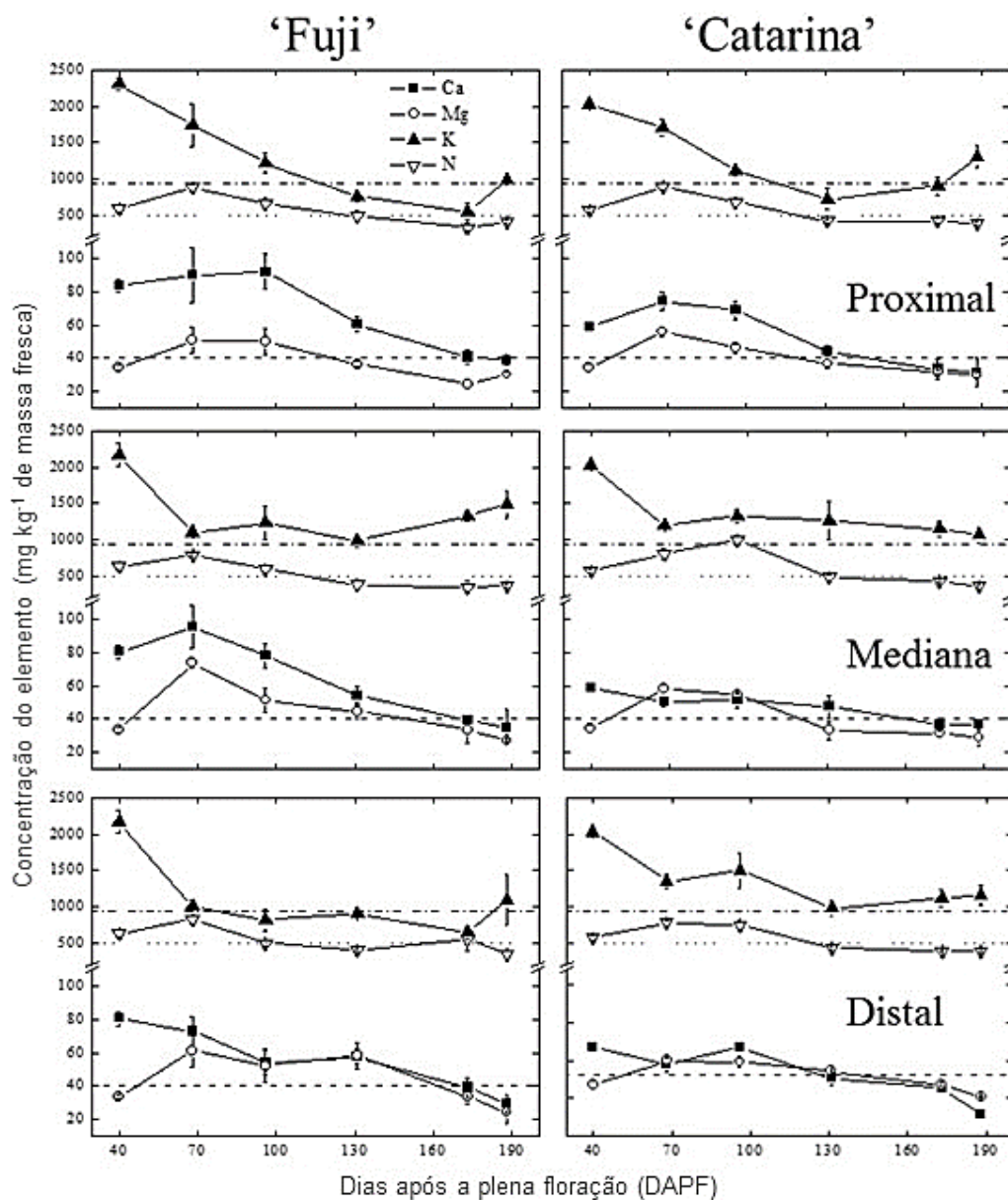
A concentração de Ca, nas três regiões avaliadas dos frutos, é inferior na 'Catarina' (Figura 3), que atinge o nível crítico ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) aos 130 DAPF em todas as regiões, permanecendo abaixo deste nível até a colheita, o que pode favorecer a ocorrência do distúrbio nesta cultivar ainda em pré-colheita (AMARANTE et al., 2006b). Para as duas cultivares, o Ca apresentou um gradiente longitudinal de concentração no fruto, sendo superior na região proximal, decaindo até a região distal, já relatado por Lewis e Martin (1973). De acordo com Ferguson e Watkins (1989), a associação entre baixas concentrações de Ca e altas concentrações de Mg, K e N na região distal dos frutos

favorece a ocorrência de BP. Observou-se que na região distal, maçãs ‘Catarina’ apresentaram concentrações de K e N superiores às apresentadas pela ‘Fuji’, onde o K permaneceu acima do limite crítico durante todo o período de crescimento do fruto, fato que pode estar associado à alta suscetibilidade da ‘Catarina’ ao BP. Estas afirmações também foram reportadas por Amarante et al. (2013b), estudando estas mesmas cultivares, relacionando este baixo aporte de Ca à perda de funcionalidade do xilema, que ocorre antecipadamente em maçãs ‘Catarina’, por apresentar frutos maiores e com crescimento mais rápido, provocando a compressão dos vasos de xilema, que não acompanham o crescimento das outras células.

O Mg apresentou a maior concentração na região mediana da cultivar Fuji, chegando a aproximadamente  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  aos 70 DAPF (Figura 3). Na região distal, o Ca e Mg apresentaram concentrações semelhantes para ‘Catarina’, atingindo o nível crítico de Ca aos 130 DAPF, e permanecendo abaixo e em queda até a colheita.



**Figura 2** – Concentrações médias ( $\text{mg kg}^{-1}$  de massa fresca) de Ca, Mg, K e N em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’, durante o período de crescimento (dos 40 aos 188 DAPF). Linha pontilhada indica o nível crítico de Ca ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ), abaixo do qual aumenta o risco de ocorrência de “bitter pit”.



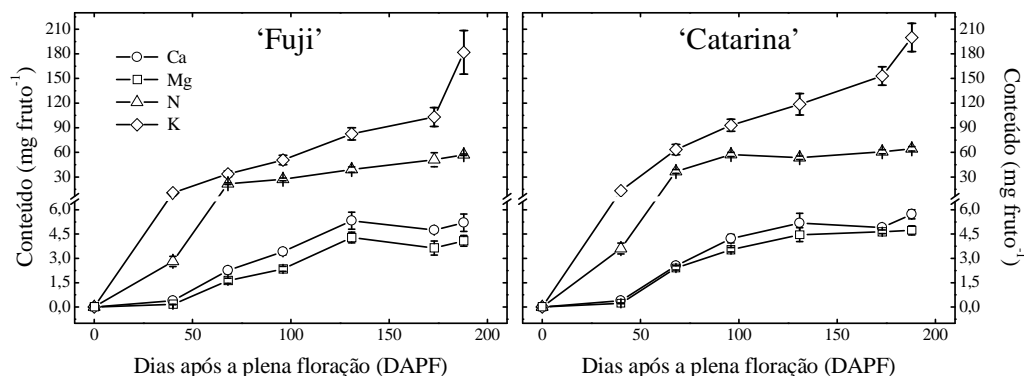
**Figura 3** – Concentrações ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de Ca, Mg, K e N nas regiões proximal, mediana e distal em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’, durante o período de crescimento (dos 40 aos 188 dias após a plena floração). Linhas pontilhadas indicam os níveis críticos de Ca ( $> 40 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Mg ( $< 40 \text{ mg kg}^{-1}$ ), N ( $< 500 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e K ( $< 950 \text{ mg kg}^{-1}$ ), recomendados para reduzir o risco de ocorrência de “bitter pit”.

A análise de conteúdo mineral do fruto é expressa em  $\text{mg fruto}^{-1}$ , ou seja, representa a massa de cada mineral transportada até o fruto, possibilitando traçar curvas de acúmulo de cada elemento, funcionando como bons indicadores da demanda de cada

nutriente nas diferentes fases de crescimento e desenvolvimento (NACHTIGALL; DECHEN, 2006).

No período inicial de crescimento dos frutos, ambas cultivares apresentaram aumento exponencial nos conteúdos de K e N, enquanto os conteúdos de Ca e Mg tiveram um incremento discreto até os 40 DAPF, apresentando ligeiro incremento até os 140 DAPF, tendendo à estabilização até a colheita (Figura 4).

Em relação à ‘Fuji’, maçãs ‘Catarina’ apresentaram maior conteúdo de K durante todo o período avaliado, atingindo aproximadamente 200 mg fruto<sup>-1</sup> aos 188 DAPF, e maior conteúdo de N até os 140 DAPF (cerca de 50 mg fruto<sup>-1</sup>), tendendo a estabilizar após esta data (Figura 4). Os conteúdos de Ca e Mg são semelhantes nas duas cultivares, durante o período de crescimento dos frutos, mesmo a Catarina apresentando maior suscetibilidade ao BP. Isto novamente corrobora com o fato de frutos de ‘Catarina’ apresentarem maior taxa de crescimento de células e por consequência maior tamanho em relação à ‘Fuji’, diluindo os conteúdos em um maior número de células (NACHTIGALL et al., 2006). Além disto, a alta suscetibilidade de maçãs ‘Catarina’ ao BP pode estar também associada aos elevados conteúdos de K, que permanece sendo absorvido de forma praticamente linear durante toda a fase de desenvolvimento dos frutos, e, por estar em altas quantidades, compete diretamente com o Ca pelos sítios de ligação na membrana plasmática maçãs (FERGUSON; WATKINS, 1989; ARGENTA; SUZUKI, 1994; NACHTIGALL; FREIRE, 1998; PAVICIC et al., 2004; AMARANTE et al., 2006a; AMARANTE et al., 2006b), sem desenvolver a mesma função de manutenção de integridade das membranas (FREITAS et al., 2010), que acabam por entrar em colapso, ocasionando morte celular.



**Figura 4** – Conteúdos ( $\text{mg fruto}^{-1}$ ) de Ca, Mg, K e N em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’, durante o período de crescimento (dos 40 aos 188 DAPF).

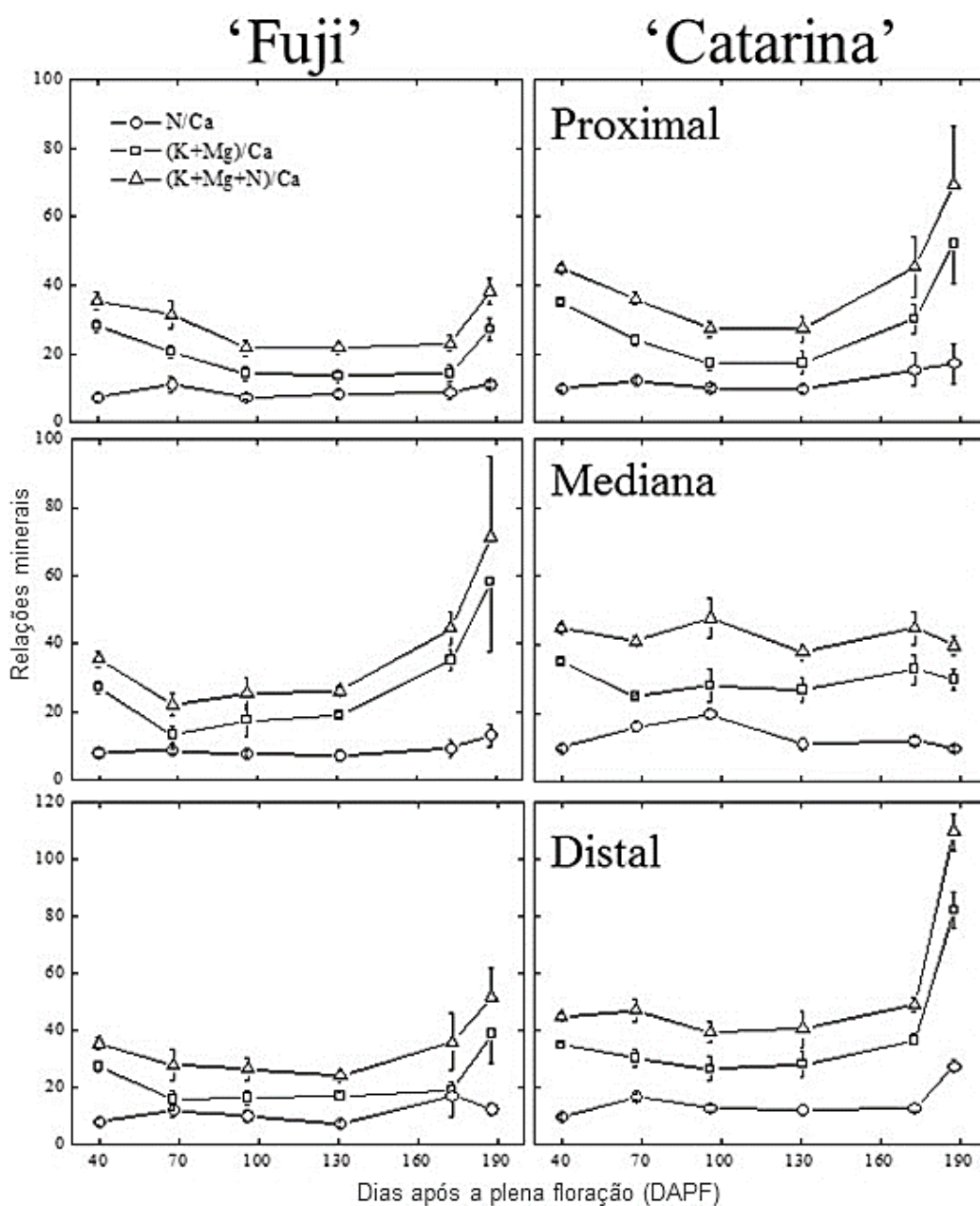
Quanto às relações entre os nutrientes, para as três regiões do fruto avaliadas, as duas cultivares apresentaram comportamentos distintos, com destaque para a região distal na cultivar Catarina, que apresentou relações elevadas de  $(\text{K}+\text{Mg})/\text{Ca}$  e  $(\text{K}+\text{Mg}+\text{N})/\text{Ca}$  (Figura 5), muito provavelmente influenciadas pelo K, que apresentou concentrações altas durante todo o desenvolvimento dos frutos (Figura 4). Além disso, as relações  $\text{N}/\text{Ca}$ ,  $(\text{K}+\text{Mg})/\text{Ca}$  e  $(\text{K}+\text{Mg}+\text{N})/\text{Ca}$  apresentaram um aumento exponencial na fase final de crescimento (entre 170 e 188 DAPF). Miqueloto et al. (2011a, 2011b), estudando estas mesmas cultivares, observaram que a alta suscetibilidade ao BP apresentada por maçãs ‘Catarina’ (alta incidência e severidade) pode estar associada às elevadas relações destes nutrientes na região distal dos frutos, muito maiores que as constatadas para ‘Fuji’. O K é antagonista ao Ca, devido, principalmente, a uma competição entre estes nutrientes por sítios de ligação na membrana plasmática (NEUWALD et al., 2008; JAMES; JOBLING, 2009; FREITAS et al., 2010). Além disto, Miqueloto et al. (2011a, 2011b) afirmam que a relação  $\text{K}/\text{Ca}$  na casca foi a que melhor discriminou frutos sem e com BP em maçãs ‘Catarina’, mostrando que o K está diretamente relacionado ao distúrbio, devido à sua alta concentração em relação ao Ca.

A cultivar Catarina apresentou maiores relações  $(\text{K}+\text{Mg})/\text{Ca}$  e  $(\text{K}+\text{Mg}+\text{N})/\text{Ca}$  na região proximal em relação a ‘Fuji’ (Figura 5). No entanto, ambas cultivares tiveram um decréscimo nas relações  $(\text{K}+\text{Mg})/\text{Ca}$  e  $(\text{K}+\text{Mg}+\text{N})/\text{Ca}$  na fase inicial de crescimento (até aproximadamente os 95 DAPF), seguido de estabilização (entre os 95 e 160 DAPF) e

posterior aumento. A relação N/Ca apresentou um ligeiro aumento entre 40 e 70 DAPF, permanecendo estável até os 160 DAPF, onde houve aumento até os 188 DAPF (Figura 5).

Para a cultivar Fuji, a região mediana apresentou as maiores relações N/Ca, (K+Mg)/Ca e (K+Mg+N)/Ca, quando comparada as outras regiões do fruto (Figura 5). Um dos maiores problemas no armazenamento de maçãs 'Fuji' é a suscetibilidade desta cultivar à degenerescência de polpa (BRACKMANN et al., 2002), que afeta principalmente a região mediana dos frutos. A ocorrência deste distúrbio está relacionada, principalmente, ao acúmulo de CO<sub>2</sub> no ambiente de armazenamento. Entretanto, Corrêa et al. (2012) relataram a possibilidade de uma relação entre a ocorrência de degenerescência de polpa com as concentrações minerais do fruto, principalmente a alta relação K/Ca existente nesta região do fruto. O Ca tem por função fisiológica manter a integridade e estrutura celular e, quando em baixa concentração, deixa seus sítios de ligação livres, que são rapidamente ocupados por outros íons similares a ele, tais como Mg e K (FREITAS et al., 2010).





**Figura 5** – Valores das relações N/Ca, (K+Mg)/Ca e (K+Mg+N)/Ca nas regiões proximal, mediana e distal em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’, durante o período de desenvolvimento dos frutos (dos 40 aos 188 dias após a plena floração).

Por haver diferença nas concentrações de Ca, Mg, K e N e as relações Mg/Ca, K/Ca e N/Ca entre as duas cultivares nas diferentes regiões (Tabela 1), estes dados foram

submetidos à análise multivariada, através da análise canônica discriminante (ACD). Conforme sugerido por Amarante et al. (2006a), o parâmetro utilizado foi o coeficiente da taxa de discriminação paralela (TDP), que consiste no produto dos coeficientes de correlação canônica ( $r$ ) e os coeficientes canônicos padronizados (CCP).

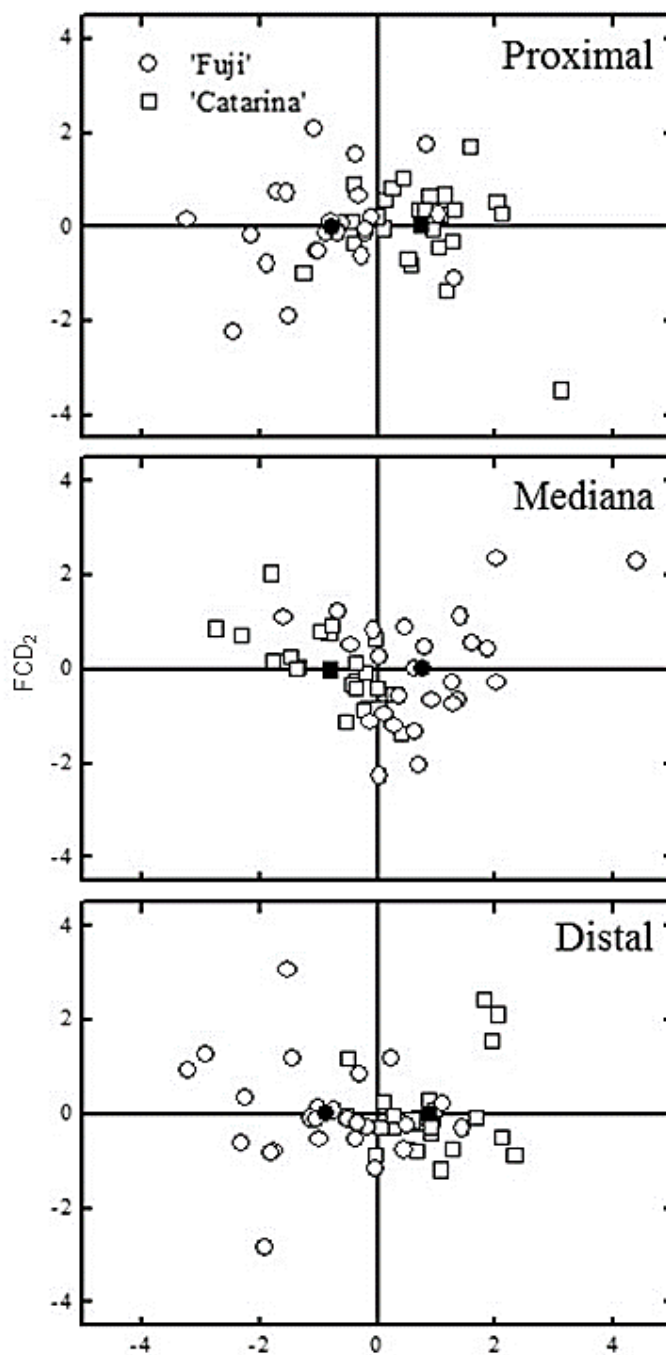
O atributo Ca apresentou a maior TDP para as regiões proximal (0,8463) e mediana (0,7717), porém, para a região distal o atributo com maior TDP foi a relação Mg/Ca (0,6911) (Tabela 2), o que comprova a existência de diferença nas concentrações entre maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’. Entretanto, o Ca analisado isoladamente pode não ser o melhor parâmetro para segregar frutos sem e com “bitter pit” (BENAVIDES et al, 2002; AMARANTE et al., 2006a, 2009, 2010; MIQUELOTO et al., 2011a, 2011b). A representação gráfica entre os coeficientes canônicos padronizados (CCP) das funções canônicas discriminantes 1 e 2 (Figura 6), deixa evidente a diferenças entre as duas cultivares para as três regiões do fruto.

**Tabela 2** - Valores de coeficiente canônico padronizado (CCP), correlação canônica ( $r$ ) e coeficiente da taxa de discriminação paralela (TDP) para a função canônica discriminante 1 (FCD<sub>1</sub>), referente aos atributos minerais descritos na Tabela 1 (concentrações de Ca, Mg, K e N, em mg kg<sup>-1</sup> massa fresca, e as relações Mg/Ca, K/Ca e N/Ca), quantificados nas regiões proximal, mediana e distal dos frutos (valores médios obtidos durante o período de 40 a 188 dias após a plena floração), para discriminar entre ‘Fuji’ e ‘Catarina’.

Atributo mineral	Proximal			Mediana			Distal		
	CCP	$r$	TDP	CCP	$r$	TDP	CCP	$r$	TDP
Ca	-2,0031	-0,4225	0,8463	1,4239	0,5420	0,7717	-1,2776	-0,4228	0,5402
Mg	0,5678	0,0657	0,0373	-0,4900	0,1543	-0,0756	-0,7673	-0,1707	0,1309
K	0,4690	0,0716	0,0336	-0,6737	0,0707	-0,0476	1,0690	0,2486	0,2657
N	1,1728	-0,0021	-0,0024	0,0483	-0,2482	-0,0120	1,3092	0,0210	0,0275
Mg/Ca	0,9937	0,5347	0,5313	0,5138	-0,2143	-0,1101	1,6825	0,4108	0,6911
K/Ca	0,3863	0,5263	0,2033	0,9872	-0,0553	-0,0546	-0,1918	0,5766	-0,1106
N/Ca	-1,4777	0,4394	-0,6494	-0,8567	-0,6166	0,5283	-1,5817	0,3445	-0,5450
Correlação canônica*	0,6200			0,6183			0,6672		
Probabilidade**	<0,0001			<0,0001			<0,0001		

\* Correlação canônica entre os atributos minerais e a FCD<sub>1</sub>.

\*\*Para a diferença entre coeficientes canônicos padronizados (CCP) de maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’.



**Figura 6** – Coeficientes canônicos padronizados (CCP) das funções canônicas discriminantes 1 e 2 ( $FCD_1$  e  $FCD_2$ ), em maçãs 'Fuji' e 'Catarina', nas regiões proximal, mediana e distal, considerando os atributos minerais descritos na Tabela 2. Símbolo cheio representa o valor médio de CCP para cada cultivar. Como a análise permite apenas uma função canônica discriminante, uma segunda função discriminante foi criada com observações aleatórias  $[N(0,1)]$  apenas para fins de representação gráfica.

## 1.6 CONCLUSÕES

1. A cultivar Catarina apresenta taxa de crescimento dos frutos superior à cultivar Fuji, favorecendo a diluição de Ca no fruto, o que pode estar associada à sua alta suscetibilidade a “bitter pit”.
2. A região distal da cultivar Catarina apresentou as mais elevadas relações  $(K+Mg)/Ca$  e  $(K+Mg+N)/Ca$ , quando comparada à cultivar Fuji, tornando-a, portanto, mais suscetível à ocorrência de “bitter pit”.
3. A análise canônica discriminante mostrou que o Ca para as regiões proximal e mediana e a relação  $Mg/Ca$  para a região distal, são os melhores atributos que diferenciam maçãs ‘Catarina’ e ‘Fuji’ quanto à suscetibilidade ao “bitter pit”.

## 2 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE Ca E Mg EM FRUTOS COM E SEM “BITTER PIT”, E DETERMINAÇÃO DOS GRADIENTES MINERAIS DE Ca, Mg E K, NAS FRAÇÕES TOTAL E SOLÚVEL, EM MAÇÃS ‘GALA’

### 2.1 RESUMO

O “bitter pit” (BP) é um dos principais distúrbios fisiológicos em maçãs e está relacionado a baixa concentração de Ca nos frutos, assim como à alta concentração de outros nutrientes como Mg, K e N. Este trabalho teve por objetivos: 1) determinar o gradiente mineral de Ca, Mg e K existente nas diferentes regiões do fruto; 2) determinar qual o método de amostragem mais indicado para segregar maçãs ‘Gala’ quanto à ocorrência de BP; e 3) identificar atributos minerais e físico-químicos relacionados à ocorrência de BP em maçãs ‘Gala’. Para o experimento I, os frutos foram divididos em 12 diferentes seções (três para casca e nove para polpa) e submetidos às análises minerais de Ca, Mg e K, nas frações total e solúvel. Na fração total, as concentrações minerais foram superiores no tecido da casca, ocorrendo o inverso para a fração solúvel. As concentrações de Ca, Mg e K foram inferiores na região do córtex. Além disto, esta região apresentou um gradiente longitudinal, onde os maiores valores encontraram-se na região proximal dos frutos. As relações Mg/Ca, K/Ca e (K+Mg)/Ca foram superiores, nas frações total e solúvel, na região distal. Para o experimento II, maçãs ‘Gala’ foram separadas em lotes sem e com BP, analisadas na colheita e após 150 dias em armazenamento refrigerado (AR), quanto a atributos de maturação e concentrações de Ca e Mg, nas frações total e solúvel da casca e da polpa. Frutos com BP apresentaram maior AT, menor pH e menor firmeza de polpa, além de apresentarem alta relação Mg/Ca na fração total da casca e polpa, e solúvel da polpa. A análise canônica discriminante (ACD) indicou que a relação Mg/Ca solúvel na polpa e a concentração total de Mg na polpa, para os atributos minerais, e AT para os atributos físico-químicos, foram os mais indicados para segregar frutos sem e com BP.

**Palavras-chave:** *Malus domestica* Borkh, fruto, distúrbio fisiológico, cálcio, métodos de amostragem, análise canônica discriminante.

## 2.2 ABSTRACT

The "bitter pit" (BP) is an important physiological disorder in apples and is related to low levels of Ca in the fruit, which is also associated with high concentration of Mg, K and N. This study aimed to: 1) determinate the mineral gradient of Ca, Mg and K existing in the different regions of the fruit; 2) determinate the most appropriate sampling method to segregate 'Gala' apples for the occurrence of BP; and 3) identify minerals and physico-chemical properties related to the occurrence of BP in 'Gala' apples. For the first experiment, fruits were divided into 12 different sections (three for peel and nine for pulp) and subject to the mineral analyzes of Ca, Mg and K in total and soluble fractions. In the total fraction, mineral concentrations were higher in the tissue of the peel, while the opposite occurred for the soluble fraction. The Ca, Mg and K were lower than in the cortex. In addition, this region had a longitudinal gradient, where the highest values are found in the proximal region of the fruit. The Mg/Ca, K/Ca and (K+Mg)/Ca relations were higher in total and soluble fractions, in the distal region. For the second experiment, 'Gala' apples were separated into lots with and without BP, analyzed at harvest and after 150 days in cold storage (CS), for attributes of maturation and Ca and Mg concentrations in total and soluble fractions of peel and pulp. Fruits with BP had higher AT, lower pH and lower firmness, besides had high ratio Mg/Ca in the total phase of the peel and pulp, and soluble pulp. Canonical discriminant analysis (CDA) indicated that the Mg/Ca ratio soluble in the pulp and the total concentration of Mg in the pulp, for mineral attributes, and AT for the physical and chemical attributes, were best suited to segregate fruit with and without BP.

**Key – words:** *Malus domestica* Borkh, fruit, physiological disorder, calcium, sampling methods, canonical discriminant analysis.

## 2.3 INTRODUÇÃO

Apesar do “bitter pit” (BP) ser um distúrbio fisiológico em maçãs estudado a bastante tempo, as causas fisiológicas que promovem o seu desenvolvimento são ainda pouco conhecidas (PERRING, 1986; SESTARI, 2006). As principais cultivares afetadas pelo distúrbio no Brasil são ‘Gala’, ‘Fuji’, ‘Golden Delicious’, ‘Braeburn’ e ‘Catarina’

(ARGENTA; SUZUKI, 1994; NACHTIGALL; FREIRE, 1998; AMARANTE et al., 2005; AMARANTE et al., 2006a; AMARANTE et al., 2006b).

O BP geralmente se desenvolve durante a fase de armazenamento (AMARANTE et al., 2009), embora existam casos de ocorrência do distúrbio ainda na planta, quando não há medidas de prevenção ou em anos de verão com temperaturas muito elevadas (FERGUSON; WATKINS, 1989). De acordo com Ferguson e Watkins (1989), o distúrbio está diretamente relacionado com a baixa concentração de Ca e às altas concentrações de K, Mg e N no fruto.

O Ca é necessário para a estruturação de paredes celulares, principalmente na lamela média, funciona como mensageiro secundário na regulação de vários processos metabólicos em plantas (SANDERS et al., 1999; TAIZ; ZEIGER, 2006) e reduz a atividade de enzimas que degradam polissacarídeos de parede celular, permitindo a manutenção da firmeza da polpa nos frutos (WHITE & BROADLEY, 2003). O Ca também estabelece ligações com grupos fosfatos e carboxílicos de fosfolipídeos, glicolipídeos e glicoproteínas na superfície de membranas celulares, constituindo um importante fator de preservação da estabilidade e permeabilidade seletiva das mesmas (FREITAS et al., 2010).

A predição do risco de BP é feita normalmente através da análise das concentrações minerais nos frutos, por meio do método tradicional de amostragem, que consiste na retirada de uma fatia longitudinal do fruto, contendo os tecidos de casca e polpa, que são analisados conjuntamente (ARGENTA; SUZUKI, 1994; AMARANTE 2006b). Entretanto, este método pode ser ineficiente na predição do risco de ocorrência de BP, pois envolve a amostragem de tecidos com níveis nutricionais diferenciados (AMARANTE et al., 2006a, 2006b e 2011; MIQUELOTO et al., 2011a, 2011b). As concentrações de Ca variam nas diferentes partes do fruto (AMARANTE et al., 2011) e de acordo com a fração mineral (total ou solúvel) analisada (PAVICIC et al., 2004).

Em um corte radial dos frutos, as concentrações de Ca, Mg e K, são superiores na casca e no centro do fruto (próximo à semente), e inferiores no córtex (FERGUSON; WATKINS, 1983). Além disso, existe um gradiente longitudinal, onde a concentração de Ca diminui do pedúnculo para o cálice dos frutos (LEWIS; MARTIN, 1973), região com maior probabilidade de ocorrência do distúrbio.

As concentrações minerais nas frações solúvel e insolúvel em água apresentam diferentes atividades fisiológicas (PAVICIC et al., 2004; SAKS et al., 1990). Na fração insolúvel, o Ca encontra-se complexado com polissacarídeos, lipídeos e proteínas na

parede celular, e está presente no interior do vacúolo, complexados com fenóis, oxalatos e fosfatos (WHITE; BROADLEY, 2003), não estando disponíveis para a regulação da atividade celular (HARKER; VENIS, 1991). Já na fração solúvel em água, o Ca está associado a ácidos orgânicos, cloretos e nitratos, ou encontra-se na forma trocável, adsorvido às pectinas e proteínas solúveis, sendo considerado fisiologicamente ativo (MANGANARIS et al., 2006 e 2007) e, portanto, capaz de prevenir o aparecimento de BP (PAVICIC et al., 2004; SAURE, 2005) e degenerescência de polpa (SAKS et al., 1990) em maçãs.

Portanto, a análise das concentrações minerais nos tecidos de casca e polpa amostrados isoladamente podem permitir a identificação do tecido e do atributo mineral que melhor discrimina os frutos quanto à severidade de BP (AMARANTE, et al., 2006b). Além disto, o sintoma do distúrbio se manifesta geralmente na região distal dos frutos, logo abaixo da casca (LEWIS; MARTIN, 1973; FERGUSON; WATKINS, 1983, AMARANTE et al., 2011), motivo pelo qual a análise dos tecidos apenas na região distal do fruto é o mais apropriado para segregar frutos com e sem BP (AMARANTE et al., 2013a). Isto, aliado ao desequilíbrio entre os minerais Mg e Ca (alta relação Mg/Ca) na fração solúvel do tecido da casca da região distal do fruto, podem explicar o grau de predisposição dos frutos à manifestação dos sintomas de BP em maçãs.

Por haver muitos fatores envolvidos na ocorrência de BP, faz-se necessária a utilização de métodos de análise multivariada, permitindo a análise simultânea de diversos fatores, cujos efeitos não podem ser analisados separadamente. Devido a isto, a análise multivariada deve ser considerada quando a intenção é identificar quais atributos minerais melhor segregar os níveis de severidade do distúrbio (AMARANTE et al., 2006a).

Os objetivos deste trabalho foram: 1) determinar o gradiente mineral de Ca, Mg e K existente nas diferentes regiões do fruto; 2) determinar qual o método de amostragem mais indicado para segregar maçãs ‘Gala’ quanto à ocorrência de BP; e 3) identificar atributos minerais e físico-químicos relacionados à ocorrência de BP em maçãs ‘Gala’.

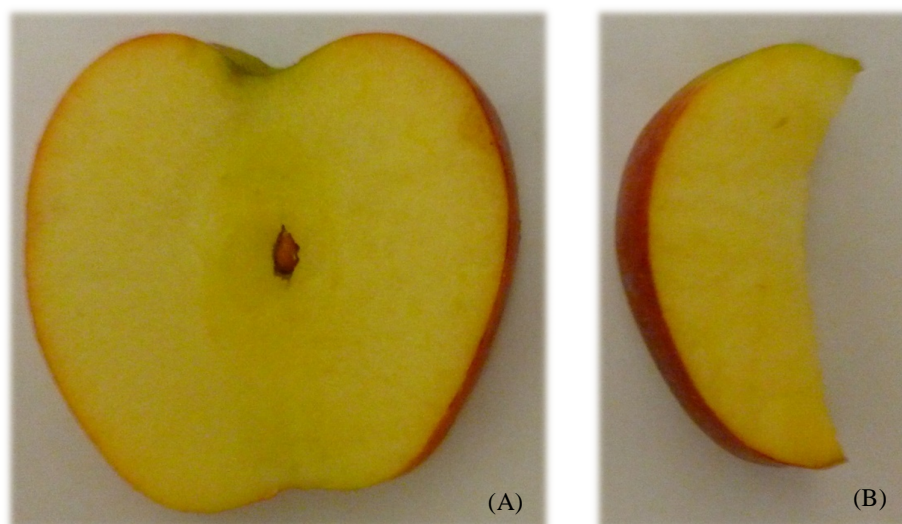
## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento I foi composto por maçãs ‘Gala’ provenientes de um pomar comercial localizado no município de Fraiburgo, SC, colhidas na safra 2013/14, em maturação comercial. As plantas possuíam 12 anos de idade, sobre porta-enxerto

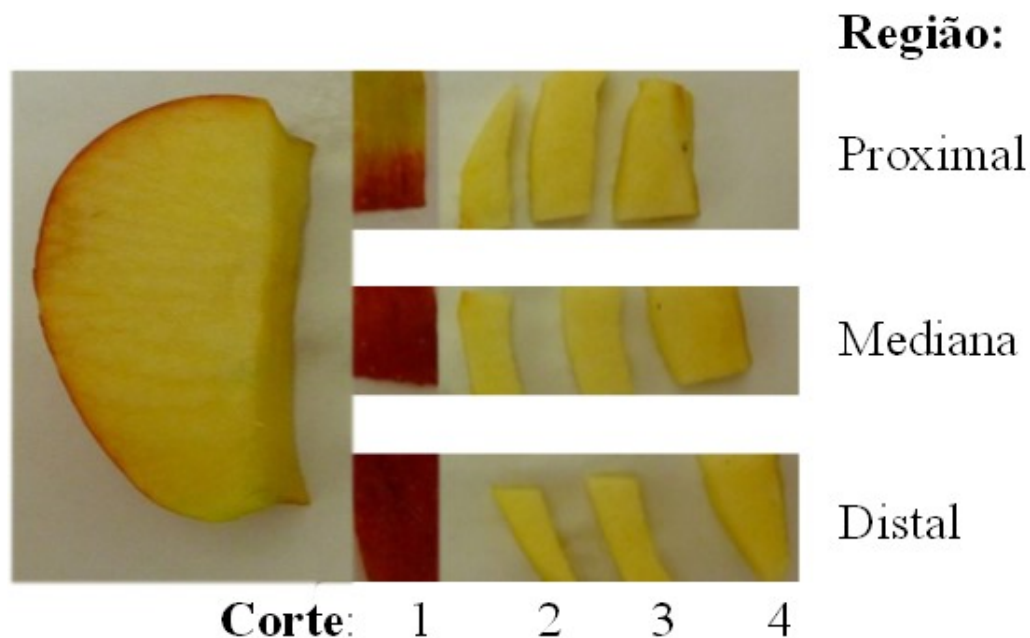


‘Marubakaido’ com filtro EM-9, conduzidas com líder central, em sistema de alta densidade, com espaçamento de 3,5 m x 0,8 m. Os frutos foram armazenados em câmara fria comercial por cinco meses ( $0\pm 1$  °C; UR 90-95%).

Os frutos foram cortados em fatias longitudinais de 10 mm de espessura (Figura 7), separando os tecidos de casca por região do fruto (proximal, mediana e distal), e os tecidos de polpa separados em seções longitudinais e radiais (Figura 8).



**Figura 7** – Secção longitudinal de maçãs ‘Gala’ (A) e separação das amostras (sem a região carpelar do fruto) para análise das concentrações minerais nas diferentes regiões do fruto (B). (Fonte: SANTOS; 2014).



**Figura 8** – Secção longitudinal do fruto, com separação das regiões (proximal, mediana e distal) para análise das concentrações minerais. O corte 1 corresponde a casca, e os cortes 2, 3 e 4 diferentes porções da polpa (Fonte: SANTOS; 2014).

Cada tecido foi analisado separadamente, quanto às concentrações de Ca, Mg e K nas frações total e solúvel. Para análise das concentrações totais de Ca e Mg, os tecidos da casca e da polpa foram submetidos ao processamento em uma multiprocessadora de alimentos (Whalita modelo RI 7625), e homogeneizados em um mixer (modelo Braun Multiquick MR40). Após, pesou-se 5 g da amostra em cadinho de porcelana M-2 e introduziu-se em forno mufla a 600 °C por 5 h para calcinação, seguindo a metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Após, adicionou-se às cinzas 15 mL de solução de ácido clorídrico (1,8 N), compondo o extrato original. Para a determinação de Ca, retirou-se uma alíquota de 3 mL do extrato original e se adicionou 3 mL de lantânio, efetuando a leitura da concentração mineral no equipamento de absorção atômica (modelo AAnalyst 200). Para a determinação de Mg total, retirou-se 2 mL do extrato original e se adicionou 10 mL de água destilada. Desta solução se pipetou 3 mL e se procedeu a quantificação conforme descrito para a determinação de Ca. Para análise das concentrações totais de K, o extrato original utilizado foi o mesmo para Ca e Mg, porém, utilizou-se a alíquota de 1

mL de extrato original diluídos em 7 mL de água destilada, com leitura realizada em aparelho de fotômetro de chama.

Para a análise das concentrações solúveis, os tecidos foram pesados em aproximadamente 150 g para polpa e 90 g para casca, submetidos ao processamento com auxílio de uma multiprocessadora de alimentos, reservando-se apenas o suco dos frutos. Em seguida, o suco das amostras foi centrifugado por 15 min em velocidade de 9000 rpm. O sobrenadante foi retirado e compôs o extrato original. Deste extrato, tanto para Ca como para Mg, retirou-se uma alíquota de 3 mL e adicionou-se 3 mL de água destilada, procedendo com a leitura em aparelho de absorção atômica (modelo AAnalyst 200). Para o K, o extrato original utilizado foi o mesmo para Ca e Mg, porém, utilizou-se a alíquota de 1 mL de extrato original diluídos em 7 mL de água destilada, com leitura realizada em aparelho de fotômetro de chama.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado fatorial, composto por cinco repetições, com 25 frutos cada repetição, provenientes de uma mesma quadra dentro do pomar. Os dados do experimento I foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparação de médias, através do programa estatístico SAS (SAS Institute, 2002).

Para o experimento II, os frutos foram colhidos em um pomar comercial localizado no município de Guarapuava - PR (Latitude 25° 23' 43" S, longitude 51° 27' 29" W e altitude 1098 m), na safra de 2013/14. Foram utilizadas macieiras da cultivar Gala, com idade de seis anos, sobre porta-enxerto 'Marubakaido' com filtro EM-9, conduzidas com líder central, em sistema de alta densidade, com espaçamento de 3,8 m x 0,8 m. Os frutos foram colhidos em período de maturação comercial, e após o armazenamento, separados em lotes sem e com a presença de BP (Figura 9A e B). No laboratório, os frutos foram selecionados, eliminando-se aqueles com defeitos ou com dano mecânico, procedendo-se, em seguida, a homogeneização das unidades experimentais. Em seguida, parte dos frutos foram separados para análises iniciais e o restante armazenado sob refrigeração (AR) a  $0 \pm 1$  °C e UR 90-95%, por um período de 150 dias. A análise inicial foi composta por quatro repetições de cada lote (sem ou com a presença do distúrbio), com 25 frutos cada repetição.



**Figura 9** – Frutos de maçã ‘Gala’, após 5 meses de armazenamento em AR, sem (A) e com (B) a presença de “bitter pit”. (Fonte: SANTOS; 2014).

Os frutos, tanto para as análises iniciais quanto pós-armazenamento, foram submetidos às análises de acidez titulável (AT), sólidos solúveis (SS), pH, firmeza de polpa, atributos de textura (forças para a penetração da casca e da polpa) e concentrações totais e solúveis de Ca e Mg nos tecidos da casca e polpa, utilizando apenas a região distal do fruto.

Os valores de AT (%) foram obtidos por meio de uma amostra de 10 mL de suco dos frutos, centrifugados por um multiprocessador de alimentos, da marca Phillips Wallita, modelo RI7625. A amostra foi diluída em 90 mL de água destilada e então titulada, com solução de NaOH 0,1 N até atingir pH 8,1. Os teores de SS (°Brix) foram determinados com o uso de um refratômetro digital modelo Atago, utilizando o suco extraído dos frutos utilizados para AT. A firmeza de polpa (N) foi determinada através de um penetrômetro digital FTA GS-15, com ponteira de 12 mm de diâmetro, na região equatorial dos frutos, em dois lados opostos, após remoção de uma pequena porção da casca.

Para análise mineral, os frutos foram cortados na transversal e utilizou-se apenas a região distal, onde os tecidos de casca e polpa foram separados. Para a polpa, retirou-se fatias a 5 mm, logo após a casca. A análise de nutrientes nos tecidos, nas frações total e solúvel foram realizadas seguindo metodologia descrita no experimento I.

Os dados do experimento II foram submetidos à análise de variância (ANOVA;  $p < 0,05$ ) e à análise canônica discriminante (ACD) com a utilização do programa SAS (SAS Institute, 2002). A ACD foi utilizada para determinar quais atributos físico-químicos e minerais podem ser utilizados para segregar frutos sem e com BP, através da quantificação da taxa de discriminação paralela (TDP).

## 2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.5.1. Experimento I

As concentrações de Ca, Mg e K na fração total foram significativamente maiores nos tecidos de casca em comparação aos de polpa, optando-se, portanto, pela análise estatística dos tecidos de casca e polpa separadamente (Figuras 10 e 11).

Para o tecido de casca analisado na fração total, as concentrações de Ca foram menores na região distal em relação à proximal e mediana, que não diferiram significativamente entre si (Figura 10). De acordo com Amarante et al. (2011), em maçãs ‘Fuji’ a concentração de Ca no tecido casca é um indicativo para a predisposição ao “BP”. Para o Mg, observou-se uma redução gradativa nas concentrações, da região proximal em direção à distal. O K apresentou comportamento diferente destes outros dois minerais, obtendo a menor concentração na região mediana do fruto e concentrações semelhantes entre as regiões proximal e distal.

As relações  $(K+Mg)/Ca$  e  $K/Ca$ , quantificadas na fração total para o tecido de casca, se demonstraram superiores na região distal dos frutos, não diferindo entre as demais regiões (Figura 10). Segundo Amarante et al. (2006b, 2014a) e Miqueloto et al. (2011a, 2011b), frutos com a ocorrência de BP apresentam, no tecido de casca da região distal, menores teores de Ca e altos valores para as relações  $(K+Mg)/Ca$  e  $K/Ca$ , quando comparados a frutos sem BP nas cultivares Fuji e Catarina. Além disto, Miqueloto et al. (2011a, 2011b) concluíram que, para a cultivar Catarina, o atributo mineral que melhor segregou frutos sem e com a presença de BP foi a relação  $K/Ca$  na casca da porção distal do fruto.

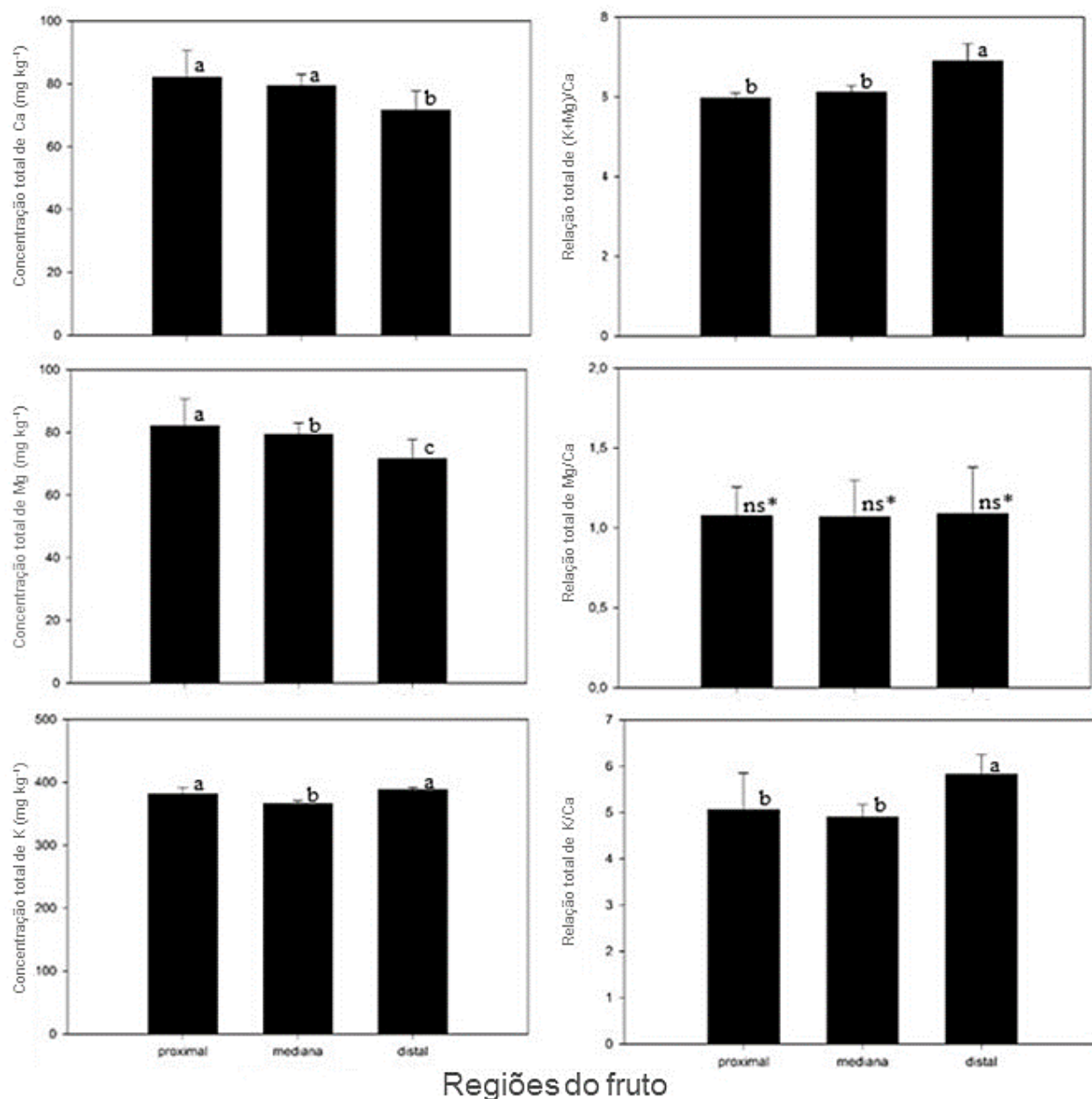
A relação Mg/Ca não diferiu entre as três regiões do fruto para o tecido de casca na fração total (Figura 10). No entanto, Amarante et al. (2006b), relacionando a composição mineral de maçãs 'Catarina' com a alta suscetibilidade ao BP que esta cultivar apresenta, constataram que a relação Mg/Ca no tecido de casca é o melhor atributo para discriminar maçãs 'Catarina' quanto à ocorrência de BP.

Quanto à análise da polpa na fração total, para o Ca, observou-se que, entre cortes, para a região proximal a concentração foi diferente para os três cortes, onde o 2 apresentou a maior concentração seguido dos cortes 4 e 3 (Figura 11). Para a mediana, a maior concentração foi constatada no corte 4, seguido dos cortes 3 e 2. O corte 4 da região mediana é a região mais próxima às sementes do fruto, o que pode justificar este alto concentração neste local. Em uma secção radial, as concentrações minerais de Ca são superiores no tecido de casca e no centro do fruto (próximo à semente), sendo inferiores na região do córtex (FERGUSON; WATKINS, 1983), o que fica evidente na região mediana. Nos cortes da região distal, o corte 2 apresentou a maior concentração em comparação ao 3 e 4, que não diferiram significativamente entre si. Para os cortes 2 e 3, a região proximal mostrou a maior concentração em relação as outras, e para os cortes 3 e 4, a região distal apresentou os menores valores.

Para o Mg, entre cortes na região proximal, o corte 3 apresentou a maior concentração, seguido do 2 e 4 (Figura 11). Nas regiões mediana e distal, o corte 4 foi o que demonstrou a maior concentração, seguidos dos cortes 2 e 3. Entre as regiões, os cortes 2 e 3 da região mediana apresentaram as menores concentrações, situação que se inverte para o corte 4. O K para a região proximal entre cortes apresentou as maiores concentrações nos cortes 2 e 3, que não diferiram significativamente. Para a região mediana, o corte 4 se mostrou maior que os demais e para a região distal, o maior valor observado foi para o corte 2, seguidos dos cortes 3 e 4 (Figura 11). Entre as regiões, o corte 3 mostrou um gradiente na concentração de K entre as regiões, sendo superior na região proximal.

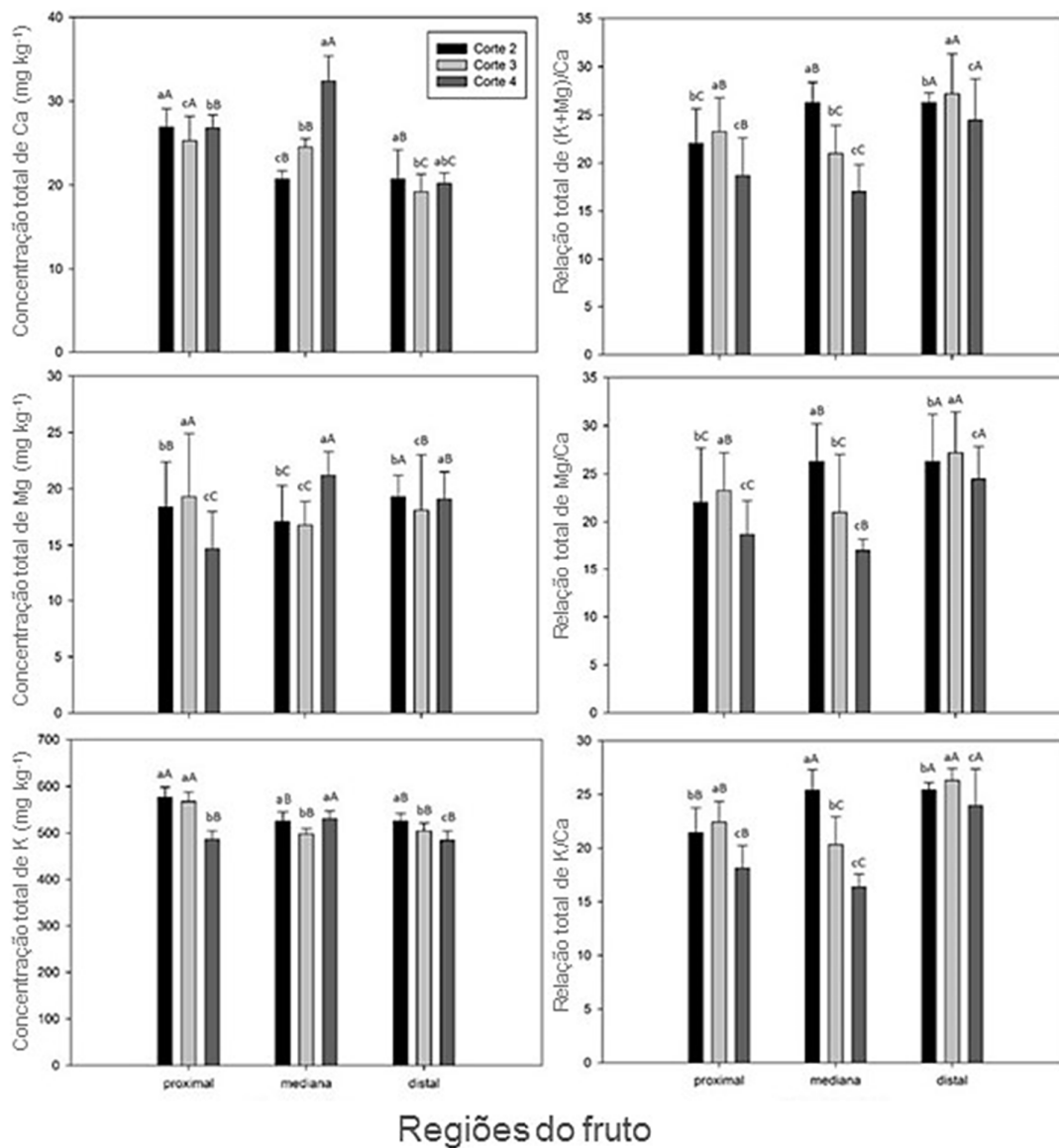
As relações Mg/Ca e (K+Mg)/Ca apresentaram valores diferentes entre os cortes nas regiões e entre as regiões (Figura 11), sendo que, para ambas relações, o corte 3 na região distal apresentou os maiores valores. A relação K/Ca apresentou valores diferentes entre regiões e entre cortes nas regiões, apresentando-se superior no corte 2 da região mediana e nos cortes 2 e 3 da região distal. Segundo Miqueloto et al. (2011b), a relação K/Ca na polpa e na casca constituem o melhor atributo para discriminar maçãs 'Catarina' quanto à ocorrência de BP. Além disto, diversos autores afirmam que a presença do

distúrbio está diretamente relacionada à baixa concentração de Ca, em associação aos elevados valores das relações Mg/Ca, K/Ca e (K+Mg)/Ca na região distal dos frutos (FERGUSON; WATKINS, 1989; ARGENTA; SUZUKI, 1994; NACHTIGALL; FREIRE, 1998; PAVICIC et al., 2004; AMARANTE et al., 2006a; AMARANTE et al., 2006b).



**Figura 10** – Concentrações totais de Ca, Mg e K (mg kg<sup>-1</sup>), e as relações (K+Mg)/Ca, Mg/Ca e K/Ca, nas regiões proximal, mediana e distal no tecido de casca,

em maçãs 'Gala'. Barras verticais seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si (Tukey;  $p < 0,05$ ).



**Figura 11** – Concentrações totais de Ca, Mg e K (mg kg<sup>-1</sup>), e as relações (K+Mg)/Ca, Mg/Ca e K/Ca, nas regiões proximal, mediana e distal, cortes 2, 3 e 4 do tecido de polpa de maçãs 'Gala'. Barras verticais seguidas de mesma letra minúscula entre cortes na mesma região e maiúsculas entre regiões para um mesmo corte, não diferem entre si (Tukey;  $p < 0,05$ ).



Quanto a análise dos teores solúveis no tecido de casca, o Ca se mostrou igualmente superior nas regiões proximal e mediana, obtendo o menor valor para a região distal (Figura 12), apresentando comportamento semelhante ao do Ca na fração total (Figura 10). Amarante et al. (2013a), estudando sobre métodos de amostragem, verificou que em frutos com a presença de “bitter pit” as concentrações de Ca na fração solúvel do tecido de casca na região distal são inferiores quando comparados a frutos sem o distúrbio. As concentrações de Mg foram superiores na região distal dos frutos, bem como as concentrações de K, que não diferiram significativamente entre as regiões proximal e mediana. As relações  $(K+Mg)/Ca$ ,  $Mg/Ca$  e  $K/Ca$  apresentaram comportamento semelhante ao K e Mg, mostrando-se superiores na região distal do fruto, não diferindo entre as demais regiões.

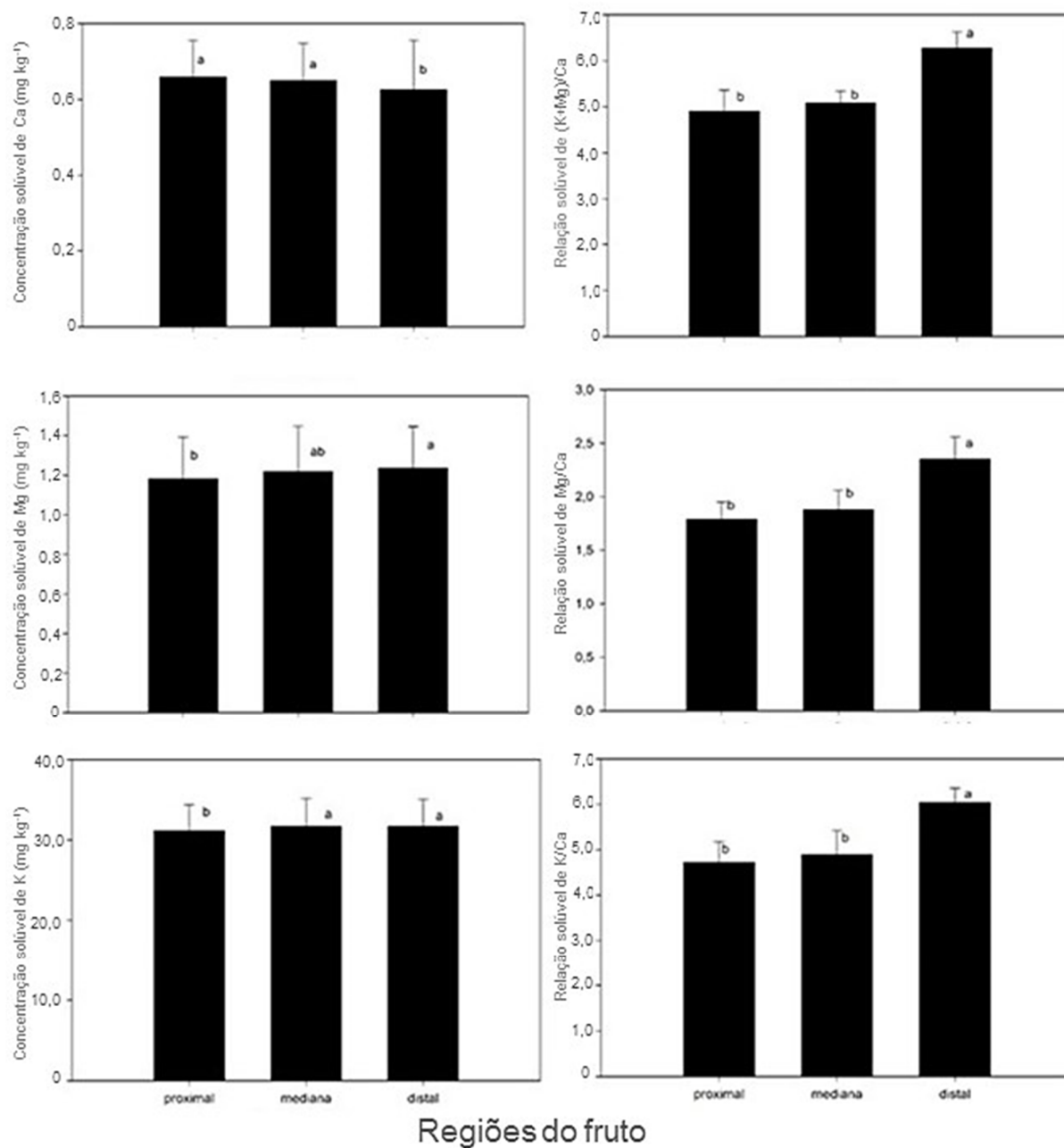
Para a polpa as concentrações solúveis de Ca, para as três regiões, apresentaram-se superiores no corte 4 (Figura 13), referente à região próxima ao carpelo do fruto, que possui concentrações maiores de nutrientes. Para o corte 2, o Ca obteve maiores concentrações na região proximal, distal e mediana, respectivamente. Para o corte 3, a maior concentração encontrada foi na região mediana, seguida pelas regiões proximal e distal. De acordo com Manganaris et al. (2007), na fração solúvel encontra-se o Ca fisiologicamente ativo, encontrado geralmente na forma trocável, adsorvido às pectinas e proteínas solúveis ou associado a ácidos orgânicos, cloretos e nitratos, o qual é capaz de prevenir o aparecimento dos sintomas de BP. Entretanto, com o amadurecimento dos frutos, o vacúolo celular aumenta seu tamanho (GILLASPY et al., 1993; HO; WHITE, 2005), ocasionando um aumento na demanda de Ca intracelular, pois a concentração de Ca no citoplasma é geralmente menor do que a encontrada no vacúolo e, quando o movimento de Ca para o vacúolo excede a velocidade à qual Ca é fornecido a uma célula, os sintomas da deficiência de Ca tornam-se aparentes (HO; WHITE, 2005).

Para o Mg, na região proximal, os maiores valores encontrados foram para os cortes 2 e 3 que não diferiram significativamente entre si (Figura 13). Para a região mediana, a concentração maior foi observada para o corte 4, seguido do 2 e 3. Na região distal, a maior concentração foi obtida pelo corte 2. Observou-se que para os cortes 2 e 3 a concentração de Mg foi superior na região distal do fruto. Quanto ao K na região proximal, os cortes 2 e 3 não diferiram entre si, porém foram superiores ao corte 4. As regiões mediana e distal apresentaram o mesmo comportamento, com maior concentração no corte 2, seguido pelos cortes 4 e 3, respectivamente. A região distal apresentou os maiores valores para os três cortes.

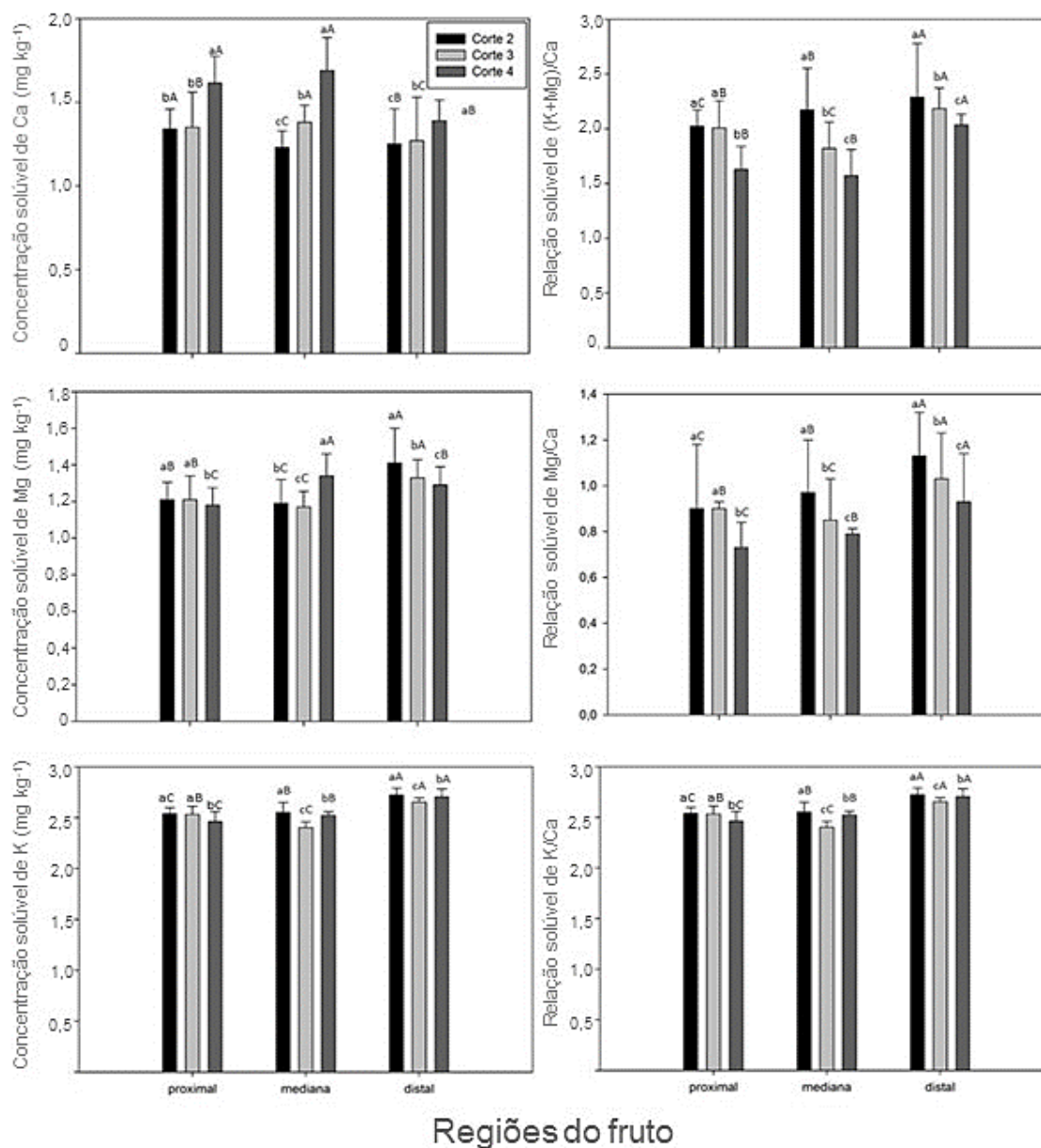
Na fração solúvel da polpa a relação  $(K+Mg)/Ca$ , na região proximal, as relações foram superiores nos cortes 2 e 3 (Figura 13). Para a região mediana e distal observou-se um declínio das relações entre os cortes 2, 3 e 4, respectivamente. Para a relação  $Mg/Ca$ , na região proximal os cortes 2 e 3 apresentaram-se igualmente superiores ao corte 4, sendo que a região mediana e distal seguiram o mesmo comportamento de declínio observado para  $(K+Mg)/Ca$ . Quanto a relação  $K/Ca$ , observou-se valores decrescentes nas relações, do corte 2 ao 4, diminuindo a medida que se aproximavam da região carpelar, para as três regiões do fruto. Além disto, entre regiões, apresentaram os maiores valores na região distal dos frutos para todos os cortes (Figura 13), diferindo significativamente das demais regiões.

Altas relações  $(K+Mg)/Ca$ ,  $Mg/Ca$  e  $K/Ca$  nos tecidos do fruto são indicativos à predisposição do “bitter pit”, pois íons de  $Mg$  e  $K$  são antagonistas ao  $Ca$ , por competirem por seus sítios de ligação nas membranas celulares. Entretanto, esses nutrientes não desempenham a mesma função fisiológica do  $Ca$ , que estabelece ligações iônicas com o fosfato na cadeia fosfolipídica da membrana plasmática, garantindo a integridade da mesma. (FREITAS et al., 2010). O  $Ca$  é quase que totalmente transportado via xilema (HANGER, 1979; TAIZ; ZEIGER, 2006), que perde sua funcionalidade com o crescimento do fruto. Já o  $Mg$  e o  $K$  são transportados via floema, que permanece funcional durante todo o crescimento do fruto, garantindo o suprimento destes nutrientes durante toda a fase de crescimento e desenvolvimento do fruto (DRAŽETA et al., 2004), enquanto o  $Ca$  é transportado em quantidades insignificantes via floema (NAIFF, 2007). Por este motivo, a perda da funcionalidade do xilema reduz a taxa de absorção e acúmulo de  $Ca$  no fruto, ocasionando desestruturação e colapso das membranas celulares, gerando os sintomas de BP (AMARANTE et al., 2013b).

De acordo com Amarante et al. (2013a), na fração total observam-se concentrações maiores de  $Ca$  e  $Mg$  no tecido de casca em relação à polpa, e este fato se inverte na fração solúvel, assim como o observado neste experimento (Figuras 10, 11, 12 e 13). Isto porque parte destes minerais podem estar complexados à parede celular, que se encontra em maior quantidade no tecido de casca, resultando em baixas concentrações na fração solúvel (AMARANTE et al., 2013a).



**Figura 12** – Concentrações solúveis de Ca, Mg e K (mg kg<sup>-1</sup>), e as relações (K+Mg)/Ca, Mg/Ca e K/Ca, nas regiões proximal, mediana e distal no tecido de casca, em maçãs ‘Gala’. Barras verticais seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si (Tukey; p<0,05).



**Figura 13** – Concentrações solúveis de Ca, Mg, K (mg kg<sup>-1</sup>) e as relações (K+Mg)/Ca, Mg/Ca e K/Ca nas regiões proximal (2, 3 e 4), mediana (2, 3 e 4) e distal (2, 3 e 4) no tecido de polpa em maçãs ‘Gala’. Barras verticais seguidas de mesma letra minúscula entre cortes na mesma região e maiúsculas entre regiões para um mesmo corte não diferem entre si (Tukey; p<0,05).

## 2.5.2. Experimento II

Os frutos que apresentaram sintomas visuais de BP tiveram maiores valores de AT e menores valores de pH em relação aos frutos sem a presença do distúrbio (Tabela 3). Estes resultados corroboram os resultados apresentados por Freitas et al. (2010). Segundo estes autores, devido à alta permeabilidade das membranas, apresentada por frutos com a presença de BP, pode haver a perda de água no fruto e, conseqüentemente, os teores de ácido málico aumentam. Frutos com BP apresentam, em geral, maior expressão de complexos proteicos, como bombas de prótons, responsáveis por gerar um gradiente eletroquímico na membrana do vacúolo, aumentando o transporte de Ca para o interior desta organela (FREITAS et al., 2010; MIQUELOTO et al., 2011a, 2011b). Frutos com a presença do distúrbio acumulam íons de hidrogênio e ácido málico dentro do vacúolo, causando redução de pH, embora ainda não se possa afirmar que este efeito seja causa ou resposta aos sintomas de BP nos frutos. As bombas de prótons, localizadas na membrana plasmática, são responsáveis pelo transporte de íons de hidrogênio do citosol para o apoplasto, o que aumenta a concentração de  $H^+$  no exterior da célula, tendo por conseqüência a redução do pH e aumento de acidez nos frutos (FREITAS et al., 2010).

Os teores de SS não diferiram entre frutos com e sem BP (Tabela 3). Resultados semelhantes foram reportados por Miqueloto et al. (2011a; 2011b) em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’, e por Freitas et al. (2010), em maçãs ‘Granny Smith’.

Quanto à firmeza de polpa, frutos com BP apresentaram menores valores em relação aos frutos sem a presença do distúrbio (Tabela 3). Os mesmos resultados foram apresentados por Freitas et al. (2010), que associou a firmeza de polpa inferior em frutos com BP à baixa concentração de Ca. A firmeza de polpa está associada à pressão de turgor da célula e pelo poder cimentante da lamela média na parede celular (MIGNANI et al., 1995). O Ca também está associado à redução da atividade de enzimas que degradam polissacarídeos de parede celular, permitindo a manutenção da firmeza da polpa nos frutos (WHITE; BROADLEY, 2003). Portanto, frutos com deficiência de Ca tendem a apresentar menor firmeza de polpa. Além disto, esta baixa firmeza de polpa pode estar associada ao pH reduzido dos frutos (MIQUELOTO 2011a, 2011b). Em tomates, há um aumento na expressão e atividade de enzimas poligalacturonases durante o período de amadurecimento dos frutos, que atuam em baixo pH, favorecendo a síntese e atividade desta enzima, colaborando para a perda de firmeza de polpa (HUBER et al., 2001).

**Tabela 3** – Valores de acidez titulável (AT), teores de sólidos solúveis (SS), pH e firmeza de polpa em maçãs ‘Gala’ sem e com “bitter pit”, armazenadas por cinco meses à  $0 \pm 1$  °C e UR 90-95%.

“Bitter pit”	AT (% de ácido málico)	SS (°Brix)	pH	Firmeza de polpa (N)
Sem	0,23	12,2	3,8	83,9
Com	0,29	12,5	3,6	76,7
Probabilidade*	0,0128	ns	0,0225	0,0136
CV (%)	2,77	2,54	8,61	5,89

\*Probabilidade para a diferença entre frutos sem e com “bitter pit”. ns: não significativo ( $p > 0,05$ )

Quanto à análise mineral da fração total, para o tecido de casca na região distal, houve diferença significativa nas concentrações de Ca e para a relação Mg/Ca, entre frutos sem e com BP, o mesmo não ocorrendo para o Mg (Tabela 4). Resultados semelhantes foram apresentados por Amarante et al. (2013) em ‘Fuji’, e Miqueloto (2011a; 2011b) em ‘Catarina’ e ‘Fuji’, analisando maçãs sem e com a presença de BP.

Para o tecido de polpa, houve diferença altamente significativa para o atributo de Mg e significativa para relação Mg/Ca, entre frutos sem e com BP (Tabela 4). Entretanto, as concentrações de Ca para o tecido de polpa não diferiram entre frutos sem e com BP. Ferguson e Watkins (1989) sugerem que o BP está relacionado a baixas concentrações de Ca no fruto, em associação a altas concentrações de Mg, K, N, e a alta relação  $(Mg+K+N)/Ca$ . Devido à similaridade iônica, Mg e K podem ocupar os sítios de ligação do Ca. Porém, segundo Freitas et al. (2010), Mg e K não desempenham a mesma função fisiológica do Ca, dando origem aos sintomas do distúrbio.

Para a fração solúvel, analisou-se apenas o tecido da polpa, devido à insuficiência amostral do tecido de casca, impossibilitando sua análise. As concentrações de Ca não diferiram entre frutos sem e com a presença do distúrbio. Já os atributos de Mg e a relação Mg/Ca foram significativamente diferentes, sendo que frutos com a presença de BP apresentaram valores maiores para ambos atributos (Tabela 4). Estes resultados corroboram com os obtidos por Amarante et al. (2013a).

Durante o amadurecimento dos frutos, as células tendem a aumentar o volume do vacúolo (GILLASPY et al., 1993; HO; WHITE, 2005). Em função disto, ocorre um aumento na demanda de Ca intracelular, pois a concentração de Ca no citoplasma é geralmente menor do que a encontrada no vacúolo e, quando o movimento de Ca para o

vacúolo excede a velocidade à qual Ca é fornecido a uma célula, os sintomas da deficiência de Ca tornam-se aparentes (HO; WHITE, 2005). No vacúolo, o Ca encontra-se complexado à fenóis, oxalatos e fosfatos (WHITE; BROADLEY, 2003), estando, portanto, indisponível para desempenho de suas funções fisiológicas. Na fração solúvel encontra-se o Ca fisiologicamente ativo, encontrado geralmente na forma trocável, adsorvido às pectinas e proteínas solúveis ou associado a ácidos orgânicos, cloretos e nitratos (MANGANARIS et al., 2006 e 2007), o qual é capaz de prevenir o aparecimento dos sintomas de BP.

**Tabela 4** – Concentrações de Ca e Mg ( $\text{mg kg}^{-1}$  de massa fresca) e valores da relação Mg/Ca, nas frações total e solúvel, da casca e da polpa em maçãs ‘Gala’, em frutos com e sem a presença de “bitter pit” (BP), armazenadas por cinco meses à  $0 \pm 1$  °C e UR 90-95%.

Atributo mineral	Sem BP	Com BP	Probabilidade*	CV (%)
Fração total				
Casca				
Ca	57,2	30,8	0,0005	6,4
Mg	38,4	48,0	ns	12,3
Mg/Ca	0,7	1,5	0,025	15,4
Polpa				
Ca	18,1	18,0	ns	10,7
Mg	12,7	19,0	<0,0001	20,2
Mg/Ca	0,1	1,1	0,0111	21,6
Fração solúvel				
Polpa				
Ca	12,8	12,3	ns	18,5
Mg	9,9	12,0	0,0152	14,4
Mg/Ca	1,4	1,7	0,0078	13,1

\*Probabilidade para a diferença entre frutos sem e com “bitter pit”. ns: não significativo ( $p > 0,05$ )

Os dados de atributos de maturação e atributos minerais foram submetidos à análise canônica discriminante (ACD), por apresentarem diferenças significativas entre frutos sem e com a presença de BP. O parâmetro utilizado para discriminar frutos sem e com BP foi a taxa discriminante paralela (TDP), conforme sugerido por Amarante et al. (2006a). A TDP foi obtida através do produto entre os coeficientes canônicos padronizados (CCP) e os coeficientes de correlação canônica ( $r$ ).

Através do teste estatístico para análise multivariada (Wilk's Lambda) foi possível constatar diferenças entre os atributos minerais (para a fração total, com  $p < 0,0001$ , e para a fração solúvel, com  $p = 0,0268$ ), para frutos sem e com BP na FCD<sub>1</sub> (dados não apresentados). Porém, não foi constatada diferença entre os atributos físico-químicos ( $p = 0,4889$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Coeficiente canônico padronizado (CCP), correlação canônica ( $r$ ) e coeficiente da taxa de discriminação paralela (TDP) para a função canônica discriminante 1 (FCD<sub>1</sub>), referente aos atributos físico-químicos [sólidos solúveis (SS), pH, acidez titulável (AT) e firmeza de polpa], em maçãs 'Gala' armazenadas por cinco meses à  $0 \pm 1$  °C e UR 90-95%.

Atributo	CCP	$r$	TDP
SS (°Brix)	0,67	-0,43	-0,28
pH	0,48	1,08	0,52
AT (%)	0,89	2,69	2,39
Firmeza de polpa (N)	0,62	0,6	0,37

A ACD para análise mineral dos tecidos de casca e polpa, nas frações total e solúvel, da região distal dos frutos, demonstra que os atributos que melhor discriminam frutos sem e com BP é a relação Mg/Ca na fração solúvel do tecido da polpa e o Mg total na polpa, por apresentarem alta TDP (Tabela 6). Diversos autores concordam que a relação Mg/Ca é mais eficiente na segregação de frutos sem e com o distúrbio fisiológico (FERGUSON; WATKINS, 1989; ARGENTA; SUZUKI, 1994; NACHTIGALL; FREIRE, 1998; AMARANTE et al., 2006b). Além disto, a quantificação das concentrações minerais na fração solúvel dos frutos, ao invés das concentrações totais, apresenta maior relação com a ocorrência de distúrbios fisiológicos e, de acordo com Pavicic et al. (2004) e Amarante et al. (2014), maçãs com menores concentrações de Ca, associada a alta relação Mg/Ca na fração solúvel apresentam maior ocorrência de BP (AMARANTE et al., 2013a).



**Tabela 6** - Coeficiente canônico padronizado (CCP), correlação canônica ( $r$ ) e coeficiente da taxa de discriminação paralela (TDP) para a função canônica discriminante 1 (FCD1) para os atributos minerais de Ca e Mg e a relação Mg/Ca, nas frações total e solúvel da polpa, e fração total da casca, na região distal de maçãs ‘Gala’, armazenadas por 150 dias à  $0 \pm 1$  °C e UR 90-95%.

Atributo mineral	CCP	$r$	TDP
		Fração total	
		Casca	
Ca	0,77	4,45	3,42
Mg	0,43	-3,14	-1,35
Mg/Ca	0,98	1,63	1,60
		Polpa	
Ca	0,86	-1,35	-1,161
Mg	0,99	6,79	6,72
Mg/Ca	0,78	1,25	0,97
		Fração solúvel	
		Polpa	
Ca	0,26	-2,22	-0,58
Mg	0,67	2,89	1,94
Mg/Ca	0,98	6,91	6,78

## 2.6 CONCLUSÕES

1. Existe um gradiente radial de concentração de Ca total no fruto, onde é superior no tecido de casca, seguido pela região próxima ao carpelo e córtex. Além disto, tanto na fração total como solúvel, a concentração de Ca é inferior na região distal no tecido de casca.
2. A região distal apresenta os maiores valores das relações Mg/Ca, K/Ca e (K+Mg)/Ca na casca e polpa, nas frações total e solúvel.
3. Frutos com “bitter pit” apresentaram maior acidez titulável e menores valores de pH e firmeza de polpa em relação a frutos sem o distúrbio, bem como altas relações Mg/Ca na casca e na polpa para a fração total e na polpa para a solúvel.
4. A ACD mostrou que a relação Mg/Ca solúvel na polpa e o Mg total na polpa promoveu melhor segregação entre frutos sem e com “bitter pit”.

### 3 CONCLUSÕES GERAIS

A alta suscetibilidade ao “bitter pit” que maçãs ‘Catarina’ apresentam pode estar associada a baixa concentração de Ca principalmente na região distal do fruto, quando comparado à ‘Fuji’, além das elevadas relações  $N/Ca$ ,  $(K+Mg)/Ca$  e  $(K+Mg+N)/Ca$  também nesta região. Além disto, a ‘Catarina’ apresenta maior tamanho de fruto, com aumento exponencial de massa fresca mais acelerado em relação a ‘Fuji’, o que leva a uma diluição no conteúdo mineral do fruto.

Este trabalho demonstrou que as concentrações de Ca na fração total são superiores no tecido de casca em relação à polpa, ocorrendo o inverso na fração solúvel. Este mesmo nutriente apresentou um gradiente radial de concentração na fração total, apresentando-se superior no tecido de casca, seguido pela região próxima ao carpelo e região do córtex. Além disto, tanto na fração total como solúvel, a concentração de Ca é inferior na região distal no tecido de casca.

A região distal apresenta os maiores valores das relações  $Mg/Ca$ ,  $K/Ca$  e  $(K+Mg)/Ca$  na casca e polpa, nas frações total e solúvel, que servem como indicativos para a predisposição à ocorrência de “bitter pit”.

De acordo com a análise multivariada (ACD), os dois atributos com maior poder discriminante para frutos sem e com “bitter pit” em maçãs ‘Gala’ são, respectivamente, a relação  $Mg/Ca$  na fração solúvel e o  $Mg$  na fração total, ambos para o tecido de polpa, comprovando que a análise do Ca apenas não é um bom indicativo da predisposição ao distúrbio, fato já observado por outros autores.

De acordo com o presente estudo, a análise mineral apenas das concentrações totais não se fez satisfatória para a predição da ocorrência de “bitter pit” em maçãs. No entanto, a determinação das concentrações solúveis dos nutrientes, utilizando apenas a região distal dos frutos, apresentou-se como uma metodologia eficaz, que pode ser utilizada complementarmente à metodologia tradicional, aumentando a efetividade dos resultados.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o “bitter pit” seja um dos distúrbios fisiológicos mais estudados em maçã, sua causa ainda não é totalmente compreendida. Sabe-se que a presença do distúrbio está associada a diversos fatores, incluindo clima, manejo do pomar e nutrição mineral. Para trabalhos futuros, propõe-se relacionar a ocorrência do distúrbio com fatores climáticos ao longo dos anos, observando as temperaturas médias, presença ou ausência de deficiência hídrica, tipos de poda e raleio realizados e adubação mineral, bem como analisando as concentrações minerais de frutos, realizados em estádios específicos de crescimento e desenvolvimento dos frutos, a fim de determinar uma escala de risco para a ocorrência do distúrbio, tendo como base dados coletados por vários anos.

Sabe-se que, com senescência do fruto durante o período de frigoconservação, a tendência do Ca é ser aprisionado no vacúolo, onde complexa-se irreversivelmente a compostos orgânicos, reduzindo a concentração de Ca na forma livre no citosol e por consequência diminuindo a concentração solúvel (fisiologicamente ativo para desempenho de função) deste nutriente, aumentando o risco da ocorrência de “bitter pit”. Acredita-se que este aprisionamento ocorra até os 90 dias de armazenamento, o que torna interessante avaliar as concentrações solúveis de Ca e dos demais nutrientes semanal ou quinzenalmente até atingirem os 90 dias de armazenamento, possibilitando traçar curvas da dinâmica destes nutrientes, a fim de determinar em qual período de armazenamento ocorre a maior translocação do Ca para o vacúolo e consequente aprisionamento.

A metodologia de determinação das concentrações solúveis dos minerais tem se mostrado eficiente na predisposição de “bitter pit”, além de ser rápida e barata, dispensando a utilização de reagentes tóxicos ao homem. No entanto, esta metodologia ainda utiliza métodos destrutivos para quantificação mineral, impossibilitando o consumo destes frutos. Portanto, sugere-se a elaboração de metodologias não-destrutivas para determinação mineral, que já são utilizadas para outras finalidades com eficiência, como por exemplo a utilização da espectroscopia de ressonância magnética para a avaliação de injúrias mecânicas em goiaba e do infravermelho próximo para qualidade físico-química em frutos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPM. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃS. **Caderno Estatístico**. 2004. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em: 24 dez. 2014.

AMARANTE, C.V.T.; ARGENTA, L.C.; BASSO, C.; SUZUKI, A. Composição mineral de maçãs ‘Gala’ e ‘Fuji’ produzidas no Sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.47, p.550-560, 2012.

AMARANTE, C.V.T.; CHAVES, D.V.; ERNANI, P.R. Análise multivariada de atributos nutricionais associados ao “bitter pit” em maçãs ‘Gala’. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p.841-846, 2006a.

AMARANTE, C.V.T.; CHAVES, D.V.; ERNANI, P.R. Composição mineral e severidade de “bitter pit” em maçãs ‘Catarina’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, p.51-54, 2006b.

AMARANTE, C.V.T.; STEFFENS, C.A.; ERNANI, P.R. Identificação pré-colheita do risco de ocorrência de “bitter pit” em maçãs ‘Gala’ por meio da infiltração com magnésio e análise dos teores de cálcio e nitrogênio nos frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, p. 27-34, 2010.

AMARANTE, C.V.T. do; ERNANI, P.R.; CHAVES, D.V. Fruit infiltration with Magnesium is a feasible way to predict bitter pit susceptibility in ‘Gala’ apples grown in Southern Brazil. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 682, p.1271-1274, 2005.

AMARANTE, C.V.T.; ERNANI, P.R.; STEFFENS, C.A.; ARGENTA, L.C. O teor de cálcio na casca é indicativo da suscetibilidade ao “bitter pit” em maçãs “Fuji”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, p.180-186, 2011.

AMARANTE, C.V.T.; ERNANI, P.R.; STEFFENS, C.A. Predição de “bitter pit” em maçãs ‘Gala’ por meio da infiltração dos frutos com magnésio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, p.962-968, 2009.

AMARANTE, C.V.T.; MIQUELOTO, A.; FREITAS, S.T.; STEFFENS, C.A.; SILVEIRA, J.P.G.; CORRÊA, T.R. Fruit sampling methods to quantify calcium and magnesium contents to predict bitter pit development in ‘Fuji’ apple: A multivariate approach. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.157, p.19-23, 2013a.

AMARANTE, C.V.T.; MIQUELOTO, A.; STEFFENS, C.A.; SANTOS, A.; ARGENTA, L.C. Changes in xylem functionality during apple fruit development: Implications on calcium concentration and incidence of bitter pit. **Acta Horticulturae**, Kuala Lumpur, v.1012, p.135-140, 2013b.

ARGENTA, L.C.; SUZUKI, A. Relação entre teores minerais e frequência de bitter pit em maçã cv. Gala no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.16, p.267-277, 1994.

BASSO, C. Distúrbios fisiológicos. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis, 2002, p.609-636.

BENAVIDES, A.; RECASENS, I.; CASERO, T.; SORIA, Y.; PUY, J. Multivariate analysis of quality and mineral parameters on “Golden Smoothee” apples treated before harvest with calcium and stored in controlled atmosphere. **Food Science and Technology International**, London, v.8, p.139-146, 2002.

BONDADA, B.R.; MATTHEWS, M.A.; SHACKEL, K.A. Functional xylem in the post-veraison grape berry. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.56, p.2949-2957, 2005.

BRACKMANN, A.; BENEDETTI, M.; STEFFENS, C. A.; MELLO, A. M. de. Efeito da temperatura e condições de atmosfera controlada na armazenagem de maçãs ‘Fuji’ com incidência de pingo de mel. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, p.37-45, 2002.

BUSH, D.S. Calcium regulation in plants cells and its role in signaling. **Plant Physiology**, Brighton, v.46, p.95-122. 1995.

CAMILO, A. P.; DENARDI, F. Cultivares: Descrição e comportamento no Sul do Brasil. In: **A cultura da Macieira**. Florianópolis, p.113-168, 2002.

CORREA, T.R.; STEFFENS, C.A.; AMARANTE, C.V.T.; TANAKA, H.; STANGER, M.C.; BRACKMANN, A.; ERNANI, P.R. Composição mineral, qualidade e degenerescência de polpa de maçãs 'Fuji' em diferentes porta-enxertos durante armazenamento em atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, p.33-40, 2012.

CRUZ-CASTILLO, J.G.; GANESHANANDAM, S.; MACKAY, B.R.; LAWES, G.S.; LAWOKO, C.R.O.; WOOLLEY, D.J. Applications of canonical discriminant analysis in horticultural research. **HortScience**, Alexandria, v.29, p.1115-1119, 1994.

DRAŽETA, L.; LANG, A.; HALL, A.J.; VOLZ, R.K. Causes and effects of changes in xylem functionality in apple fruit. **Annals of Botany**, Oxford, v.93, p.275-282, 2004.

DRAZETA, L.; LANG, A.; MORGAN, L.; VOLZ, R.; JAMESON, P.E. Bitter pit and vascular function in apples. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 564, p.387-392, 2001.

FERGUSON, I.B.; WATKINS, C.B. Cation distribution and balance in apple fruit in relation to calcium treatments for bitter pit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.19, p. 301-310, 1983.

FERGUSON, I.B.; WATKINS, C.B. Bitter-pit in apple fruit. **Horticultural Reviews**, New York, v.11, p.289-355, 1989.

FREITAS, S.T.; AMARANTE, C.V.T.; LABAVITCH, J.M.; MITCHAM, E.J. Cellular approach to understand bitter pit development in apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.57, p.6-13, 2010.

FREITAS, S.T.; McELRONE, A.J.; SHACKEL, K.A.; MITCHAM, E.J. Calcium partitioning and allocation and blossom-end rot development in tomato plants in response to whole-plant and fruit-specific abscisic acid treatments. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.65, p.235-247, 2014.

GILLASPY, G.; BEN-DAVID, H.; GRUISSEM, W. Fruits: a developmental perspective. **The Plant Cell**, Waterbury, v.5, p.1439-1451, 1993.

HANGER, B.C. The movement of calcium in plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v.10, p.171-193, 1979.

HARKER, F.R.; VENIS, M.A. Measurement of intracellular and extracellular free calcium in apple fruit cells using calcium-selective microelectrodes. **Plant Cell Environment**, Logan, v.14, p.525-530, 1991.

HO, L. C.; WHITE, P. J. A cellular hypothesis for the induction of blossom-end rot in tomato fruit – A review. **Annals of Botany**, Oxford, v.95, p.571-581, 2005.

HUBER, D.J.; KARAKURT, Y.; JEONG, J. Pectin degradation in ripening and wounded fruits. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v.13, p.224-241, 2001.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA)**. 2009. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?z=t&o=11&i=P>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

JAMES, H.J.; JOBLING, J.J. Contrasting the structure and morphology of the radial and diffuse flesh browning disorders and CO<sub>2</sub> injury of 'Cripps Pink' apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.53, p.36-42, 2009.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2. Ed. Rio de Janeiro:Guanabara, 2008. 431p.

LANG, A.; RYAN, K.G. Vascular development and sap flow in apple pedicels. **Annals of Botany**, Oxford, v.74, p.381-388, 1994.

LEWIS, T.L.; MARTIN, D. Longitudinal distribution of applied calcium, and of naturally occurring calcium, magnesium, and potassium in Merton apple fruits. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v.24, p.363-371, 1973.

MANGANARIS, G.A.; VASILAKAKIS, M.; DIAMANTIDIS, G.; MIGNANI, I. Effect of in-season calcium applications on cell wall physicochemical properties of nectarine fruit (*Prunus persica* var. nectarine Ait. Maxim) after harvest or cold storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Québec, v.86, p.2597-2602, 2006.

MANGANARIS, G.A.; VASILAKAKIS, M.; DIAMANTIDIS, G.; MIGNANI, I. The effect of postharvest calcium application on tissue calcium concentration, quality attributes, incidence of flesh browning and cell wall physicochemical aspects of peach fruits. **Food Chemistry**, New York, v.100, p.1385-1392, 2007.

MIGNANI, I.; GREVE, L.C.; BEN-ARIE, R.; STOTZ, H.U.; LI, C.; SHACKEL, K.A.; LABAVITCH, J.M. The effects of GA<sub>3</sub> and divalent cations on aspects of pectin metabolism and tissue softening in ripening tomato pericarp. **Plant Physiology**, Oxford, v.93, p.108-115. 1995.

MEHERIUK, M.; PRANGE, R.K.; LIDSTER, P.D.; PORRITT, S.W. **Postharvest disorders of apples and pears**. Ottawa: Agriculture and Agri-Food, Canadá, 1994. 67p.

MIQUELOTO, A. **Atributos minerais e aspectos fisiológicos relacionados com a ocorrência de “bitter pit” em maçãs.** 2011. 56 p. Mestrado (Dissertação em Produção Vegetal – Área: Biologia e Tecnologia Pós-Colheita) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Lages, 2011a.

MIQUELOTO, A.; AMARANTE, C.V.T.; STEFFENS, C.A.; SANTOS, A.; MIQUELOTO, T.; SILVEIRA, J.P.G. Atributos fisiológicos, físico-químicos e minerais associados à ocorrência de “bitter pit” em maçãs. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, p.689-696, 2011b.

MIQUELOTO, A.; AMARANTE, C.V.T.; STEFFENS, C.A.; SANTOS, A.; MITCHAM, E. Relationship between xylem functionality, calcium content and the incidence of bitter pit in apple fruit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 165, p. 319-323, 2014.

NACHTIGALL, G.R.; DECHEN, A.R. Seasonality of nutrients in leaves and fruit of apple trees. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.63, p.493-501, 2006.

NACHTIGALL, G.R.; FREIRE, C.J.S. Previsão da incidência de “bitter pit” em maçãs através dos teores de cálcio em folhas e frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.20, p.158-166, 1998.

NAIFF, A.P.M. **Crescimento, Composição mineral e sintomas visuais de deficiências de macronutrientes em plantas de cv. Jungle King.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, 2007. 77p.

NEUWALD, D.A.; KITTEMANN, D.; STREIF, J. Possible prediction of physiological storage disorders in 'Braeburn' apples comparing fruit of different orchards. **Acta Horticulturae**, Wellington, n. 796, p. 211-216, 2008.

PAVICIC, N.; JEMRIC, T.; KURTANJEK, Z.; COSIC, T.; PAVLOVIC, I.; BLASKOVIC, D. Relationship between water-soluble Ca and other elements and bitter pit occurrence in 'Idared' apples: A multivariate approach. **Annals of Applied Biology**, Londres, v.145, p.193-196, 2004.

PERRING, M.A. Incidence of bitter pit in relation to the calcium content in apples: Problems and paradoxes, a review. **Journal of the Science Food and Agriculture**, Washington, v.37, p.591-606, 1986.



PETRI, J.L.; LEITE, G.B.; COUTO, M.; FRANCESCETTO, P. Avanços na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, Volume Especial, p.48-56, 2011.

PLIETH, C. Plant calcium signaling and monitoring: Pros and cons and recent experimental approaches. **Protoplasma**, Nova York, v.218, p.1-23, 2001.

SAKS, Y.; SONEGO, L.; BEN-ARIE, R. Senescent breakdown of Jonathan apples in relation to the water-soluble calcium content of the fruit pulp before and after storage. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, p.615-618, 1990.

SANDERS, D.; BROWNLEE, C.; HARPER, J.F. Communicating with calcium. **The Plant Cell**, Waterbury, v.11, p.691-706, 1999.

SAS INSTITUTE. **Getting started with the SAS learning edition**. Cary: SAS Institute, 2002. 200p.

SAURE, M.C. Calcium translocation to fleshy fruit: its mechanism and endogenous control. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.105, p.65-89, 2005.

SESTARI, I. **Avaliação de métodos para predição do potencial de ocorrência de “bitter pit” em maçãs**. 2006. 86p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria: Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4<sup>th</sup> ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 793p.

TAYLOR, M.D.; LOCASCIO, S.J. Blossom-end rot: A calcium deficiency. **Journal of Plant Nutrition**, Florida, v. 27, p. 123-139, 2004.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise do solo, plantas e outros materiais**. 2. Ed. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

TERBLANCHE, J.H. An integrated approach to orchard nutrition and bitter pit control. **The Deciduous Fruit Grower**, Wenatchee, v.31, p.501-513, 1981.

VANG-PETERSEN, O. Calcium nutrition of apple trees: a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.12, p.1-9, 1980.

WHITE, P.J.; BROADLEY, M.R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, London, v.92, p.487-511, 2003.