

# EL PROBLEMA DE "PALO NEGRO" EN VIDES Y SU RELACION CON ALTOS NIVELES DE PUTRESCINA Y BAJO CONTENIDO DE POTASIO<sup>1</sup>

## The waterberry stem necrosis disorder in grapes and its relationship with elevated putrescine levels and low potassium content

Rafael Ruiz S.<sup>2</sup> y Stella Moyano A.<sup>2</sup>

### SUMMARY

In order to evaluate a possible association between putrescine and a physiological disorder known as bunch stem necrosis (waterberry), rachis (main axis and branches) from clusters of two seedless varieties, with and without symptoms were collected. Rachis were separated in three parts: necrotic apical tissue, intermediate and basal tissue containing the peduncle. The analysis showed significantly higher levels of putrescine (two to ten times) in necrotic rachis compared with normal tissues. In the same way putrescine levels increased from the basal area (apparently healthy) toward the necrotic apex. Ammonium content also increased several times in affected rachis but there was no detection of any consistent increment in the direction of necrotic area. Consequently, it appears that putrescine would be more involved with the problem of bunch stem necrosis than ammonium. Mineral analysis showed low K levels in tissues from necrotic clusters. The relationship between low K level and putrescine accumulation is discussed.

**Key words:** table grapes, waterberry, putrescine, potassium, nutritional disorders.

### INTRODUCCION

La putrescina es una poliamina ampliamente distribuida en todos los tejidos de las plantas. Debido a que en bajas concentraciones estimula el crecimiento y/o la diferenciación, se la considera un regulador del desarrollo (Smith, 1985, Galston y Kaur-Sawhney, 1988; Sagee y Lovatt, 1991). Sin embargo, si su concentración sobrepasa ciertos límites, ejerce una acción tóxica y puede producirse como efecto final, necrosis en los tejidos (Black, 1968). Experimentos más recientes indicarían que la acumulación de putrescina como respuesta al estrés, sería la causa del síndrome de toxicidad que la acompaña, y no una defensa de la planta contra el daño (Tiburcio y otros, no publicado, citado por Galston y Kaur-Sawhney, 1988).

La putrescina está inserta en el metabolismo del N y actualmente se sabe que una de las rutas bioquímicas que conducen a su formación se origina en la descarboxilación de arginina (Smith, 1985; Adams, Franke y Christensen, 1990). Las relaciones que se piensa están involucradas de acuerdo a los autores anteriores, se indica en el Esquema 1.

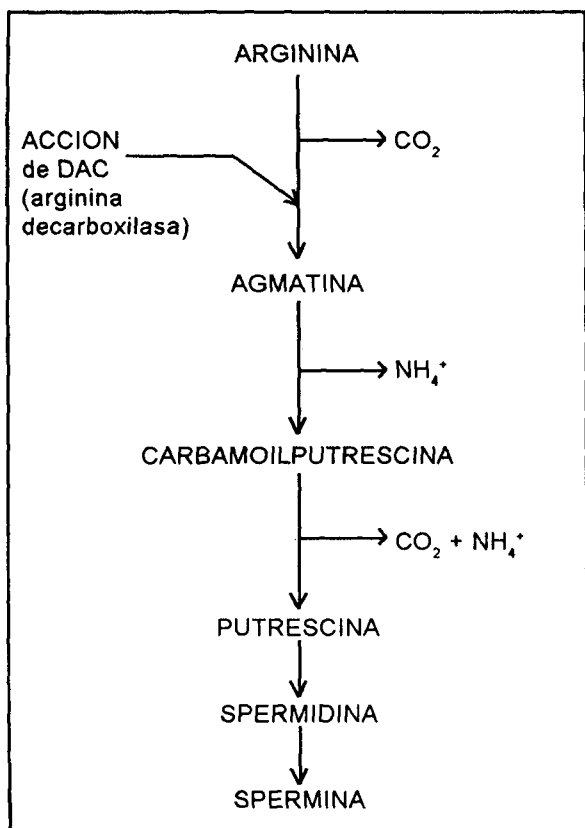
La enzima clave, en esta secuencia, la cual conduce a la formación de putrescina, es la arginina descarboxilasa (DAC, en inglés). Esta enzima se activa en deficiencia de K (Smith, 1963 y 1985). De acuerdo a esto es de esperar una importante conexión entre el metabolismo del N y del K.

En experiencias de fertilización potásica en uva de mesa, realizadas en el Valle de Aconcagua por varios años, se ha observado una menor incidencia de palo negro en plantas que han mejorado (aún cuando no solucionado), el problema de déficit de potasio (Ruiz, 1985). Esta relación entre la deficiencia de potasio y palo negro, también ha sido mencionada en el país, en revistas de divulgación científica (Vieira, 1986). Uniendo lo anterior al hecho que la arginina se concentra en los racimos durante la maduración (Nassar y Kliewer, 1966), se estudió la posibilidad que la putrescina pudiese estar involucrada en el problema de palo negro en vides. El estudio comprendido abarcó también a otros nutrientes o iones que se han relacionado a palo negro, en otros estudios, tales como: calcio, magnesio (Feucht, Forsche y Porstendorfer, 1975; González, 1977, en Chile), calcio (Lang, 1993), nitrógeno total y amonio (Christensen y Boggero, 1985); amonio (Silva, Gil y Rodríguez, 1986), nitratos y amonio incrementados vía sombreadamiento (Pérez y Galilea, 1989).

<sup>1</sup>Recepción de originales: 19 de abril de 1994.

Premio Mastor de la Sociedad Agronómica de Chile otorgado al mejor trabajo presentado en el 43 Congreso Agronómico de la Sociedad Agronómica de Chile. 18 al 21 de noviembre de 1993.

<sup>2</sup>Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.



ESQUEMA 1. Relaciones N-K-putrescina.

## MATERIALES Y METODOS

Durante la temporada 1991/92 se muestrearon racimos con y sin palo negro, de parronales variedad Beauty Seedless y Flame Seedless, en plena producción, en cuarteles vecinos a un parronal ubicado en el Valle de Aconcagua. El manejo anterior y actual es similar en ambos cuarteles. El muestreo se efectuó cuando se observaron los primeros racimos afectados del desorden (tonalidad café y necrosis del raquis con pérdida de turgencia de las bayas). Para un mejor estudio de la relación causa-efecto, los raquis (eje principal y laterales), de racimos con y sin palo negro fueron separados en tres sectores designados arbitrariamente, como: sector basal, intermedio y terminal. El sector "terminal" se refiere a aquél con necrosis visible. Generalmente comprende el tejido ubicado en la parte distal del raquis (eje principal) y las ramificaciones laterales del mismo. El "intermedio" es el sector sin necrosis visible, inmediatamente adyacente a los anteriores, y el "basal" corresponde al resto del racimo, también sin necrosis visible en la porción más alejada del sector necrosado.

Los raquis de los racimos sanos fueron separados de igual forma que los racimos afectados. Para mayor claridad los segmentos de raquis considerados, se presentan en la Figura 1.

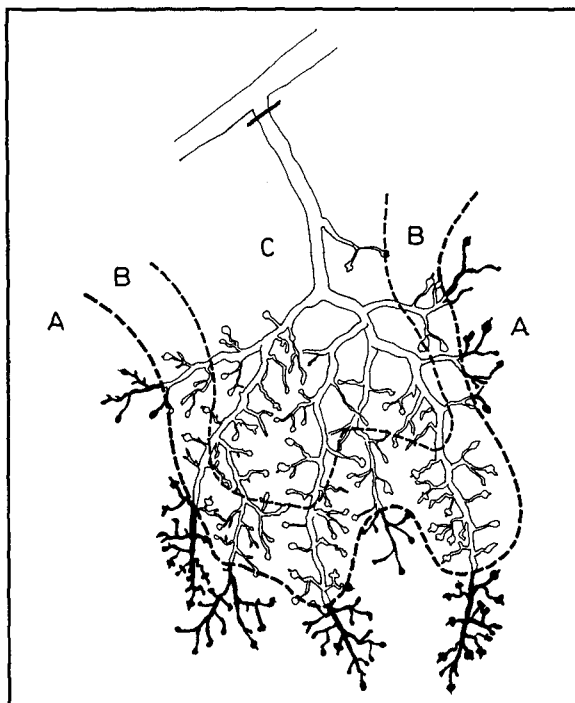


FIGURA 1. Segmentos de raquis muestreados. A: Sector terminal, con necrosis; B: Sector intermedio; C: Sector basal.

FIGURE 1. Rachis segment sampled. A: Terminal sector with necrosis; B: Central lateral axis; C: Central main axis.

Las determinaciones consideraron un número mínimo de tres repeticiones, cada una de las cuales contempló de 4 a 5 racimos. A éstos, inmediatamente después de seccionados de la planta, se les desprendió las bayas y se separaron los diferentes sectores del escobajo de acuerdo a lo señalado anteriormente. El material se depositó en cajas refrigeradas (aproximadamente a 4 °C) e, inmediatamente de llegado al laboratorio, se secó a 42 °C, se molió y tamizó a 60 mesh.

Los análisis efectuados fueron: a) N total de acuerdo al método Kjeldahl; b) amonio, por destilación con arrastre de vapor de acuerdo a la metodología de Jackson y Farrington (1986); la recuperación de amonio a muestras adicionadas de estándares fue sobre el 90%; c) arginina, de acuerdo a la metodología de Gilboe y Williams (1956). La presencia de pigmentación en los extractos de raquis en "buffer" citrato, fue eliminada mediante acetato de plomo básico saturado, como lo indican Taylor y Van den Ende (1969), pero modificando la concentración (1 ml de acetato para 20 ml de extracto).

Con esta modificación, la recuperación de arginina a muestras adicionadas de estándares fue sobre el 90%; d) Los minerales (P, K, Ca y Mg) fueron determinados a partir de muestras calcinadas, seguidas de una digestión ácida, filtradas y diluidas. Ca y Mg se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica, K por emisión y P por colorimetría; e) Para la determinación de poliaminas, las muestras (0,5 g) se sometieron a una extracción con ácido perclórico frío, agitación en hielo y centrifugado a 10.000 rpm, por 30 minutos a 4 °C (Flores y Galston, 1982). La derivatización (benzoilación) de las poliaminas en los extractos, se efectuó de acuerdo a la metodología indicada por Redmond y Tseng (1979), con las modificaciones indicadas por Friedman y otros (1986). Posteriormente, las muestras preparadas fueron sometidas a un análisis de putrescina mediante HPLC, para lo cual se usó un cromatógrafo Perkin-Elmer, bomba binaria 250, loop de 10 µl, columna PE/HS-3 C-18. El detector fue un espectrofotómetro PE UV-VIS LC-290, longitud de onda 254 nm, integrador PE LCI-100. Como fase móvil se usó metanol-agua (60:40) filtrada por membrana Millipore 0,22 µm, desgasificada con vacío y ultrasonido, a un flujo de 1,2 ml/min, hasta isocrático.

Los resultados estadísticos consideraron comparación de medias mediante la Prueba de "t" de Student y ANDEVA, y comparación de medias mediante el procedimiento de Duncan, cuando corresponde.

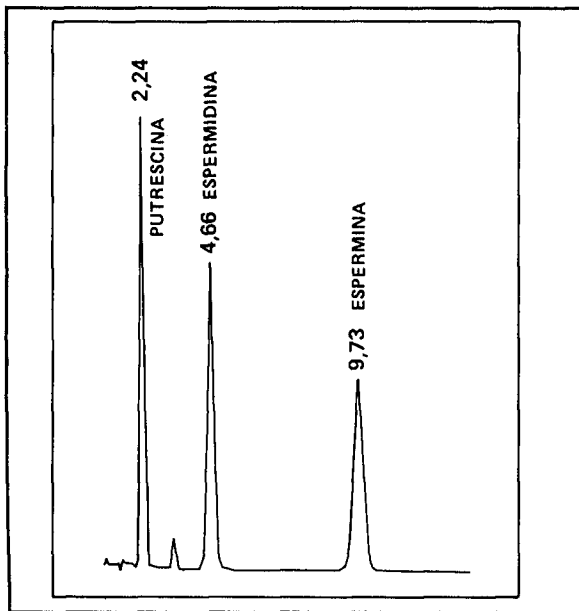


FIGURA 2. Cromatograma de la mezcla de estándares. El punto máximo a 2,24 minutos es putrescina, a 4,66 es espermidina y a 9,73 es espermina.

FIGURE 2. Chromatograms of mixed standards. Peak at 2,24 minutes is putrescine, at 4,66 is spermidine and at 9,73 is spermine.

RESULTADOS

Poliaminas

En la Figura 2 se presenta el cromatograma de la mezcla de estándares correspondiente a putrescina, espermidina y espermina benzoilados. Estas dos últimas poliaminas se han incluido por su eventual participación, atendiendo a la relación secuencial con putrescina (Esquema 1). En la Figura 3, a manera de ejemplo, se indican los cromatogramas obtenidos a partir de extractos benzoilados de raquis de racimos 'Beauty Seedless', con y sin palo negro. La concordancia de los tiempos de retención con los de los estándares, indican que las determinaciones en las muestras corresponden efectivamente a las poliaminas en estudio. Los niveles comparativos de poliaminas en diferentes sectores de raquis, con y sin palo negro, se presentan en la Figura 4.

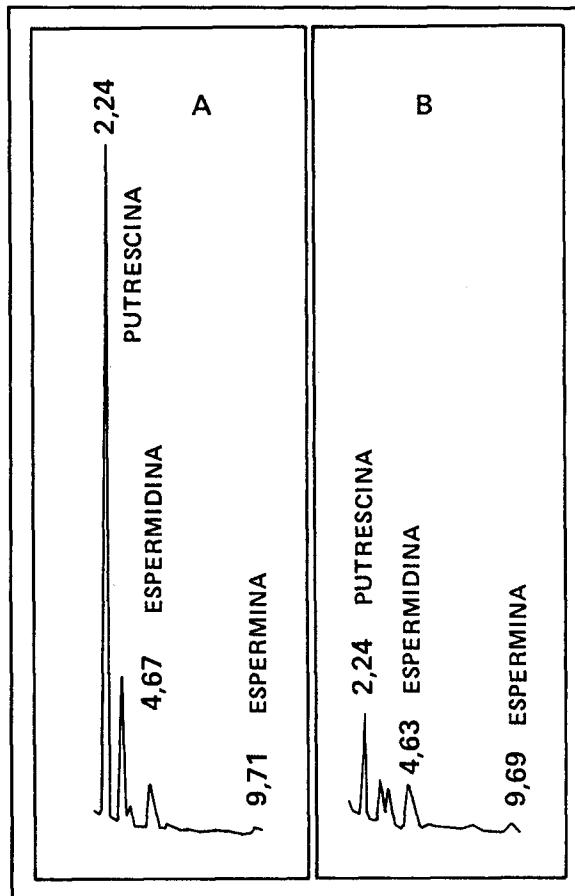


FIGURA 3. Cromatogramas de extractos benzoilados de raquis, provenientes de racimos con palo negro (A) y sin palo negro (B).

FIGURE 3. Chromatograms of benzoilated extracts in rachis coming from clusters including or absent in waterberry.

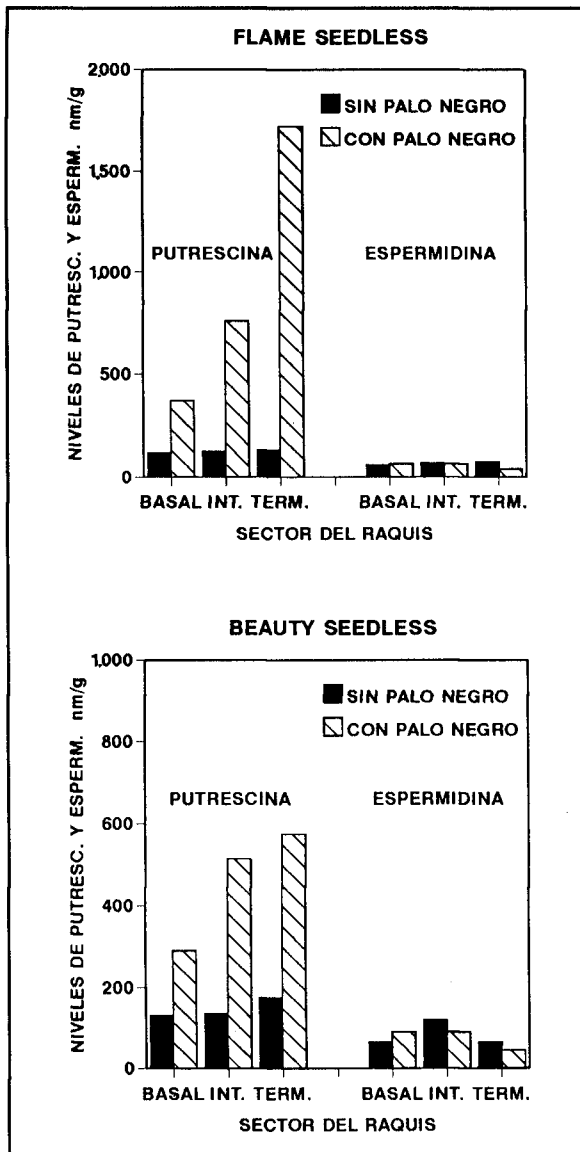


FIGURA 4. Niveles de putrescina y espermidina en raquis de racimos con y sin palo negro.

FIGURE 4. Putrescine and spermidine levels on rachis from clusters including or absent in waterberry.

Se observa que putrescina aumenta fuertemente en los diferentes sectores de tejidos provenientes de racimos con palo negro respecto de los sanos, en las dos variedades. También se advierte un aumento considerable (especialmente en 'Flame Seedless'), de putrescina desde el sector basal del raquis, hacia el terminal con necrosis. Este aumento no se observa en los tejidos provenientes de racimos sanos. Espermidina se presenta en bajas concentraciones y no aparece relacionado con el problema en estudio. Espermina no se presenta debido a la pequeña cantidad detectada (4 a 30 nm/g). Las

diferencias obtenidas para putrescina son altamente significativas ( $P \leq 0,01$ ), en todos los sectores comparados en ambas variedades.

**Amonio**

En ambas variedades los tejidos de raquis de racimos con palo negro presentan un tenor de amonio muy superior ( $P \leq 0,01$ ), al de los racimos sanos (Figura 5). Sin embargo, en ninguna de las variedades se advierte un aumento del amonio en la dirección del necrosado, es decir desde el sector aparentemente sano (basal) al terminal con necrosis. También se advierten diferencias varietales importantes en la concentración de amonio. En especial llama la atención el hecho de que el nivel de amonio del sector terminal de raquis 'Flame Seedless' (con necrosis), tiene una concentración de amonio inferior a la del sector basal de 'Beauty Seedless' sin problema de palo negro.

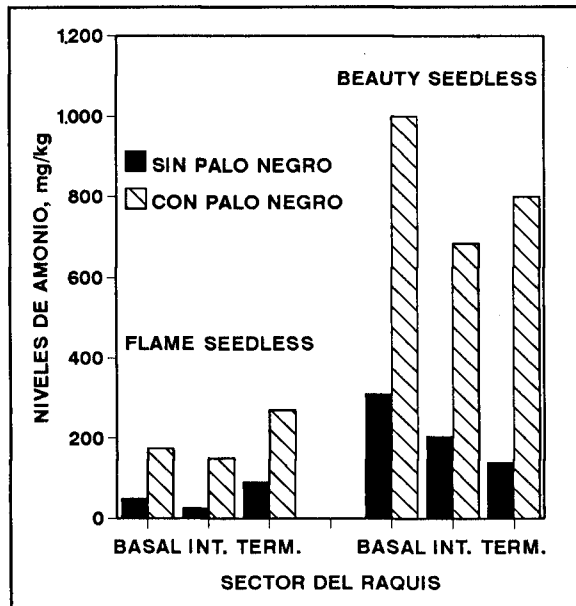


FIGURA 5. Niveles de amonio (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) en raquis de racimos con y sin palo negro.

FIGURE 5. Ammonium levels (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) on rachis from clusters including or absent in waterberry.

**Potasio**

La concentración de potasio de los diferentes sectores de raquis con palo negro de 'Flame Seedless' o 'Beauty Seedless', son significativamente más bajos ( $P \leq 0,01$ ) que el nivel de los mismos en raquis de racimos sanos (Figura 6). También se observa que estos niveles descienden desde el sector basal al terminal, tanto en los racimos sanos como afectados.

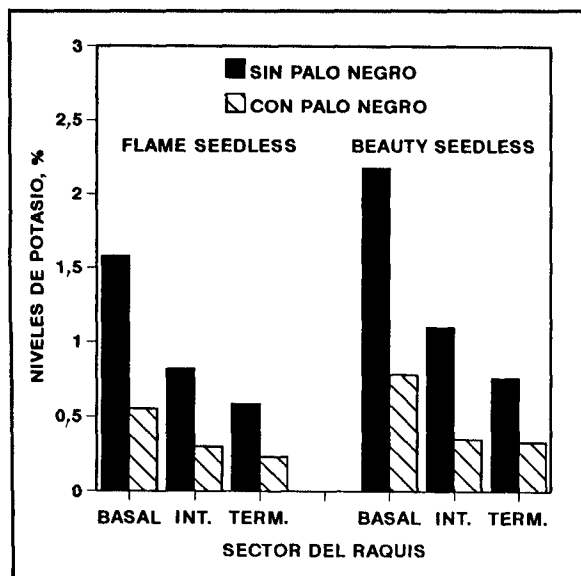


FIGURA 6. Niveles de potasio (K) en raquis de racimos con y sin palo negro.

FIGURE 6. Potassium levels on rachis from clusters including or absent in waterberry.

### Arginina

En la concentración de arginina medida en los raquis, el nivel de este aminoácido es superior en todos los sectores de raquis ( $P \leq 0,05$ ), provenientes de racimos afectados de palo negro, exceptuando el sector terminal de 'Flame Seedless', en el cual no se detectaron diferencias significativas (Figura 7).

### Otros nutrientes minerales

En los niveles comparativos de nitrógeno, fósforo, calcio y magnesio totales para las dos variedades, no se advierten diferencias consistentes en cuanto a la concentración de P y Ca (Cuadro 1). Sin embargo, existen mayores niveles de N y Mg en raquis con palo negro en 'Beauty Seedless', en todos los sectores del raquis, pero sin incremento en la dirección del necrosado. En 'Flame Seedless' también se observan mayores niveles de N y Mg en algunos sectores de los raquis con palo negro.

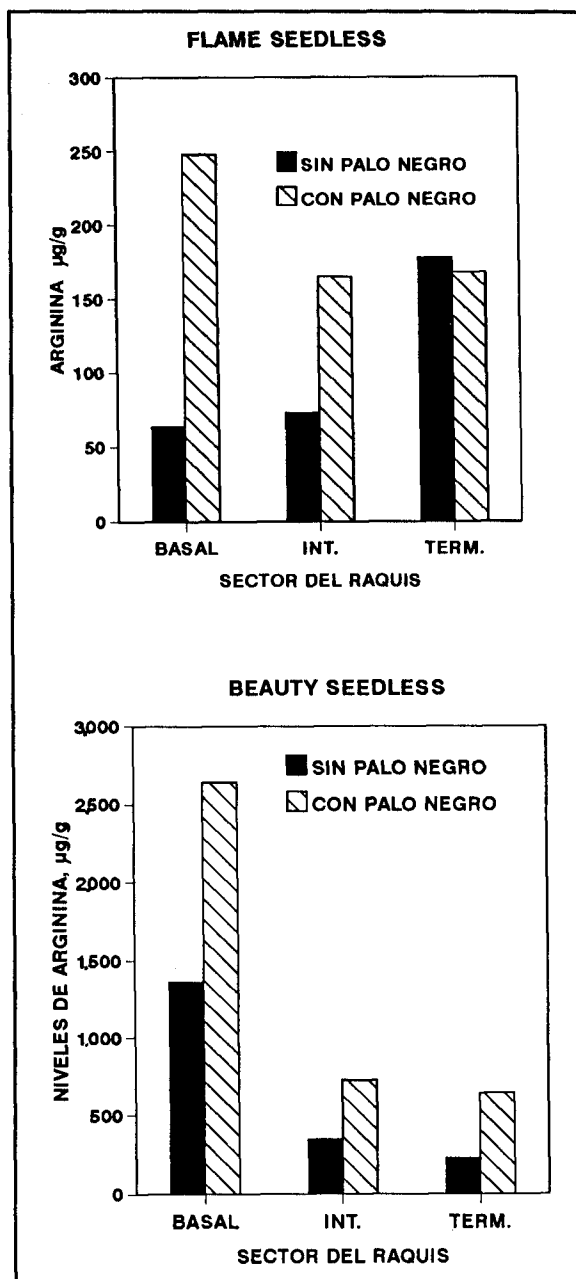


FIGURA 7. Niveles de arginina en raquis de racimos con y sin palo negro.

FIGURE 7. Arginine levels on rachis from clusters with and without waterberry.

**CUADRO 1. Niveles de N, P, Ca y Mg (%) en sectores de raquis, provenientes de racimos de las variedades Flame Seedless y Beauty Seedless con (C) y sin (S) palo negro**

**TABLE 1. N, P y Ca and Mg levels on rachis segments from Flame Seedless and Beauty Seedless varieties, clusters with (C) or without in waterberry (S)**

Sector raquis	N		P		Ca		Mg	
	C	S	C	S	C	S	C	S
<b>Flame Seedless</b>								
Basal	0,82 a <sup>1</sup>	0,59 b	0,09 a	0,13 a	0,6 a	0,5 a	0,09 a	0,06 b
Intermedio	0,68 a	0,53 b	0,09 a	0,09 a	0,5 a	0,5 a	0,06 a	0,04 a
Terminal	0,79 a	0,86 a	0,08 a	0,08 a	0,5 a	0,3 a	0,05 a	0,04 a
<b>Beauty Seedless</b>								
Basal	1,11 a	0,98 b	0,09 a	0,11 a	0,5 a	0,4 a	0,08 a	0,02 b
Intermedio	0,88 a	0,79 b	0,09 a	0,08 a	0,4 a	0,4 a	0,05 a	0,02 b
Terminal	0,91 a	0,70 b	0,09 a	0,07 a	0,4 a	0,3 a	0,05 a	0,02 b

<sup>1</sup>Cifras con la misma letra, en sentido horizontal, no difieren estadísticamente, según Prueba de Duncan (P > 0,05).

## DISCUSION

Tanto putrescina como amonio presentan niveles considerablemente más altos en los diferentes tejidos provenientes de racimos afectados con palo negro. Sin embargo, mientras los tenores de putrescina aumentan desde el sector aparentemente sano hacia el terminal necrosado o en proceso de necrosis, la concentración de amonio no muestra una tendencia consistente (figuras 4 y 5, respectivamente). Esto hace sospechar que el causante directo de la necrosis pudiera ser la concentración de putrescina, que se produce en esos tejidos, y no el amonio. Los niveles de espermidina y espermina son muy bajos en relación a putrescina y no se ven modificados en los raquis de racimos con palo negro respecto a los sanos, por lo cual puede descartarse su eventual participación en el desorden.

Los mayores tenores de amonio en los raquis de racimos con palo negro ha sido señalado como posible causa del necrosado de los mismos (Christensen y Boggero, 1985; Silva, Gil y Rodríguez, 1986). Sin embargo, el hecho que en algunos casos el necrosado se presenta con niveles de amonio, semejante a los de raquis sanos, hace dudar que sea el amonio el causante directo de la toxicidad (Ruiz y Moyano, 1993). Estos mayores niveles de amonio, en cambio, podrían explicarse por el hecho que la ruta bioquímica que genera putrescina a partir de arginina, implica desprendimiento de amonio en dos pasos (Esquema 1). Es decir, siempre que se forma putrescina existe desprendimiento de amonio, en los pasos bioquímicos anteriores. Si bien esta podría ser una explicación para el amonio

adicional que se observa en muestras con palo negro, no lo es obviamente para el total, que, como se advierte, es mayor en la variedad Beauty Seedless, con menores niveles de putrescina, en comparación a 'Flame Seedless'. Es suficientemente conocido que la ruta bioquímica para la incorporación de N inorgánico a orgánico implica necesariamente la reducción enzimática de nitratos a amonio como paso intermedio. Parte de este amonio y también amonio absorbido directamente desde el suelo, puede ser retranslocado desde las hojas y raíces hacia los frutos y explicarán las concentraciones allí detectadas.

Los mayores niveles de arginina detectados en los raquis de racimos con palo negro, serían concordantes con el esquema bioquímico que relaciona a arginina y putrescina; la presencia de mayor concentración de sustrato (arginina) condicionaría una mayor producción de putrescina. Sin embargo, el hecho que los mayores niveles de putrescina se presentan en la variedad con menores niveles de arginina, indicaría que existen otros factores condicionantes de la acumulación de putrescina, además de las posibles diferencias varietales, uno de estos sería la deficiencia relativa de potasio.

Los niveles de potasio son extraordinariamente más bajos en los diferentes sectores de raquis con palo negro respecto a los sanos, lo cual está de acuerdo con observaciones sobre menor incidencia de palo negro al aumentar los niveles de potasio en las hojas, producto de fertilización potásica (Ruiz, 1990). Otras investigaciones efectuadas en el extranjero (Christensen y Boggero, 1985) y también en el país (Silva, Gil y Rodríguez, 1986), señalan

menores niveles de potasio en raquis afectados de palo negro, pero no en todos los casos, lo cual podría deberse a que en la comparación basada en la cifra promedio de todo el raquis, las diferencias se atenúen y sean enmascaradas por la variabilidad intrínseca en estos muestreos.

La deficiencia de potasio se ha vinculado claramente con la elevación de los niveles de putrescina en otras especies (Richards y Coleman, 1952; Smith, 1963). Más precisamente, la deficiencia de potasio puede producir un incremento de hasta cinco veces en la actividad de arginina descarboxilasa, lo cual implica acumulaciones de putrescina (Smith, 1985). Los menores niveles de K detectados en los raquis con palo negro activarían la enzima arginina descarboxilasa, haciendo que el metabolismo del nitrógeno se desvíe hacia la acumulación de putrescina a partir de arginina, que es muy abundante en el momento en que ocurre el desorden, cual es el inicio de maduración (Nassar y Kliever, 1966). Este fenómeno sería más intenso en los sectores distales del raquis, hacia los cuales existe un menor movimiento de potasio, como lo prueban las concentraciones descendentes, desde la base al ápice tanto en los racimos sanos como en los afectados. De acuerdo con esto, el palo negro se manifiesta preferencialmente en estos sectores del racimo.

La mayor acidez, característica de las bayas de racimo con palo negro, estaría vinculada al deterioro físico del floema, el cual se presenta antes que el del xilema (Vieira, 1986). Esto afectaría el transporte de azúcares a las bayas, ya que es vía floema. Este transporte se vería dificultado aún más en deficiencia de potasio, por la demostrada acción

de este catión en el transporte mismo de azúcares a los sumideros. Esto último aparece refrendado en una investigación reciente que vincula las menores acumulaciones de azúcares con menores niveles de potasio en bayas provenientes de racimos con palo negro (Morrison y Iodi, 1990). De acuerdo a nuestros resultados estas diferencias en los niveles de potasio en las bayas, se gestarían mucho antes, durante el transporte mismo, en el sector basal del raquis. Es decir, una serie de hechos tanto a nivel de aspectos bioquímicos, como de experimentación y observación de campo, que estarían indicando una acción de potasio en este desorden. Sin embargo, antecedentes recientes informados por Adams, Franke y Christensen (1990), señalan la presencia de niveles altos de putrescina, capaces de producir necrosis en hojas sin que exista deficiencia de potasio, lo cual indicaría que hay otros factores, que, independientemente del déficit de K, pueden aumentar también los niveles de putrescina y producir toxicidad.

En resumen, los resultados de este trabajo estarían vinculando el problema de palo negro con anomalías en el metabolismo del nitrógeno, fundamentalmente acumulaciones de putrescina a nivel de raquis. Esta acumulación aparece vinculada a menores niveles de potasio y mayores de arginina en los raquis, lo cual concuerda con el esquema bioquímico que relaciona a arginina con putrescina a través de la actividad de arginina descarboxilasa, a su vez, activada en déficit de K. De acuerdo a los resultados obtenidos, los mayores niveles de amonio detectados en raquis de racimos afectados, podrían ser más bien una consecuencia que una causa de palo negro, como lo indica también Iba-cache (1990, 1991), para el caso de la necrosis del racimo floral.

## RESUMEN

Con el fin de evaluar la posible implicancia de la poliamina putrescina en el desorden fisiológico conocido como "palo negro", se colectaron raquis provenientes de racimos sanos y con palo negro de las variedades Beauty Seedless y Flame Seedless, en el Valle de Aconcagua.

Los raquis fueron separados en tres partes: el sector necrótico (terminal), el sector sano inmediatamente adyacente al anterior (intermedio) y el resto del raquis incluyendo el pedúnculo (sector basal). Los análisis indicaron niveles muy superiores de putrescina (2 a 10 veces), en los racimos afectados respecto a los sanos, en todos los sectores comparados. Por otra parte, en los racimos afectados se observó un incremento de los niveles de putrescina

desde el sector basal, sin síntomas, hacia el terminal necrosado.

Los niveles de amonio también aumentaron fuertemente en los diferentes sectores de los raquis afectados vs. los sanos, pero no se observó consistencia en cuanto al aumento del mismo en la dirección del necrosado, por lo cual, putrescina aparece más directamente vinculado al necrosado que caracteriza a este desorden. El análisis de minerales indicó niveles de K notoriamente más bajos en los diferentes sectores de raquis afectados respecto de los sanos. Se discute la relación entre estos menores niveles de K y el aumento de putrescina.

**Palabras claves:** uva de mesa, palo negro, putrescina, potasio, desordenes nutricionales.

## LITERATURA CITADA

- ADAMS, D., FRANKE, K. and CHRISTENSEN, L.P. 1990. Elevated putrescine levels in grape vine leaves that display symptoms of potassium deficiency. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 121-125.
- BLACK, C.A. 1968. *Soil-plant relationships*. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley and Sons. New York. 792 p.
- CHRISTENSEN, L.P. and BOGGERO, J.D. 1985. A study of mineral nutrition relationships of waterberry in Thompson Seedless. *Am. J. Enol. Vitic.* 36(1): 57-64.
- FEUCHT, W.E., FORSCHE, E. and PORSTENDÖRFER, J. 1975. Ermittlung der kalium - und calcium verteilung in trauben achsen von *Vitis vinifera* mit hilfe der röntgenstrahlenmikroanalyse am rasterelektronen mikroskop. *Vitis* 14: 190-7.
- FLORES, H.E. and GALSTON, A. W. 1982. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* 69: 701-706.
- FRIEDMAN, R., LEVIN, N. and ALTMAN, A. 1986. Presence and identification of polyamines in xylem and phloem exudates of plants. *Plant Physiol.* 82: 1.154-1.157.
- GALSTON, O. and KAUR-SAWHNEY, R. 1988. Polyamines as endogenous growth regulators. In: P.J. Davis (ed.). *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Kluwer Academic Press. p.: 280-295.
- GILBOE, D.D. and WILLIAMS, J.N. 1956. Evaluation of the sakaguchi reaction for quantitative determination of arginine. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 91: 535-536.
- GONZALEZ, IRMA. 1977. Experiencias en Chile sobre "palo negro" en vides. II. Simposio sobre manejo, calidad y fisiología de postcosecha de frutas. Facultad de Agronomía, U. de Chile. *Publicaciones Misceláneas Agrícolas* Nº 12. p.: 162-165.
- IBACACHE, ANTONIO. 1991. Necrosis del racimo floral en vides. *Investigación y Progreso Agropecuario La Platina* Nº 68: 13-15.
- IBACACHE, A.E. 1990. Girdling and shading effects on inflorescence necrosis and rachis composition of Pinot Noir grapevine. Oregon State University. 117 p. (M.S. Thesis).
- JACKSON, E. and FARRINGTON, D.S. 1986. *The analysis of agricultural materials*. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. A manual of the Analytical Methods used by the Agricultural Development and Advisory Service. Her Majesty's Stationary Office, Edit. London. 248 p.
- LANG, A. 1993. Xylem development and function in the grape peduncle: relations to bunch stem necrosis. *Vitis* 32: 15-22.
- MORRISON, J.C. and IODI, M. 1990. The influence of waterberry on the development and composition of thompson seedless grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 301-305.
- NASSAR, A.R. and KLIEWER, W. 1966. Free amino acids in various parts of *Vitis vinifera* at different stages of development. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 89: 281-294.
- PEREZ, J. y GALILEA, J.C. 1989. Influencia del sombreado sobre el palo negro y el nivel de nitrato y amonio en raquis, peciolo y láminas de vides. *Simiente* 60:164.
- REDMOND, J.W. and TSENG, A. 1979. High pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *Journal of Chromatography* 170: 479-481.
- RICHARDS, F.J. and COLEMAN, R.G. 1952. Occurrence of putrescine in potassium deficient barley. *Nature* 170: 460.
- RUIZ, RAFAEL. 1985. Calibraciones con potasio en vides del Valle de Aconcagua. En: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, E.E. La Platina, Programa Fertilidad de Suelos. Informe Técnico 1984/85. Santiago, Chile. p.: 10-14\*.
- RUIZ, R. 1990. Estudio de problemas de "palo negro". En: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, E.E. La Platina, Programa Fertilidad de Suelos. Informe Técnico 1989/90. Santiago, Chile, p.: 7\*.
- RUIZ S., RAFAEL y MOYANO A., STELLA. Relación entre niveles de amonio y la presencia de palo negro en racimos de uva de mesa. *Agricultura Técnica (Chile)* 53: 184-187.
- SAGEE, O. and LOVATT, C.J. 1991. Putrescine content parallels ammonia and arginine metabolism in developing flowers of the "Washington" Navel Orange. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116(2): 280-285.
- SILVA, H., GIL, G. y RODRIGUEZ, J. 1986. Desecación del escobajo de la vid (palo negro): ¿Un exceso de nitrógeno amoniacal? *ACONEX* 14: 9-10.
- SMITH, T.A. 1963. L-arginina carboxy-lyasa of higher plants and its relation to potassium nutrition. *Phytochem.* 2: 241-252.
- SMITH, T.A. 1985. Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 117-143.
- VIEIRA, A. 1986. El "palo negro", una enfermedad fisiológica de la vid, intrigante y escurridiza. *ACONEX* 12: 33-37.
- TAYLOR, B.K. and VAN den ENDE, B. 1969. The nitrogen nutrition of the peach tree. IV. Storage and mobilization of nitrogen in mature trees. *Aust. J. Agri. Res.* 20: 869-881.