

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE.  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO NEGRO.  
SEDE ATLANTICA.

**Carrera de Posgrado**



**Especialización En Frutos Secos**

***“Evaluación de poliaminas en la interacción  
planta - patógeno”***

Autor: Ing. Agr. Guillermo Martín Mantz

Director: Ing. Agr (Dr). Santiago Javier Maiale.

Codirector: Ing. Agr. (MSc) Pablo Esteban Viretto

Agosto 2019



**DEDICATORIA**

Les dedico esta tesis a mis padres por inculcarme los valores del trabajo, dedicación, honestidad, respeto y la permanente búsqueda de la propia superación.

A mis hermanos por acompañarme incondicionalmente en esta ardua tarea.

Nada de esto se podría haber logrado sin el apoyo de todos ellos.

**MUCHÍSIMAS GRACIAS !!!**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto tecnológico de Chascomus, (INTECH) por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar mis investigaciones.

Al Propietario del vivero La Pecana 197, Sr. Nicolás Pieroni, ubicado en la localidad de Lisandro Olmos, por la disponibilidad de plantas de pecan.

A la Ingeniera Agrónoma María Cristina Noelting, del Instituto Fito técnico de Lomas de Zamora, en Lavallo, por sus aportes y sus sugerencias.

A la Ingeniera Agrónoma Dra. Maria del Carmen Molina, Directora del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina.

Al Ingeniero Agrónomo Dr. Franco Rubén Rossi de la Unidad de Biotecnología 1 Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico (INTECH) de Chascomús, Provincia de Bs. As.

A Santiago Javier Maiale y Pablo Esteban Viretto por guiarme, aconsejarme y por todo el tiempo que han dedicado y su muy buena predisposición.

A la Dra. En Cs. Agrarias – Ingeniera Agrónoma Adriana M. Alippi Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) Unidad de Bacteriología Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP.

Al Ingeniero Agrónomo (MSc). Miguel Ángel Lavilla Jefe de trabajos prácticos de Fitopatología, (UNNOBA) y al Ingeniero Agrónomo (MSc – Phd). Antonio Ivancovich Profesor Asociado de Fitopatología, (UNNOBA), Pergamino, Provincia de Bs. As., Argentina

A la Ingeniera Agrónoma Dra. Julieta Saez Asistente de Docencia exclusiva, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Cinco Saltos, Provincia de Rio Negro, Argentina.

Al Ing. Agr. (MCs) Facundo José Quiroz, por su permanente predisposición a responder las consultas y sus valiosos aportes.

A los docentes y compañeros de la Especialidad de Frutos secos por la formación y acompañamiento recibido.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCION:.....	1
2. OBJETIVOS .....	2
2.1. OBJETIVO GENERAL .....	2
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	2
3. HIPÓTESIS .....	2
4. CAPÍTULO I: Marco teórico .....	4
5. CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
5.1. Sitio experimental .....	17
5.2. Diseño experimental y tratamientos. ....	18
6. CAPÍTULO III. Resultados y discusiones .....	22
7. REFLEXIONES FINALES:.....	30
8. BIBLIOGRAFIA:.....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Daño ocasionado por la sarna en pecan .....	1
Figura 2: Distribución geográfica del pecan .....	4
Figura 3: Cancro en rama de pecan.....	8
Figura 4. Colonia de Phomopsis sp en medio de cultivo agarizado.....	9
Figura 5: Sintomatología del ataque de Phomopsis ssp. en pecan .....	10
Figura 6: Poliaminas más comunes en plantas .....	12
Figura 7: Biosíntesis de poliaminas a partir de los aminoácidos ornitina y arginina .....	13
Figura 8: Catabolismo de poliaminas .....	14
Figura 9: Respuesta de las poliaminas ante un ataque de patógeno .....	15
Figura 10: Instituto tecnológico de Chascomus.....	17
Figura 11: Establecimiento, Vivero La Pecana.....	17
Figura 12: Invernaderos de Producción de plantas de Pecan Injertadas.....	18
Figura 13: Aspectos de la zona de inoculación a 24 días de realizarse.....	23
Figura 14: Cortes transversales del tallo en la zona de inoculación .....	24
Figura 15: Termografía del Canopeo .....	29

## Índice de tablas

Tabla 1: Valor nutricional de la nuez de pecan.....	6
---	---

## Índice de gráficos

Gráfico 1: Poliaminas totales .....	25
Gráfico 2: Contenido de Putrescina.....	26
Gráfico 3: Contenido de Poliaminas Putrescina, Espermidina y Espermina .....	26
Gráfico 4: Relación Put/Spd + Spm.....	27
Gráfico 5: Temperatura del canopeo.....	28



## 1. INTRODUCCION:

En la naturaleza las plantas interactúan con un gran número de agentes dañinos entre los que se destacan los microorganismos fitopatógenos, para los cuales los vegetales, luego del reconocimiento del organismo extraño, activan un gran número de respuestas con el objetivo de atenuar, disminuir y erradicar la propagación de la infección hacia los tejidos no infectados.

Dentro de los microorganismos fitopatógenos que afectan a las plantas se encuentran los hongos, virus y bacterias (Oerke, 2006), siendo los primeros los que más daños causan a los cultivos del pecan, como la sarna de pecan (Mantz, et al., 2008; figura 1).

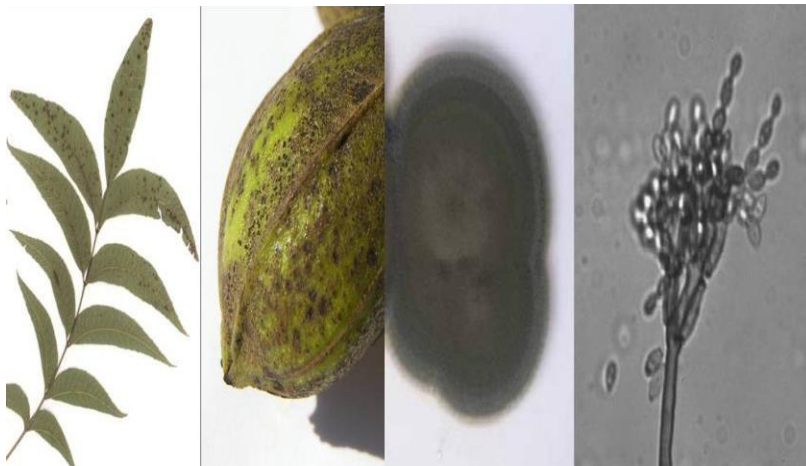


Figura 1: Daño ocasionado por la sarna en pecan.

Las plantas han desarrollado, a lo largo del tiempo, un sofisticado sistema de defensa de reconocimiento y respuestas a los organismos extraños, tales como respuestas hipersensibles, el aumento de la expresión de genes de defensa, la producción de compuestos antimicrobianos, la formación de lignina, y el estallido oxidativos. Es decir, la resistencia está dada por la combinación de barreras químicas y físicas, que pueden ser tanto preformadas como inducidas luego de la infección (Grant y Lamb, 2006), por lo que rara vez las enfermedades llegan a ser letales. Sin embargo el estrés causado durante las infecciones suele provocar importantes mermas en los rendimientos y por ende económicas (Oerke, 2006).



Uno de los mecanismos de defensas, son las poliaminas (PAs), las cuales son un grupo de reguladores del crecimiento, que a pesar de que no se han dilucidado su función exacta, se ha notado su presencia en procesos esenciales para la vida, como lo son la diferenciación celular y la proliferación de éstas.

En las plantas, como en el pecan, las PAs se pueden encontrar como monómeros, siendo estos solubles o como dímeros o polímeros insolubles. Por lo general estos compuestos conjugados integran componentes estructurales, como la pared celular, siendo esenciales para el normal crecimiento (Bagni y Torrigiani 1992).

En este trabajo se tratará de explicar las funciones metabólicas de las poliaminas en el pecan, dado el escaso conocimiento de cómo éstas interactúan con el vegetal para el normal crecimiento y desarrollo del mismo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la respuesta de los niveles de poliaminas en el cultivo del pecan en la interacción planta – patógeno y el agente causal de la cancrrosis *Phomopsis* sp., tanto en forma local como su respuesta sistémica.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar el rol de las poliaminas en el pecan durante la infección del patógeno.

Reconocer las lesiones causadas por el agente causal *Phomopsis* sp en el cultivo del pecan.

Identificar a través de las pruebas de patogenicidad, al principal agente asociado al agente causal *Phomopsis*.

## **3. HIPÓTESIS.**

De acuerdo a lo expuesto previamente en la introducción y en los objetivos propuestos se propone como hipótesis que los niveles de poliaminas

en las plantas de pecan se van modificando tanto en forma local como sistémica bajo la infección del agente causal de la cancrrosis *Phopmopsis* sp.

El trabajo de investigación se desarrolla en capítulos. En el primero se desarrollará un marco teórico con el objetivo de introducir brevemente la importancia del pecan, de las poliaminas y cómo estas últimas interactúan en la planta patógeno.

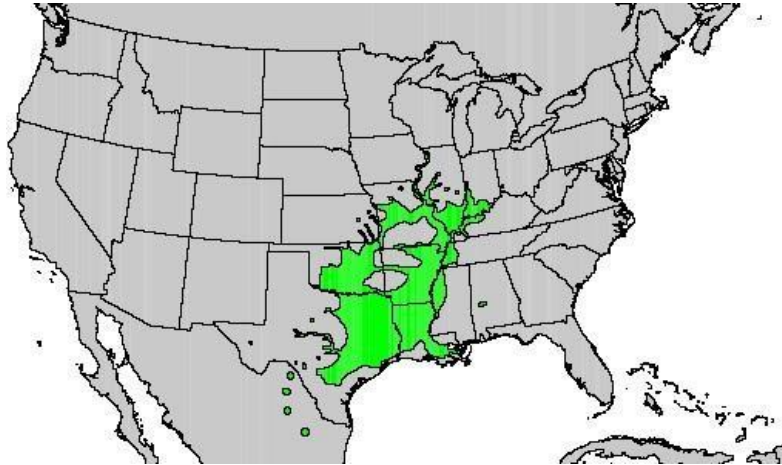
En el segundo capítulo se presenta el marco metodológico que se utilizó en este trabajo, en donde se detallan por un lado el sitio experimental en donde se desarrolló el ensayo y el diseño experimental en donde se describen detalladamente las técnicas utilizadas para este análisis.

En el último capítulo se exponen los resultados de esta investigación y se discuten los mismos. En primer lugar se describen cómo afectó el agente causal en forma local, para finalizar en su respuesta sistémica.

Finalmente se presentan las conclusiones y/o reflexiones finales arribadas a partir del trabajo de investigación. Se complementan con Anexos, gráficos y cuadros que permitirán una lectura adicional de la información a la hora de comprender lo desarrollado en el proceso de esta tesis.

#### 4. CAPÍTULO I: Marco teórico

El pecan, *Carya illinoensis* (Wangenheim) K. Koch, es originario de América del Norte, especialmente de la región sudeste de EEUU y norte de México y principalmente en los estados de Alabama, Arkansas, Louisiana y Texas. (Figura 2).



**Figura 2:** Distribución geográfica del pecan, Little, 1971

El pecan pertenece a la familia Juglandáceas, es una planta diclino monoica de gran porte, sus flores masculinas están dispuestas en amentos, mientras que las femeninas se localizan en pequeños números sobre las ramas nuevas. El fruto está formado por un embrión o semilla (parte comestible), un endocarpio liso y delgado (cáscara de la nuez) y un epicarpio y mesocarpio carnosos, los cuales se abren a la madurez en cuatro valvas longitudinales (Larre, 2010; Valentini, et al., 2010).

La raíz es pivotante, la cual durante el primer y segundo año de crecimiento se desarrolla en forma vertical. Posteriormente se transforma en semi fibrosa y se extiende en un radio que se ensancha horizontalmente.

Las hojas son caedizas compuestas, alternas, imparipinadas y están compuestas por 11 a 17 folíolos asimétricos, ovales, dentadas de pecíolo corto, opuestas de 6 a 12 cm de largo y de 3 - 6 cm de ancho (Parodi, 1972) y se necesitan de 12 hojas completas para sostener cada nuez.

Esta planta posee flores femeninas y masculinas en el mismo pie pero el período de liberación del polen y receptividad del estigma varía de acuerdo a

los cultivares y a las condiciones ambientales, visualizándose principalmente entre los meses de octubre y noviembre.

Esta planta se desarrolla mejor en suelos profundos, fértiles, no salinos y bien drenados. En suelos de textura muy gruesa el drenaje puede ser excesivo y la retención de humedad baja por lo cual se deberá prestar especial atención al riego, mientras que si los suelos son arcillosos se dificulta el crecimiento del sistema radicular, además de generarse las condiciones propicias para el desarrollo de enfermedades fúngicas.

Otro aspecto a tener en cuenta es el marco de plantación al cual distintos autores recomiendan no menor a 10 m entre plantas y 10 m entre filas lo que arroja una densidad de siembra de 100 plantas por hectárea.

Los cultivares a elegir es otro aspecto y tal vez el más importante ya que hay que tener en cuenta que la permanencia del cultivo se extiende varias décadas. No existen variedades perfectas, sino que hay que ver cual se adapta mejor a cada circunstancia, por ejemplo las variedades que producen nueces de mayor tamaño en general requieren manejos más ajustados sobre todo respecto al riego, para lograr un buen llenado y un buen porcentaje de almendras. Otras variedades no son las más recomendables para regiones de clima templado húmedo, ya que presentan susceptibilidad a sarna del pecán y se debería establecer un ajustado plan de pulverizaciones con fungicidas para el control de la enfermedad.

Dentro del manejo agronómico, el riego es primordial a lo largo de toda la vida de la planta, para satisfacer el crecimiento de los tejidos verdes el desarrollo del sistema radicular, el diámetro y altura del tronco.

A su vez, el manejo adecuado del riego es crucial para minimizar los riesgos de aparición de desórdenes fisiogénicos o enfermedades vinculadas al exceso de humedad como la fusariosis (Iannamico, 2004).

El pecan se caracteriza por su alto valor nutricional, posee más de 19 vitaminas y minerales, en los que se destacan elevados contenidos de gama tocoferol, vitaminas A, B, ácidos fólicos, calcio, fósforo, magnesio, potasio, zinc, taninos y anti oxidantes (Padilla et al., 2008) (Tabla 1).

Es importante destacar el alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados, entre los que se destaca el ácido oleico (omega 9), por lo

que es recomendable en la dieta diaria de un individuo adulto (National Pecan Shellers Association, 2009).

**Tabla 1:** Valor nutricional de la nuez de pecan cada 100 g

<b>Composición nutricional</b>	<b>Valor Nutricional (100 g)</b>
Calorías	639
Agua	1,10 g
Proteínas	7,97 g
Carbohidratos	22,3 g
Dieta en fibra	1,66 g
Lípidos totales	64,6 g
Lípidos saturados	5,18 g
Lípidos monosaturados	40,2 g
Lípidos poliinsaturados	16 g
Colesterol	0 mg
Vitamina A Carotenos	12,3 RE
Vitamina A Preformada	0 RE
Vitamina A – Total	12,3 RE
Teamina	0,32 mg
Riboflavina	0,12 mg
Niacina	0,91 mg
Isoleucina	0,33 g
Leucina	0,54 g
Licina	0,3 g
Metionina	0,19 g
Fenilalanina	0,42 g
Trionina	0,26 g
Valina	0,39 g
Piridoxina	0,18 mg
Cobalamin – B12	0 µg
Ácido Fólico	40,8 µg
Pantothenic Acid	1,75 mg
Vitamina C	2,05 mg
Vitamina E	3,11 mg
Calcio	0,04 g
Cobre	1,24 mg
Hierro	2,18 mg
Magnesio	0,13 g
Fósforo	0,3 g
Potasio	0,37 g
Selenio	11,7 µg
Sodio	0,7 mg
Zinc	5,67 mg
Cistina	0,22 g
Tirosina	0,29 g
Arginina	1,14 g

Histidina	0,23 g
Alanina	0,35 g
Ácido aspártico	0,73 g
Ácido glutámico	1,59 g
Glicina	0,39 g
Prolina	0,37 g
Cerina	0,39 g

**Fuente:** Elaboración propia, a través de datos aportado por Santerre, 2012.

Sin embargo el exceso de agua, trae consecuencias perjudiciales para el pecan, como privación de oxígeno, causando daños irreversibles en el sistema radicular y favoreciendo el desarrollo de ciertas enfermedades de las raíces y el cuello, tal como *Phytophthora Muncharaz* (Muncharaz Pou, 2001).

Existen diversas enfermedades causadas por virus, hongos y bacterias que afectan a la planta de pecan a lo largo de sus diferentes etapas fenológicas. El pecan es atacado por numerosos patógenos a lo largo de su ciclo de cultivo. Dentro de las enfermedades mas importantes reportadas en Argentina se encuentra la sarna, el moho rosado, la antracnosis y recientemente fue descrito el cancro del pecan.

La enfermedad más importante a nivel mundial es la sarna, cuyo agente causal es el hongo *Cladosporium caryigenum*. La sarna del pecán puede aparecer en cualquier estadio del cultivo, afectando brotes jóvenes, hojas en crecimiento y hasta nueces (Mantz et al., 2008).

Esta enfermedad se caracteriza por producir pequeñas manchas circulares de color negro, que en ocasiones pueden expandirse y formar grandes manchas sobre el fruto. El hongo inverna en los brotes infectados y en viejas valvas y hojas en los árboles. En primavera reanuda su crecimiento en las lesiones viejas y en pocos días, produce grandes cantidades de esporas.

Luego de la aparición de la sarna del pecan, especialmente cuando este hongo ataca a las nueces en crecimiento, puede surgir un patógeno secundario denominado *Trichothecium roseum* (Mantz et. al., 2009).

Otro de los hongos que más daño causan en pecan es la *Alterania sp.*, que provoca manchas foliares y del tallo. También puede aparecer *Colletotrichum gloeosporoides* que provoca manchas foliares de distintas formas y tamaño en los distintos estados fenológicos y en casos severos causan pérdida del rendimiento (Mantz et al., 2010).

Recientemente se ha descrito al agente etiológico causal de la cancrrosis del pecan perteneciente al género *Phomopsis* (Noelting et al., 2016b).

Este hongo afecta principalmente a aquellas plantas cultivadas en suelos con escaso drenaje (Noelting et al., 2016). Los síntomas del ataque de este patógeno se caracterizan por presentar lesiones hundidas y alargadas (cancros), localizadas principalmente a la altura de las ramas, a nivel del cuello o en las zonas de inserción del injerto con el pie (Figura 3). En dichas lesiones se suele observar, a su vez, estructuras de color oscuro correspondientes a los cuerpos fructíferos del hongo (picnidios) (figura 4). También se puede observar que la *Phomopsis sp.* está asociada al Dieback o muerte simpodial (Reilly et al. 1994) y a cancros acompañados por descortezamiento (Figura 5).



**Figura 3:** cancro en rama de pecán (Noelting et al 2016)



**Figura 4.** Colonia de *Phomopsis* sp en medio de cultivo agarizado.





**Figura 5:** Sintomatología del ataque de *Phomopsis* ssp. en pecan: A y B muerte simpodial o dieback; C y D cancos en ramas con descortezamiento; E y F cancos en tallo principal; G y H cancos.



Los canchales que se manifiestan principalmente en las plantas débiles y/o estresadas, heridas mecánicas producidas en la corteza durante las operaciones de injerto, poda, trasplante, desmalezados suelen confundirse frecuentemente con daños mecánicos o bien con lesiones dadas por bajas temperaturas registradas durante el periodo invernal o caída de granizo.

El desarrollo de la enfermedad puede provocar caídas de ramas, hasta la muerte de la planta, ante incidencias graves.

Este hongo presenta una incidencia del orden del 10 al 50% en las plantaciones relevadas en la Provincia de Buenos Aires (Noelting et al., 2016).

Anteriormente este patógeno fue reportado como contaminante en nueces de pecan (Comerio, 2007).

Las plantas han desarrollado, a lo largo del tiempo, un sofisticado sistema de defensa que incluye el reconocimiento y respuesta a los organismos extraños, tales como respuestas hipersensibles, aumento de la expresión de genes de defensa, producción de compuestos antimicrobianos, formación de lignina, y estallido oxidativos.

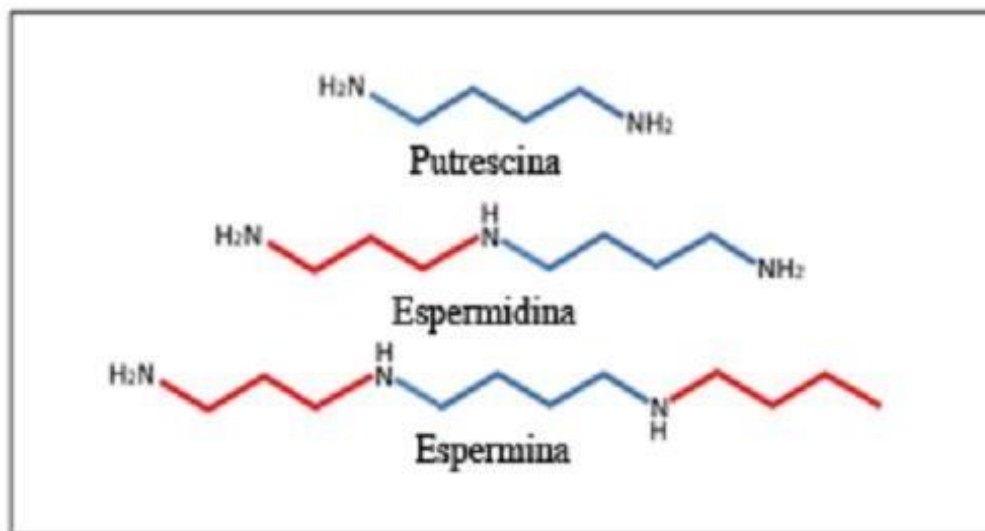
Es decir, la tolerancia está dada por la combinación de barreras químicas y físicas, que pueden estar preformadas o ser inducidas luego de la infección (Grant y Lamb, 2006), por lo que rara vez las enfermedades llegan a ser letales. Sin embargo el estrés causado durante las infecciones suelen provocar importantes mermas en los rendimientos y por lo tanto genera pérdidas económicas (Oerke, 2006).

Dentro de los compuestos que utilizan las plantas como mecanismos de defensas, se encuentran las poliaminas (PAs).

Las poliaminas fueron descubiertas por primera vez por Antoine van Leeuwenhoek en el año 1678, pero no fue hasta 250 años después que se caracterizó correctamente; luego de realizadas estas observaciones incipientes se comenzó a investigar acerca del metabolismo de éstas (Bachrach, 2009). Estas son un grupo de reguladores de crecimiento que se han encontrado en distintas partes de las células como en el citoplasma, vacuolas, mitocondrias y cloroplastos. Son moléculas de bajo peso molecular con cargas positivas que se adhieren fácilmente a las macromoléculas de ADN (Soborón, 2008).

Las poliaminas pueden ser libres o conjugadas y en éste último caso pueden ser solubles o insolubles cuando las poliaminas están conjugadas a grupos acetilos o a ácidos orgánicos como por ejemplo el fenólico o ferúlico. Por lo general estos compuestos conjugados integran componentes estructurales, como la pared celular, siendo esenciales para el normal crecimiento (Bagni y Torrigiani 1992).

Son moléculas de carga positiva que contienen dos o más grupos aminos en su estructura. Las poliaminas más abundantes son la diamina putrescina (Put), la triamina espermidina (Spd) y la tetramina espermina (Spm) (Figura 6). También es común en plantas, especialmente en leguminosas la diamina cadaverina (Cad).



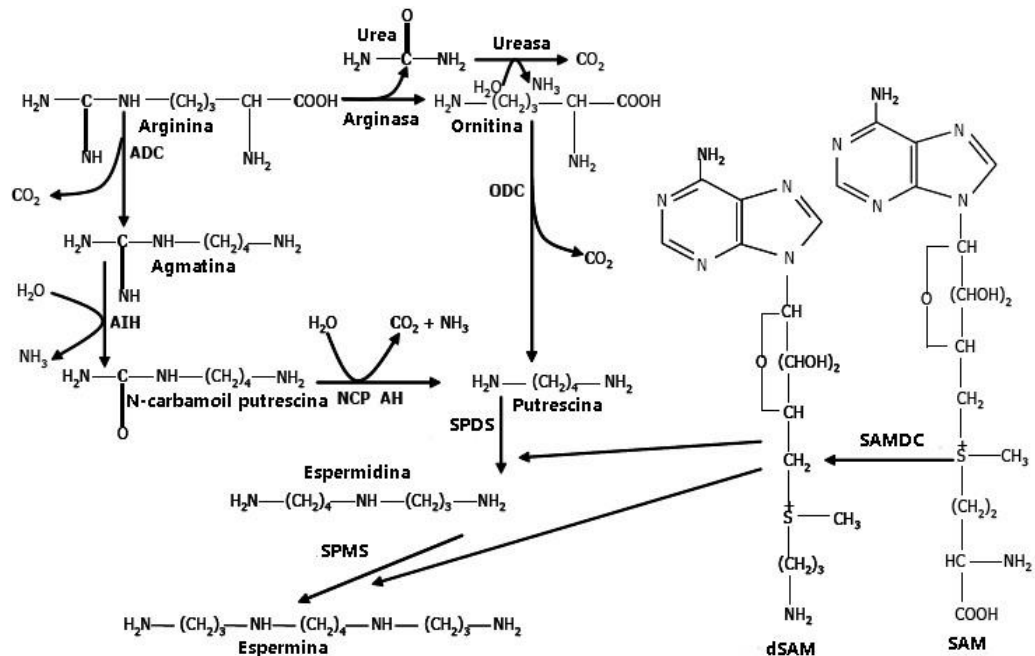
**Figura 6:** Poliaminas más comunes en plantas

Se las considera moléculas esenciales para el desarrollo de la planta ya que se ven involucradas en la morfogénesis, embriogénesis, senescencia de hojas y respuesta a estrés biótico y abiótico (Kusano et al., 2008).

Además de estas funciones se ha visto que las poliaminas juegan un papel en los procesos de la transcripción de genes, la división celular, replicación de ADN, desarrollo y maduración de frutos y en el desarrollo de los órganos (Kaur-Sawhney et al.; 2003).

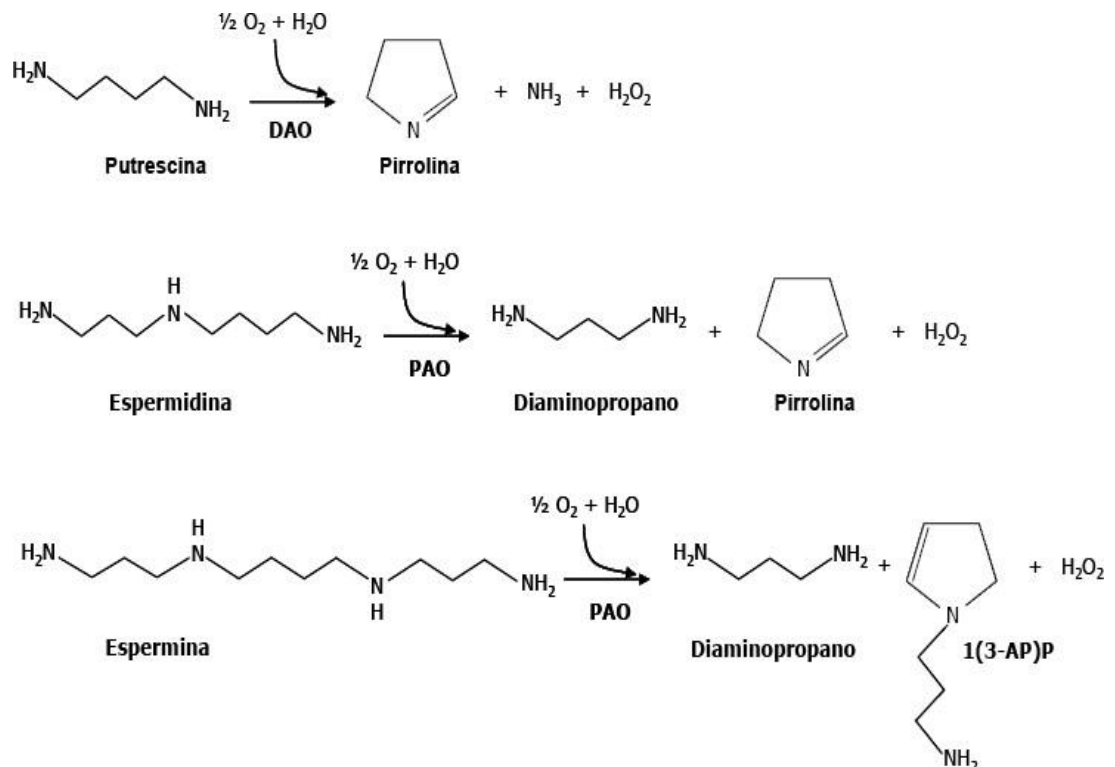
La biosíntesis de las poliaminas puede ser dividida en dos etapas principales: la síntesis de diaminas por la descarboxilación de aminoácidos

básicos y la síntesis de poliaminas complejas a partir de las primeras, por el agregado secuencial de grupos aminopropilos (Figura 7).



**Figura 7:** Biosíntesis de poliaminas a partir de los aminoácidos ornitina y arginina.

Por otro lado, las poliaminas son desaminadas oxidativamente por la acción de amino-oxidasas. (Figura 8). En las plantas, el catabolismo de poliaminas procede vía las Cu<sup>+2</sup> oxidasas (diamino-oxidasas: DAO., EC 1.4.3.6) y las flavin-oxidasas (poliamino-oxidasas: PAO., EC1.4.3.4) (Sebela et al., 2001).



**Figura 8:** Catabolismo de poliaminas

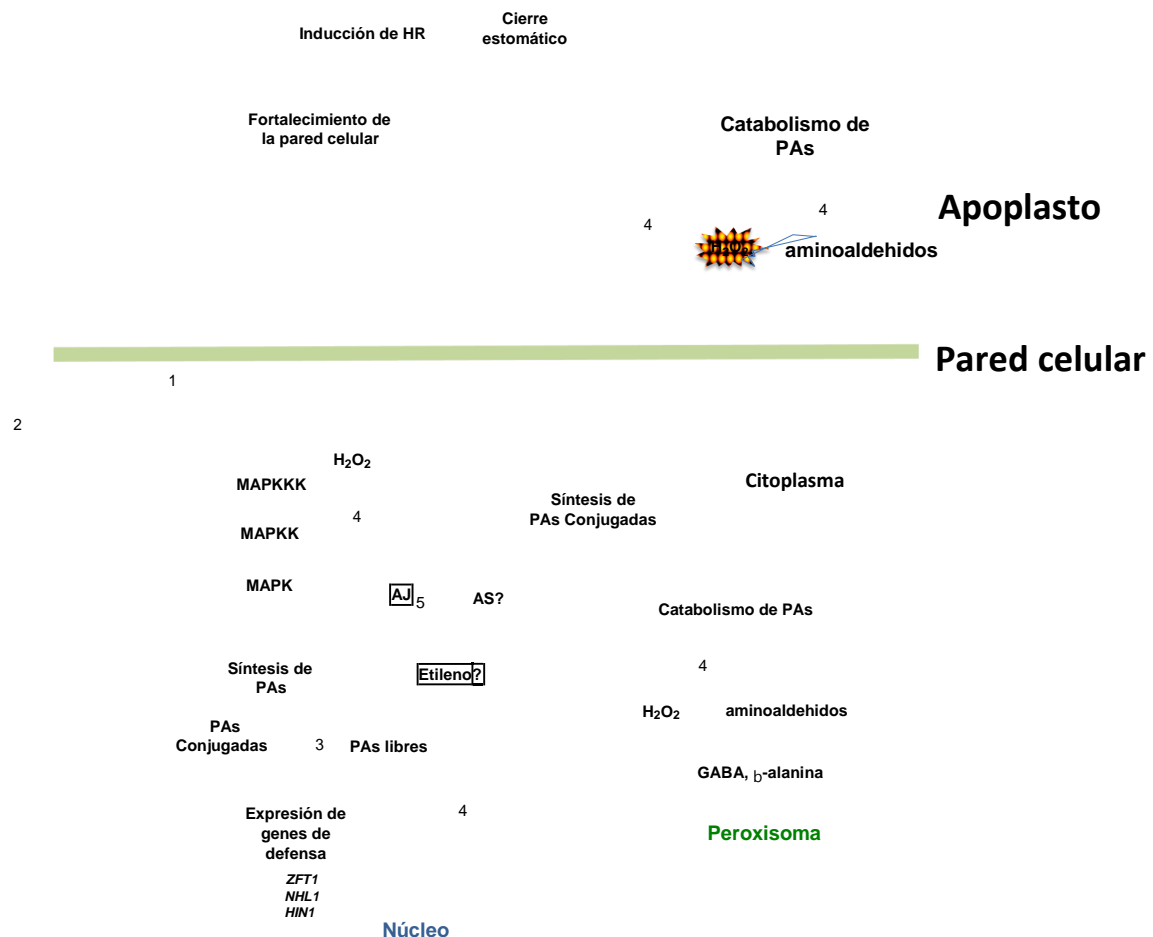
Por otro lado, la translocación de las PAs fueron detectadas en los fluidos de floemas y xilemas (Friedman et al., 1986). Posteriormente se han identificado varias proteínas de la membrana plasmática, entre ellas las llamadas RMV1 (Resistant to methyl Viologen 1), con capacidad para el transporte de poliaminas (Fujita et al., 2012).

### Las poliaminas en la defensa contra el estrés biótico

Una reacción hipersensible (HR) se lleva a cabo cuando una planta entra en contacto con el patógeno, produciendo la muerte celular del área que se ve afectada. En el virus del mosaico del tabaco (TMV) al producirse la infección se induce la HR y los niveles de poliaminas suben cuando se da ésta interacción (Marini et al., 2001)

Además, el agregado de espermina exógena induce la respuesta hipersensible, siendo los altos niveles de poliaminas en el apoplasto los

responsables de generar esta reacción. Kusano (2008) describió el mecanismo en que se da esta respuesta, en donde la espermina actúa de dos formas: la primera es mediante su catabolismo que genera especies reactivas del oxígeno y la segunda es porque la espermina influye en los canales de calcio provocando una mayor entrada de éste elemento (Figura 9).



**Figura 9:** Respuesta de las poliaminas ante un ataque de patógeno (Rossi 2012).

La importancia de generar especies reactivas del oxígeno es que originan una disfunción en la mitocondria que origina la respuesta hipersensible. Una vez llevados a cabo estos dos eventos, se activan proteínas kinasas llamadas (MAPKs) que son las responsables de transmitir la señal al núcleo y generar la activación de los genes de respuesta a la HR, y por ende a la muerte celular. Por lo tanto se reconoce que la espermina es la responsable

de transmitir la señal para la activación de los caminos de defensa contra patógenos (Kusano et al., 2008).

Por otro lado, ante un ataque de un patógeno en cebada se encontró un aumento de los niveles de PAs como de enzimas involucradas en sus síntesis en tejidos próximos al sitio de infección (Greenland and Lewis 1984; Walters et al., 1985). Dicho aumento está correlacionado por un incremento en la división y crecimiento celular inducidos por la presencia del patógeno (Greenland y Lewis, 1984; Walters et al., 1985).

El uso de inhibidores específicos de la PAO permite concluir que la oxidación de las PAs beneficia la propagación del patógeno necrotrófico y por el contrario perjudica al biotrófico. Por lo tanto la oxidación de poliaminas apoplástica cumple un rol muy importante en las respuestas al ataque de patógenos (Marina et al., 2008).

En los últimos años ha cobrado cada vez más fuerza el concepto de que el principal rol que cumplen las PAs en respuesta al ataque por patógenos deriva de su oxidación por parte de los AOs y las PAs (Marina et al., 2008; Yoda et al., 2009; Gonzalez et al., 2011).

Si bien, como fue relevado en los párrafos anteriores, existe profusa bibliografía sobre el comportamiento del metabolismo de poliaminas en la interacción planta-microorganismo, en pecan existen pocos trabajos sobre aspectos fisiológicos de respuesta al ataque de alguno de sus patógenos.

Por lo tanto, se torna importante obtener una primera aproximación a la respuesta fisiológica del pecan ante los ataques de agentes patógenos, dado el gran valor comercial de este cultivo con más de 6000 ha implantadas en nuestro país.

Por otro lado, debido a la relevancia e incidencia de los ataques del agente causal de la cancrrosis del pecan, se planteó como objetivo de esta tesis realizar una primera aproximación a la interacción de éste hongo con la planta de pecan mediante la caracterización de los niveles de poliaminas y su evolución durante el desarrollo de la infección. Teniendo como hipótesis que los niveles de poliaminas en las plantas de pecan se van modificando, bajo la infección del agente causal de la cancrrosis.



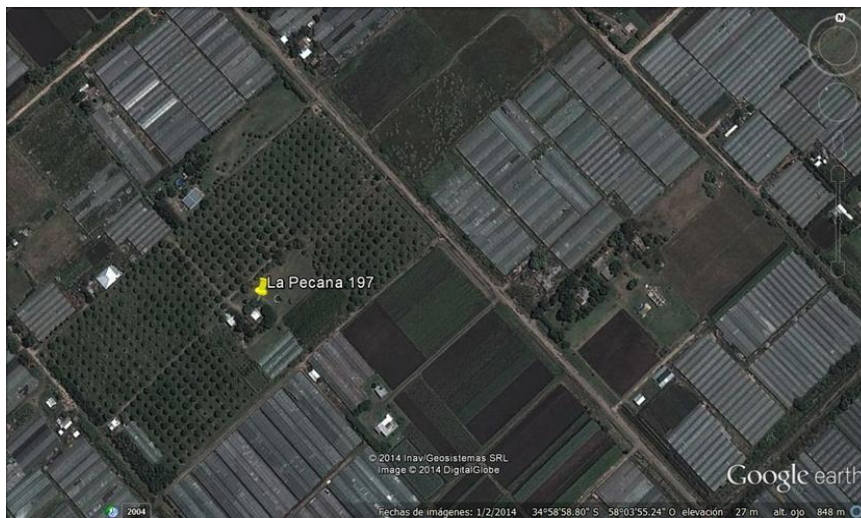
## 5. CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Sitio experimental

Los análisis de este trabajo de investigación se llevaron a cabo en la Provincia de Buenos Aires, en el Instituto Tecnológico de Chascomus (Figura 10), el cual se encuentra ubicado sobre la Avenida Intendente Marinos Km. 8,2. Previamente las plantas de pecan fueron trasladadas desde la localidad de Lisandro Olmos, Provincia de Buenos Aires (figura 11 y 12).



**Figura 10:** Instituto tecnológico de Chascomus



**Figura 11:** Establecimiento, vivero La Pecana 197, Lisandro Olmos, Partido de La Plata, Provincia de Bs. As



**Figura 12:** Invernaderos de Producción de plantas de Pecan Injertadas

## 5.2. Diseño experimental y tratamientos.

**Material vegetal:** Se utilizaron plantas de pecan del cultivar Pawnee provenientes del vivero La Pecana (La Plata, Pcia. Bs. As). Las mismas fueron injertadas en la primavera de 2017 sobre pie de pecan provenientes de semillas de árboles francos de la zona. Los portainjertos de 2 años de edad fueron conducidos en macetas de 40cm de alto X 20 cm de diámetro con suelo y fueron injertados con la técnica de parche.

Las plantas fueron trasladadas al Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH) en la primavera del año 2018 y acondicionadas en invernadero hasta su utilización en este trabajo. Se realizó una pulverización con Hipermetría para controlar un brote de pulgones.

**Inoculo:** Se utilizo una cepa de *Phomopsis* spp. (cepa N° 1219, Noelting 2016) aislada de plantas de pecan provenientes de un monte productivo de la localidad de Verónica (Pcia. Bs As.)

La cepa fue cultivada sobre APG durante 15 días en cámara de cultivo con 25°C de temperatura y 12 hs de fotoperíodo para inducir la formación de picnidios.

**Inoculación:** El 24 de noviembre de 2018 se realizaron las inoculaciones, utilizando discos de APG de 0,5cm de diámetro realizados con un tip de p1000 cortado. Para ello se siguió la siguiente técnica::

Se realizaron pequeños cortes en la rama de las plantas en el vértice formado por la misma y el peciolo de la hoja, se colocó un disco de APG con el micelio y sobre el mismo un trozo de algodón humedecido en agua estéril para mantener la humedad del inóculo. El disco y el algodón se sujetaron a la rama utilizando el peciolo y envolviendo los elementos con film.

Los controles se realizaron de la misma manera pero utilizando APG sin crecimiento micelial. Se colocaron discos de APG con micelio a 18 plantas y otras 18 correspondieron a los controles. De estas últimas 2 plantas sufrieron roturas de rama y no fueron utilizadas en las tomas de muestra.

Toma de muestra y determinación de poliaminas: Luego de la inoculación se realizó la toma de muestras a los 9 días de la inoculación (DDI), 16 DDI y 23 DDI.

Se seleccionaron tres hojas completamente desarrolladas insertadas por encima del punto de inoculación y se identificaron. De estas hojas se tomaron en cada muestreo un foliolo de la parte central y se guardaron en freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de poliaminas.

Por otro lado, durante la última toma de muestra, se realizó una evaluación de incidencia y severidad.

La determinación de poliaminas se llevó a cabo de la siguiente manera:

Las muestras fueron molidas en mortero preenfriado con ayuda del uso de  $\text{N}_2$  líquido y luego 300 miligramos del tejido fueron colocadas en microtubos de 1,5 ml con el agregado de 1 mL de ácido perclórico al 5% e incubadas sobre hielo por el término de 30 minutos. Luego fueron centrifugadas a  $10000g$  por 10 minutos y  $60\mu\text{L}$  de sobrenadante (muestra) fueron colocadas en otro microtubo donde se realizó la derivatización con cloruro de dansilo. Para esto, se neutralizó la muestra con  $60\mu\text{L}$  de carbonato de sodio saturado, se agregaron  $6\mu\text{L}$  de una solución de 1,7- heptanodiamina  $0,1\text{mM}$  como estándar interno,  $75\mu\text{L}$  de una solución de cloruro de dansilo de  $10\text{mg}/\text{mL}$  de acetona y previa agitación en vortex por 5 segundos, se incubaron a  $70^{\circ}\text{C}$  por 1 hora en oscuridad.

Luego de enfriarse se agregaron  $20\mu\text{L}$  de una solución acuosa de prolina de  $100\text{mg}/\text{mL}$  y se incubaron nuevamente a  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos en oscuridad.

Posteriormente se realizó una extracción con tolueno de las poliaminas dansiladas. Para esto se agregaron 200 $\mu$ L de tolueno y se agitaron las muestras en vortex durante 30 segundos. Luego se centrifugaron a 10000g por 30 segundos y se extrajeron 175  $\mu$ L del sobrenadante y se pasaron a un microtubo nuevo y posteriormente se evaporaron al vacío hasta sequedad. Todas las operaciones desde el agregado de cloruro de dansilo se hicieron al abrigo de la luz.

Luego, las muestras dansiladas y secas fueron guardadas a -18°C hasta su determinación.

Además se realizó una curva de calibración utilizando poliaminas sintetizadas con la misma metodología descrita anteriormente.

Para esto se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento o HPLC (por sus siglas en inglés) en fase reversa con detección por fluorescencia.

Se utilizó un cromatógrafo marca Waters 1525 y un detector de fluorescencia también marca Waters modelo 2475. La columna utilizada fue marca Phenomenex Luna (2) C18 de 250mm X 4,6mm.

Se utilizó un protocolo de gradiente utilizando agua y acetonitrilo como fase móvil a un flujo de 1,5 mL/ minuto.

Las muestras fueron resuspendidas en 40 $\mu$ L de acetonitrilo y centrifugadas 10 minutos a 10000g e inyectadas en la bomba del HPLC mediante un inyector de 5 $\mu$ L de capacidad.

Luego de realizadas las separaciones en la columna, las poliaminas dansiladas fueron detectadas mediante fluorescencia a 415 nm de emisión y 510 de excitación e integradas mediante el software Breeze (Waters®).

Las áreas de los picos identificados fueron divididos por el área del pico correspondiente a la heptanodiamina (estándar interno) y los contenidos de poliaminas evaluados.

Medición de temperatura del canopeo: Luego de la inoculación se realizaron 4 tomas de datos de temperatura de canopeo a los 6, 10, 16 y 32 DDI. Las mismas fueron llevadas a cabo con una cámara termográfica FLIR E- 30 con una resolución 160 x 120 pixeles y sensibilidad térmica de 0,1°C.

La cámara fue calibrada a una distancia del objetivo de 2 metros, 20°C de temperatura ambiente, 80% de humedad relativa y una emisividad de 0,98.

Las fotos termográficas fueron analizadas con el software ThermaCam Research PRO (FLIR®).

Procesamiento de datos y análisis estadístico:

Los datos fueron procesados en Excell (Microsoft®) y graficados con el software Graph Pad 5 (Prism®).

## 6. CAPÍTULO III. Resultados y discusiones

Las plantas de pecan fueron inoculadas el día 24 de noviembre de 2018 a la mañana. La técnica de inoculación fue similar a la utilizada por Noelting et al., 2016a, que consistió en abrir una herida en el tallo, colocar un disco de medio de cultivo con micelio junto a un trozo de algodón humedecido y sujetar esto con el peciolo de la hoja utilizando bandas de film. En los controles se usó discos de medio de cultivo sin hongo, repitiendo los mismos procedimientos.

Como ésta metodología solo tenía un antecedente de uso se tuvo el cuidado de dejar hasta el final de la toma de muestras los discos para aumentar la probabilidad de éxito en la inoculación.

Posteriormente, al finalizar la toma de muestras se realizó una evaluación de severidad por aspecto del cancro formado y presencia de micelio sobre el mismo.

No se encontraron daños en los cortes utilizados en los controles, concluyendo que no hubo contaminación en el procedimiento de inoculación. Mientras que en casi todas las plantas infectadas se observaron síntomas de desarrollo de la enfermedad, con excepción de las plantas 18, 24 y 26, lo que resulto en una eficiencia de inoculación del 83%. Las plantas en donde el hongo no logró desarrollar síntomas fueron consideradas no infectadas y se eliminaron de los análisis.

La severidad de infección fue dividida en 3 grados (1= menos severo, 3= mas severo) encontrándose 6 plantas para el grado 1, otras 6 plantas para el grado 2 y 3 plantas para el grado 3.

En la Figura 13 se observan plantas controles e infectadas a 24 días de inoculadas. Las plantas controles muestran un corte limpio, sin necrosamiento de los tejidos, mientras que las inoculadas con *Phomopsis* presentan signos de necrosis y avances de daño en el tejido con canchros incipientes.

Por otro lado, en la Figura 14 puede observarse un corte transversal de la rama en el punto de inoculación, donde se puede apreciar una invasión del tejido de la planta en la que corresponde al tratamiento inoculado con *Phomopsis*.

Como se detalló en materiales y métodos se realizaron 3 tomas de muestras de folíolos de hojas a los días 9, 16 y 23 post inoculación para analizar el contenido de poliaminas libres.

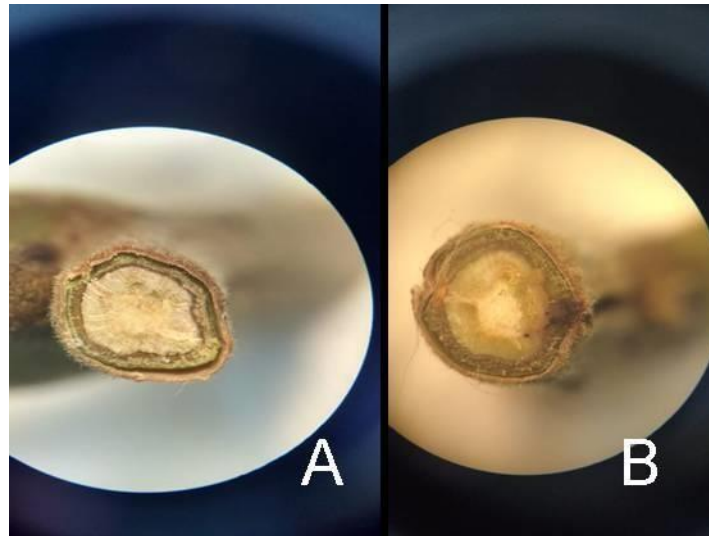
Cuando se realizaron las corridas cromatográficas pudieron ser identificadas las 3 poliaminas principales en hojas de pecan, Put, Spd y Spm.

También se observaron numerosos picos que no coincidían con los tiempos de retención de estas poliaminas y que en posteriores investigaciones se tratara de dilucidar.



**Figura 13:** Aspectos de la zona de inoculación a 24 días de realizarse: A, control; B, C y D inoculados con *Phomopsis spp.*



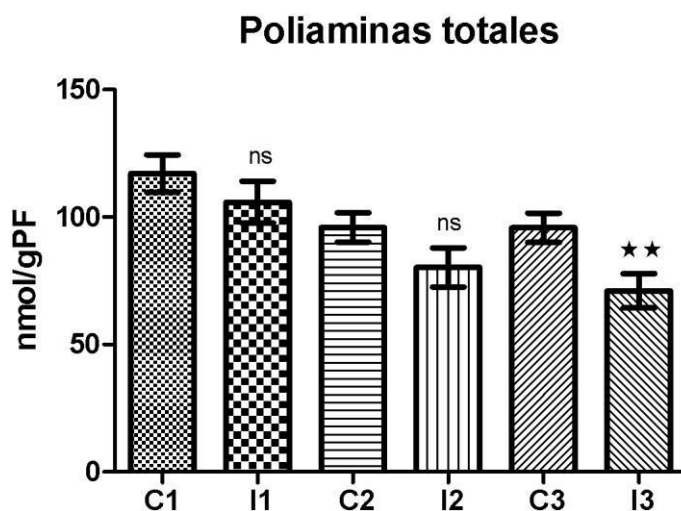


**Figura 14: Cortes transversales del tallo en la zona de inoculación:** A, control; B, inoculado con *Phomopsis* spp.

Como se detalló en la introducción, las poliaminas pueden presentarse libres, conjugadas solubles (conjugadas a ácidos orgánicos como ferúlico y cinámico) y conjugadas insolubles (conjugadas a proteínas o carbohidratos de alto peso molecular), con esta técnica de derivatización se observan en el cromatograma las poliaminas libres y conjugadas solubles. Los picos identificados por tiempo de retención corresponden a las poliaminas libres principales. Si bien se observaron picos cercanos a Cad y Dap, estos fueron inconsistentes entre las muestras y por lo tanto se consideró necesario otros estudios para determinar si los mismos están presentes en pecan o son poliaminas conjugadas solubles con tiempos de retención similares.

Los niveles de poliaminas totales en hojas de pecan, considerando las 3 identificadas, oscilaron entre 117 y 95 nmoles/gramo de peso fresco (nmoles/gPF) para las plantas controles y 105 a 71 nmoles/gPF para las plantas infectadas. Los valores descienden desde el primer día de toma de muestra (9DDI) hasta el último (23DDI) tanto para los controles como los Infectados (Gráfico 1).





**Gráfico 1:** Poliaminas totales en plantas controles (C) e infectadas (I) para los 3 tiempos de muestreo (1=9DDI, 2=16DDI y 3=23DDI). Test de t para cada tiempo, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Los niveles de poliaminas totales presentan gran variación entre plantas con CV entre 23,86% y 36,93%, esto dificulta el análisis de los datos incrementando el número de réplicas necesarias para una correcta evaluación. No obstante se observa una disminución consistente para las infectadas en relación a los controles.

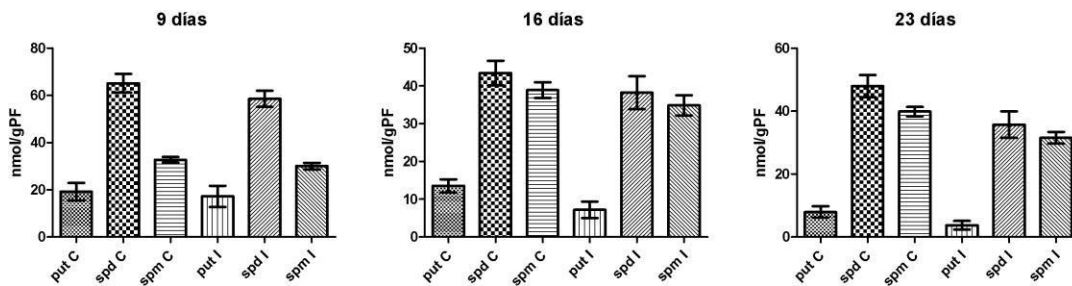
Estos niveles de poliaminas se encuentran dentro de los parámetros encontrados en hojas de plántulas de arroz (Maiale et al., 2004), hipocótilo de soja (Campestre et al., 2011), en hojas de plántulas de tabaco (Marina et al., 2008) y en plántulas de tomate (Vilas et al., 2018).

Los niveles encontrados en hojas de plántulas de arroz rondaron entre 150 a 400 nmoles/grPF, mientras que en hojas de plántulas de tomate se hallaron entre 20 y 40 nmoles /grPF, mientras que valores similares al tomate se hallaron en plántulas de maíz (Rodríguez-Kessler et al., 2008).

Pocos trabajos fueron realizados evaluando el contenido de poliaminas en plantas leñosas. Ejemplo de especies donde se realizaron mediciones son manzano, vid, avellano, mandarina, ciruelo y durazno (Rey et al., 1994; De Dios et al., 2006; Liu y Moriguchi 2007; Bartolini et al., 2009; Gong et al., 2018; Mirsoleimani y Shahsavar 2018).

Por otro lado, cuando se analizan los contenidos de poliaminas discriminando entre Put, Spd y Spm en los tres tiempos de toma de datos

(Gráfico 2), se observa que tanto los niveles de Put, Spd y Spm descienden a medida que pasa el tiempo.

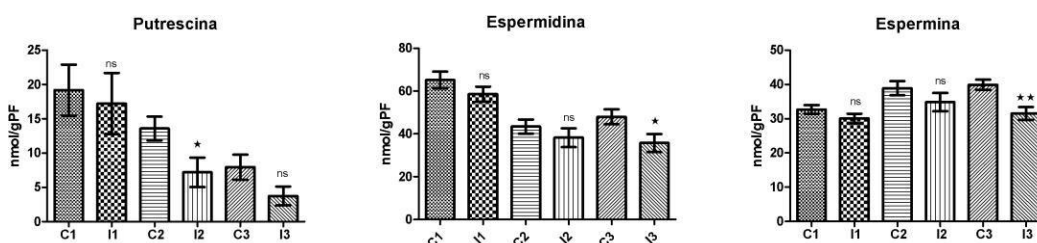


**Gráfico 2:** Contenido de Putrescina (Put), Espermidina (Spd) y Espermina (Spm) a los 9, 16 y 23 DDI para las plantas control e infectadas.

En el gráfico 3, se observa en detalle para cada poliaminas su comportamiento a través del tiempo de tratamiento. Los niveles de Put disminuyen marcadamente a través del tiempo de infección, mientras que para Spd y Spm sucede un fenómeno similar pero menos manifiesto.

Otra información que se deriva de éstos datos es que tanto los niveles de Put como de Spd disminuyen durante las sucesivas tomas de datos mientras que el contenido de Spm tiende a incrementarse.

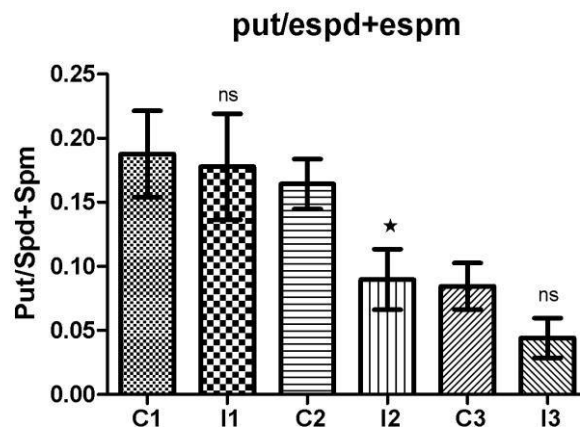
Las diferencias de los niveles de las distintas poliaminas entre controles e infectadas comienzan a ser significativas a partir de 16DDI. Mientras que la poliaminas Put disminuye significativamente para el 16DDI, Spd y Spm lo hacen en el 23DDI.



**Gráfico 3:** Contenido de poliaminas Putrescina, Espermidina y Espermina en plantas controles (C) e infectadas (I) para los 3 tiempos de muestreo (1=9DDI, 2=16DDI y 3=23DDI). Test de t para cada tiempo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

No obstante es importante remarcar que la gran variabilidad en el contenido de poliaminas entre las plantas de pecan impide observar diferencias en otros tiempos a pesar que es clara la tendencia a la disminución de las 3 poliaminas a través del tiempo de tratamiento bajo condiciones infectadas en comparación a los controles.

Por otro lado, cuando se analizan las relaciones entre Put/Spd + Spm, se observa una disminución de la mismas en el tiempo del ensayo y entre las condiciones controles versus infectadas (Gráfico 4).



**Gráfico 4:** Relación Put/Spd + Spm en plantas controles (C) e infectadas (I) para los 3 tiempos de muestreo (1=9DDI, 2=16DDI y 3=23DDI). Test de t para cada tiempo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Estos datos permiten visualizar un cambio no solo en los niveles totales sino también entre las proporciones de cada poliamina. Observándose una disminución proporcional de Put en relación a las poliaminas Spd y Spm., tanto a través del tiempo en las controles como en las infectadas en relación a éstas.

En plantas de tabaco atacadas por el hongo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* se produce un aumento de Put y Spm en el apoplasto (Marina et al., 2008). Estos aumentos estuvieron ligados al catabolismo de poliaminas que terminan generando especies reactivas del oxígeno colaborando con la muerte de los tejidos, indispensable para este tipo de patógeno. También se observó que el agregado de poliaminas a los tejidos infectados aumentaba la necrosis (Marina et al., 2008).

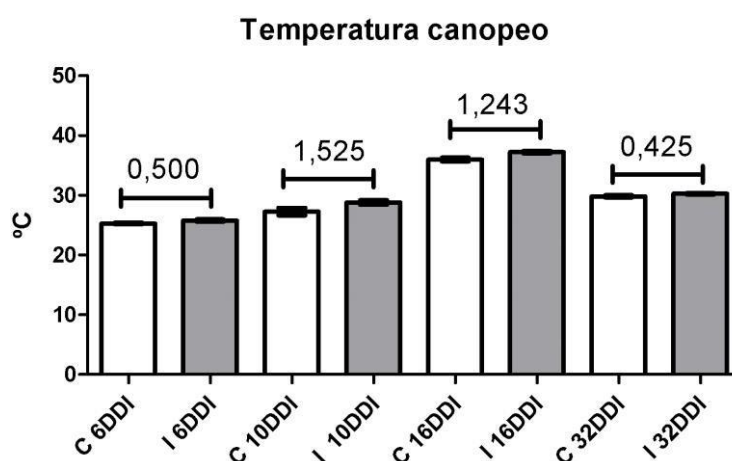
Por otro lado, plantas de tabaco inoculadas con diferentes patógenos (*Peronospora tabacina*, *Alternaria tenuis*, *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas tabaci* y virus del mosaico del tabaco) mostraron menores niveles de poliaminas que las controles (Edreva 1997).

Estos resultados contradictorios pueden ser explicados por la posición de la toma de muestra, donde en las proximidades del patógeno aumentan las poliaminas mientras la planta reacciona a la enfermedad disminuyendo sus niveles para evitar la propagación del patógeno.

Nuestros resultados muestran una disminución del contenido de poliaminas en las plantas infectadas vs controles, teniendo en cuenta que estos análisis fueron realizados en tejidos distantes del punto de inoculación y área infectada.

Podría sugerirse que este comportamiento obedezca a una reacción sistémica de defensa de las plantas de pecan ante el ataque de este tipo de patógenos.

Además, las plantas infectadas mostraron mayor temperatura del canopeo en comparación con las controles (Gráfico 5)

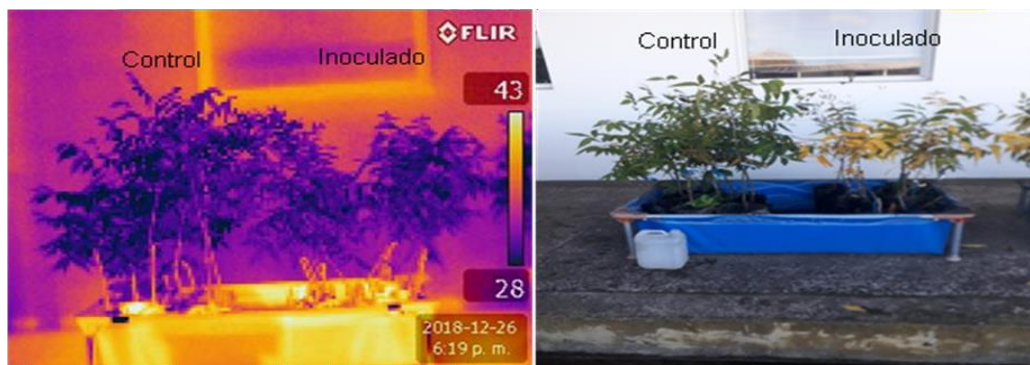


**Gráfico 5:** Temperatura del canopeo en °C, medida a 6, 10, 16 y 32 DDI en plantas infectadas (I) y controles (C). Las barras indican la diferencia de temperatura entre los tratamientos para cada toma de datos.

Las diferencia de temperatura llegaron hasta 1,5°C a los 10 DDI y 1,2°C a los 16DDI. Estos datos tienen que tomarse en conjunto con lo observado en los cortes de los tejidos de las ramas en las proximidades de los puntos de inoculación en las plantas infectadas (Figura 15). Estos tejidos

presentaban signos de deterioro por la invasión fúngica en comparación con los controles.

La invasión en los tejidos del xilema entorpece la translocación de agua hacia la parte aérea y de fotoasimilados hacia las raíces. La disminución de la translocación de agua se refleja en un aumento de la temperatura del canopeo como se observa en la Figura 12. Por otro lado, las plantas que desarrollaron los canchros presentan una aceleración de la senescencia de sus hojas al llegar el otoño como se observa.



**Figura 15:** Termografía del Canopeo a los 32 DDI, B- estado de la plantas a principios de mayo de 2019 al momento de comenzar la caída de las hojas.

## **7. REFLEXIONES FINALES:**

En éste trabajo se logró con éxito realizar con alta eficiencia la inoculación en forma controlada del agente causal del cancro de Pecan.

De acuerdo a los resultados obtenidos al estudiar los niveles de poliaminas en plantas infectadas y controles, se acepta la hipótesis planteada en un principio, al observarse variaciones en los niveles de poliaminas tanto en forma sistémica como local. Se determinó una disminución en general y de la putrescina en particular para las plantas infectadas vs controles.

Por otro lado, se observó una invasión en los tejidos del xilema en las ramas infectadas que se reflejó en un aumento de la temperatura del canopeo, interrumpiendo de esta manera la translocación del agua hacia la parte aérea de la planta de fotoasimilados hacia las raíces.

Este trabajo es una primera aproximación a la fisiología de las plantas de pecan bajo el ataque del agente causal de la cancrrosis *Phomopsis* spp. Sin embargo, serán necesarias nuevas investigaciones para comprender en profundidad la alteración en el funcionamiento de la planta de pecan por este patógeno y en las estrategias para combatirlo.

## 8. BIBLIOGRAFIA:

- Bachrach, U. (2009). The early history of polyamine research. *Plant Physiology and Biochemistry* (48): 490-495.
- Bagni, N. y Torrigiani, P. (1992). Polyamines: A new class of growth substances. In: *Prog. Plant Growth Regulation*. pp. 264–275. Depósito Legal: M-34.393-2000. ISBN; 84-7114-919-2. Tomo II. pág. 79-81.
- Bartolini, G.; Toponi, M.; Pestelli, P. (2009). Free polyamine variations in rooting of *Vitis* rootstock 140 Ruggeri. *Advances in Horticultural Science*, 23 (2):113-117.
- Campestre, M.; Bordenave, C.; Origone, A.; Menéndez, A.; Ruiz, O.; Rodríguez, A. et al. (2011). Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls. *Journal of Plant Physiology*, 168 (11):1234-1240.
- Comerio, R.M. (2007). Hongos presentes en nueces de pecán In: Lavado R, Frusso E, eds. *La Producción de Pecán en Argentina*. Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires, 14
- De Dios, P.; Matilla, A.; Gallardo, M. (2006). Flower fertilization and fruit development prompt changes in free polyamines and ethylene in damson plum (*Prunus insititia* L.). *Journal of Plant Physiology*, 163:86-97.
- Edreva, A. (1997). Tobacco polyamines as affected by stresses induced by different pathogens. *Biologia Plantarum*, 40:317-320.
- Friedman, R.; Levin, N.; Altman, A. (1986). Presence and identification of polyamines in xylem and Phloem exudates of plants. *Plant Physiology*. 82 1154–1157 10.1104/pp.82.4.1154
- Fujita, M.; Fujita, Y.; Luchi, S.; Yamada, K.; Kobayashi, Y.; Urano, K. et al. (2012). Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in *Arabidopsis*. *PNAS, U.S.A.* 109 6343–6347 10.1073/pnas.1121406109
- Gong, X.; Dou, F.; Cheng, X.; Zhou, J.; Zou, Y.; Ma, F. (2018). Genome-wide identification of genes involved in polyamine biosynthesis and the role of

- exogenous polyamines in *Malus hupehensis* Rehd. under alkaline stress. *Gene*, 669:52-62.
- Gonzalez, M.; Marco, F.; Minguet, E.; Carrasco-Sorli, P.; Blázquez, M.; Carbonell, J. et al. (2011). Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in *Arabidopsis* defense against *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology* 156 2266–2277 10.1104/pp.110.171413
- Grant, M. y Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 414–20.
- Greenland, A. y Lewis, D (1984). Amines in barley leaves infected by brown rust and their possible relevance to formation of “green islands”. *New phytology*, 96 :283–291 10.1111/j.1469-8137.1984.tb03565.x
- Kaur-Sawhney, R.; Tiburcio, A.; Altabella, T.; Galston, A. (2003). Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology* (2): 1-12.
- Kusano, T.; Berberich, T.; Tateda, C.; Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228:367–381.
- Iannamico, L. (2004). El Nogal. La importancia de un buen riego. *Revista Rompecabezas Tecnológico*. VI parte. Pág. 40-43
- Larre, M.A. (2010). Determinación de hongos alternantes en nueces de Pecán de Producción Nacional. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química Orgánica. Buenos Aires. 78 p.
- Little, E. (1971). Digital Representations of Tree Species Range Maps from “Atlas of United States Trees”, U.S. Geological Survey. 2009.
- Liu, J.; Moriguchi, T. (2007). Changes in free polyamines and gene expression during peach flower development. *Biologia Plantarum*, 51 (3):530-532.
- Maiale, S.; Sanchez, D.; Guirado, A.; Vidal, A.; Ruiz, O. (2004). Spermine accumulation under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 161 (1):35-42.
- Marini, F.; Betti, L.; Scaramagli, S.; Bodi, S.; Torrigiani, P. (2001) Polyamine metabolism is unregulated in response to tobacco mosaic virus in hypersensitive, but not in susceptible, tobacco. *New Phytologist*, 149:301–309.



- Mantz, G.; Maiale, S.; Rollan, C.; Ronco, L. (2008). Occurrence of scab disease of pecan caused by *Cladosporium carygenum* in Argentina. *New Disease Reports*, 18 (34).
- Mantz, G.; Rollán, C.; Ronco, L.; Maiale, S. (2009). First report of pink mold (*Trichothecium Roseum* Pers: Fr) on pecan nuts in Argentina. *Journal of Plant Pathology*, 91: 238.
- Mantz, G.; Minhot, R.; Maiale, S. (2010). First Report of *Colletotrichum Gleosporiodes* causing pecan Anthracnose in Argentina. *Revista Journal of Plant Pathology*, 92 (2):543-546
- Marina, M.; Maiale, S.; Rossi, F.; Romero, M.; Rivas, M.; Gárriz, A. et al. (2008). Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic bacterium *Pseudomonas*. *Plant Physiology*, 147:2164–2178 10.1104/pp.108.122614.
- Mirsoleimani, A. y Shahsavari, A (2018). Changes of free polyamines in the leaves and stems of „Kinnow” mandarin tree as affected by alternate bearing. *Journal of Plant Process and Function*, 6 (22).
- Muncharaz Pou, M. (2001). *El Nogal, Técnicas de cultivo para la producción frutal*. Ed: Mundi Prensa S.A. ISBN: 84-7114-919-2.
- National Pecan Shellers Association. 2009. <http://www.ilovepecans.org/nutrition.html>
- Noelting, M.C.I. (2016) Instituto de Botánica “Carlos Spegazzini” Cepario de Levaduras y Hongos Filamentosos LPSC. Denominación sistemática de la Cepa: *Phomopsis* sp.(A5), actualmente(Cepa N° 1219).
- Noelting, M.C.; Mantz, G.M.; Maiale, S.J.; Molina, M.C; (2016a). Occurrence of *Phomopsis* sp. causing cankers on pecán trees in Buenos Aires province, Argentina. *New Disease Reports*, 33,9. [<http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2016.033.009>].
- Noelting, M.; Mantz, G.; Molina, M. (2016b) Detección de una nueva patología emergente en el cultivo de pecan en la Provincia de Buenos Aires [https://www.agro.unlp.edu.ar/sites/default/files/slides/pecan\\_2016.pdf](https://www.agro.unlp.edu.ar/sites/default/files/slides/pecan_2016.pdf)
- Oerke, E.C. (2006). Crop losses to pests. *Journal Agricultural Science*, 144:31–43.

- Padilla, F.; Rincon, A.; Bou Rached, L. (2008). Contenidos de polifenoles y actividad antioxidantes de varias semillas y nueces. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia. Unidad de Análisis de Alimentos. Caracas Venezuela. ALAN V. 58. N° 3 Caracas.
- Parodi, L. (1972). Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Editorial Acme: 311-313, Buenos Aires. Producción de frutas. Edición Mundial-Prensa. Madrid. Barcelona. México. Rompecabezas Tecnológico. VI parte. Pág. 40-43.
- Reilly, C.; Reynolds, K.; Wood, B. (1994). Fungi Associated with twig and limb Dieback of pecan In central Georgia. Second National Pecan Workshop Proceedings. Oklahoma July 23-26.
- Rey, M.; Diaz-Sala, C.; Rodriguez, R. (1994). Effect of repeated severe pruning on endogenous polyamine content in hazelnut trees. *Physiologia Plantarum*, 92:487-492.
- Rodríguez-Kessler, M.; Ruiz O.A.; Maiale, S.; Ruiz-Herrera, J.; Jiménez-Bremont, J.F. (2008). Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46:805–814
- Rossi, F. (2012). Respuestas de defensa de *Arabidopsis thaliana* al ataque de patógenos. El metabolismo de putrescina, su regulación por ácido salicílico y la sensibilidad a fitotoxinas de origen fúngico. Tesis Doctoral, UNSAM, Argentina.
- Santerre, C. 2012. Pecan Technology. Editorial Chapman and Hall. New York. Capítulo 7 pp 98 – 111.
- Sebela, M.; Radovà, A.; Angelini, R.; Tavladoraki, P.; Frébort, I.; Pêc, P. (2001). FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants *Plant Science*, 160:197-207.
- Soberón, J.; Quiroga, E.; Samprieto, A.; Vattuone, E. (2008). Poliaminas. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
- Valentini, G.; Daorden, M. Arroyo, L. (2010). Características de variedades de Nogal Pecán en evaluaciones de la EEA San Pedro. Estación Experimental Agropecuaria San Pedro. 30p.

- Vilas, J.; Romero, F.; Rossi, F.; Marina, M.; Maiale, S.; Calzadilla, P. et al. (2018). Modulation of plant and bacterial polyamine metabolism during the compatible interaction between tomato and *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Physiology*, 231: 281-290.
- Walters, D.; Wilson, P.; Shuttleton, M. (1985). Changes in levels of polyamines and activities of their biosynthetic enzymes in barley infected with the powdery mildew fungus, *Erysiphe graminis* DC ex Merat f. sp. *New Phytologist*, 101: 695–705. [10.1111/j.1469-8137.1985.tb02875.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1985.tb02875.x)
- Yoda, H.; Fujimura, K.; Takahashi, H.; Munemura, I.; Uchimiya, H.; Sano, H. (2009). Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host- and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. *Plant Molecular Biology*, 70: 103–112. [10.1007/s11103-009-9459-0](https://doi.org/10.1007/s11103-009-9459-0)