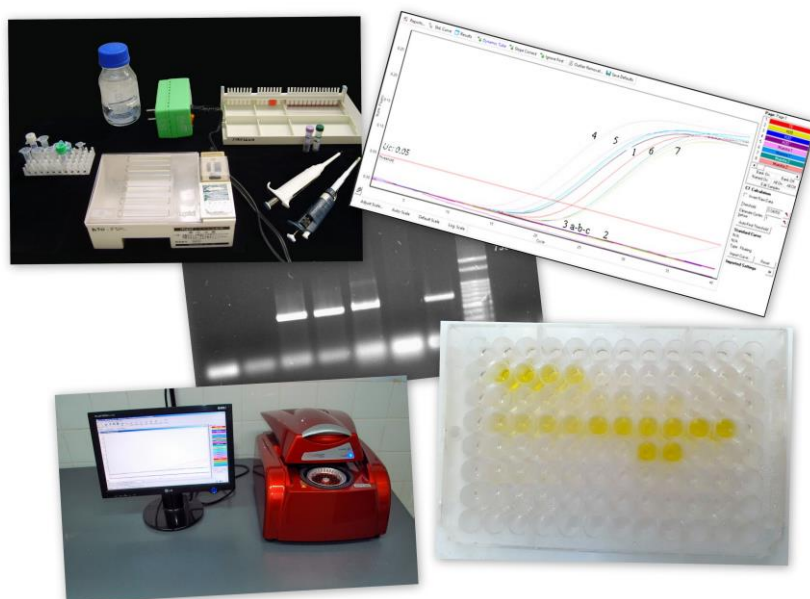


DICIEMBRE 2023 N° 15



BOLETÍN DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FITOPATÓLOGOS

ISSN: 2618-1932



TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN DE
Xylella fastidiosa EN OLIVO (*Olea europaea*)

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN DE *Xylella fastidiosa* EN OLIVO (*Olea europaea*)

Tolocka, P.A.¹, Guzmán, F.A.², Roca, M.E.³, Otero, M.L.¹, Haelterman, R.M.¹
(Capítulo Centro)

1.INTA-CIAP-IPAVE-UFyMA, Córdoba. 2.INTA AER-Villa Dolores. 3.SENASA La Rioja, Argentina

Contacto: tolocka.patricia@inta.gob.ar, haelterman.raquel@inta.gob.ar

RESUMEN

Con la primera detección de *Xylella fastidiosa* en plantas de olivo a fines de 2013 se complicó la problemática sanitaria de la olivicultura en Argentina. Se realizaron relevamientos en las principales zonas olivícolas, detectándola en las provincias de La Rioja, Catamarca y Córdoba. La caracterización de las cepas realizada con la técnica MLST, detectó la presencia de dos grupos genéticos ST69 y ST78 (compartido con cítricos y almendro respectivamente), ambos sólo están presentes en Argentina y corresponden a la subespecie *pauca*. A partir de una de las cepas de *X. fastidiosa*, se obtuvieron antisueros que fueron empleados para la puesta a punto de la técnica serológica DAS ELISA, donde los resultados obtenidos tuvieron alta sensibilidad y especificidad con el suero elaborado, pudiendo de esta manera, realizar diagnósticos serológicos para la detección de la bacteria, reemplazando antisueros importados, además de permitir el análisis de muestras a gran escala. También, es posible detectar la bacteria con métodos moleculares, como PCR y qPCR, aumentando de esta manera la sensibilidad en la detección del patógeno cuando se encuentra en bajas concentraciones en la planta. Se evaluó, además, la respuesta de tolerancia/susceptibilidad de dos cultivares de olivo, frente a inoculaciones realizadas con suspensiones bacterianas. De los resultados obtenidos, el cv. Arauco fue notablemente más susceptible a *X. fastidiosa* con respecto al cv. Frantoio, el cual se presentó como tolerante al patógeno. Finalmente, se completaron los postulados de Koch confirmando que la sintomatología observada a campo coincide con la manifestada bajo invernadero.

INTRODUCCIÓN

Xylella fastidiosa constituye una gran amenaza para la producción frutícola, no solo por su ya demostrada capacidad para producir grandes daños en el cultivo de olivo, sino también porque puede afectar a otros cultivos de importancia económica. Se la encontró por primera vez en vid, en el año 1892, cuando hubo una gran epidemia que acabó con la vitivinicultura comercial del área de Los Ángeles en California,

llamándola enfermedad de Pierce's de la vid (PDB). En 1973 se observaron bacterias tipo rickettsias (semejantes a las de animales) bajo el microscopio electrónico, en vasos xilemáticos procedentes de plantas enfermas de vid (Goheen *et al.*, 1973). A partir de ese momento, se infirió que el agente causal estaba relacionado a una bacteria vascular, aislándose por primera vez en vid (Davis *et al.*, 1978). Estudios posteriores determinaron que estas bacterias no tenían relación con las verdaderas rickettsias,



llamándolas bacterias limitadas al xilema, hasta que fueron finalmente clasificadas en 1987 como nuevo género *Xylella* y especie única *X. fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987). En el año 2016 se propone la especie *X. taiwanensis* a la cepa que causa la corchosis del peral en Taiwan (Su *et al.*, 2016).

En nuestro país se la detectó por primera vez en ciruelo japonés del Delta del Paraná, ocasionando la muerte de 500.000 plantas (Fernández Valiela y Bakarcic, 1954). La misma desapareció cuando la zona dejó de ser frutícola sin pasar a otra región. La enfermedad se presentó también en Brasil y Paraguay (French y Kitajima, 1978).

Actualmente están presentes en Argentina la clorosis variegada de los cítricos (CVC) (Brlansky *et al.*, 1991), en cítricos del NEA argentino y la escaldadura de la hoja del almendro (ALS) (Nome *et al.*, 1992), en la provincia de Catamarca.

En el 2003, en el sur de California se detectó la presencia de esta bacteria en olivo, constituyendo éste el primer antecedente en América del Norte y en el mundo. Estudios realizados por Krüchner *et al.* (2014) demostraron que sólo el 17% de las plantas sintomáticas fueron positivas para *X. fastidiosa* mediante PCR y también hubo baja eficiencia de transmisión a plantas indicadoras, sin manifestar síntomas. La caracterización de la bacteria determinó que correspondía a la subespecie *multiplex*. No se pudo demostrar que *X. fastidiosa* causara enfermedad en olivo debido a que no se completaron los postulados de Koch (Krüchner *et al.*, 2014).

DIAGNÓSTICO DE *Xylella fastidiosa*

La bacteria es un habitante exclusivo de los vasos xilemáticos de las plantas infectadas y también está presente en la cutícula del intestino anterior de insectos vectores, siendo muy difícil su aislamiento. *X. fastidiosa* sólo crece en medios de cultivo muy enriquecidos, en el caso de olivo, el medio más adecuado es el agar extracto de levadura y carbón tamponado (BCYE) (Wells *et al.*, 1981) y para

En nuestro país, a finales del año 2013, la bacteria fue detectada en plantaciones tradicionales de olivo de más de 50 años, en el Dpto. Arauco de la provincia de La Rioja, causando el Síndrome del Decaimiento Rápido del Olivo (SiDRO), observándose un marcado declinamiento que se fue acentuando con los años, principalmente en el cv. Arauco de las localidades de Aimogasta, Villa Mazán y San Pedro (Roca *et al.*, 2014, Haelterman *et al.*, 2015). Posteriormente, fue detectada en los departamentos de Cruz del Eje (Córdoba), Pomán y Andalgalá (Catamarca). En el mismo año fue reportada por primera vez en Europa, en el área de Salento (región de Apulia, Italia), causando el Olive Quick Decline Síndrome (QDOS) que provocó la muerte de gran número de plantas productivas en poco tiempo (Carlucci *et al.*, 2013, Saponari *et al.*, 2013). La sintomatología observada en nuestro país, es semejante a la presente en Italia. Coletta Filho *et al.* (2016) reportaron en plantaciones comerciales del sureste de Brasil, olivos que mostraban síntomas de quemadura en las hojas, idénticos a los observados en olivos en el sur de Italia y en Argentina colonizados por *X. fastidiosa*.

En Argentina, sólo se encuentra *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Xfp), considerada plaga no cuarentenaria reglamentada, si bien en el caso de olivo aún no está completada la reglamentación. En Italia y Brasil también es la subespecie *pauca* la que afecta a los olivos.

aislamientos a partir de vid se utiliza el Periwinkle Wilt (PW) (Davis *et al.*, 1980). Debido a esto, su diagnóstico se realiza a través de pruebas serológicas, principalmente enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Clark and Adams, 1977) y moleculares como polymerase chain reaction (PCR) (Mullis and Faloona, 1987) y quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

(Kubista *et al.*, 2006).

El Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) -CIAP-INTA tiene una gran experiencia trabajando con *X. fastidiosa* en el país. Nome *et al.* (1980), adaptaron la técnica serológica ELISA para el diagnóstico de estas bacterias en tejidos vegetales. Nome *et al.* (1992) y Haelterman *et al.* (1995) detectaron por primera vez *X. fastidiosa* infectando almendros y malezas presentes en los montes de la provincia de Catamarca a través de técnicas serológicas y microscopía electrónica. Posteriormente, se puso a punto el diagnóstico de ALS y CVC con pruebas moleculares, a través de PCR convencional y cuantitativo (Haelterman *et al.*, 1997, Haelterman *et al.*, 2011a, Haelterman *et al.*, 2011b).

Dentro de las pruebas ELISA, la más utilizada es Enzyme Linked Immunosorbent Assay Double Sandwich Antibody-DAS ELISA (Clark and

Adams, 1977) ya que es una técnica robusta y rápida, que permite analizar un elevado número de muestras. Para esta técnica, se necesitan reactivos específicos, si bien el laboratorio AGDIA (EE. UU.) los ofrece, tienen el inconveniente del alto costo. Por tal motivo, en el IPAVE se comenzó a producir antisueros a partir de una cepa local aislada de olivo, elaborando los reactivos (inmunoglobulina y conjugado) y poniendo a punto la técnica DAS ELISA para su diagnóstico (Figura 1) con resultados comparables a los obtenidos con el kit comercial AGDIA (Tolocka *et al.*, 2021a). Esto permite realizar relevamientos a gran escala y abastecer a aquellos laboratorios que lo demandan. Estos reactivos fueron evaluados en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) de Valencia, España, donde reconoció cepas de las subespecies *pauca* y *fastidiosa*.

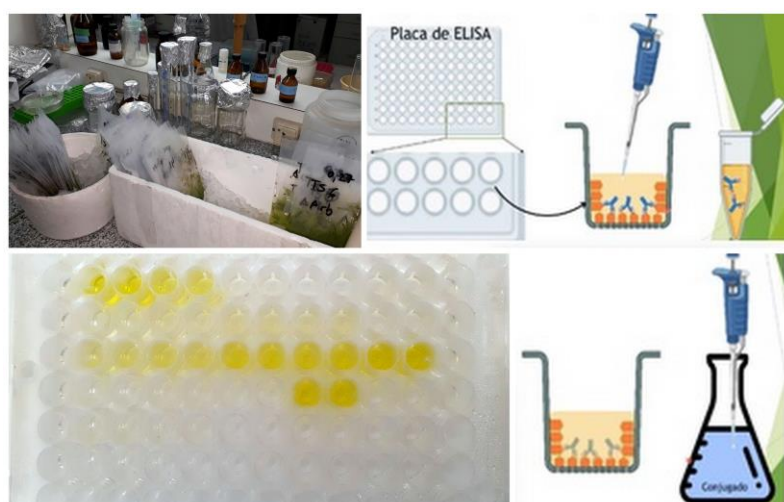


Figura 1. Procedimiento de la metodología DAS ELISA, en placas de poliestireno, a partir de material vegetal de olivo infectado con *X. fastidiosa*. Las celdillas con color amarillo corresponden a una reacción positiva.

Otra prueba empleada para la detección de la bacteria son las técnicas moleculares PCR y qPCR, que son más sensibles que las serológicas, permitiendo detectar al patógeno con bajas concentraciones en plantas infectadas, y en algunos casos sobre muestras asintomáticas. Es una de las técnicas empleadas para analizar plantas madres de

las cuales se seleccionará material vegetal para su multiplicación.

Para PCR, hay varios cebadores propuestos para su detección, siendo los más usados los de Minsavage *et al.* (1994), dado que reconocen la mayoría de las subespecies (Figura 2 y 3).

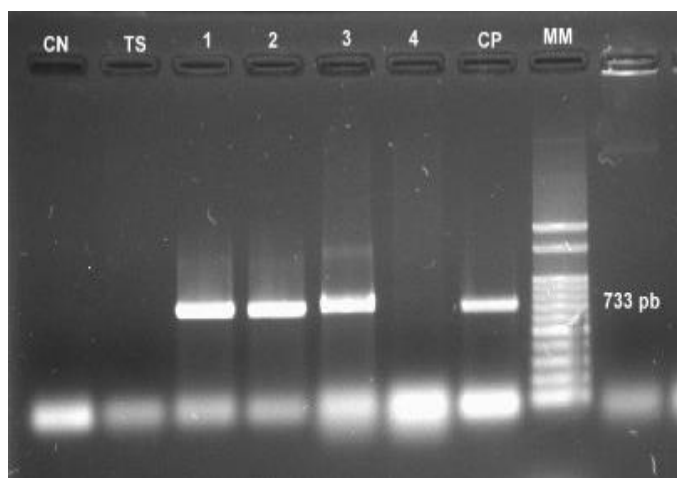


Figura 2. PCR convencional material vegetal de olivo infectado por *X. fastidiosa* subsp. *pauca* con cebadores universales RST31 y RST33 para la bacteria. Calles 1 a la 3: muestras positivas para Xfp, 4: muestra negativa para Xfp, CP: Control positivo de Xfp (planta enferma), TS (planta sana), CN (control negativo-agua), MM (marcador de peso molecular Ladder 100pb.).

Figura 3. Los productos obtenidos en el PCR, se observan en geles de agarosa teñidos con GelRed para poder visualizarlos (Figura 2). Para ello, se debe sembrar la reacción de PCR en el gel de agarosa y luego se realiza la corrida electroforética en cubas como la que se observa en la foto.



Para la técnica qPCR, los cebadores más usados son los de Harper *et al.*, 2010-erratum 2013, con sonda Taqman (Bulletin EPPO PM24/7(5) *Xylella fastidiosa* <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/epp.12923>). En nuestro laboratorio incluimos un control interno

(COX) (Li *et al.*, 2006) que detecta un gen de la planta asegurando una adecuada reacción, permitiendo determinar la calidad del ADN de cada muestra (Figuras 4 y 5).

Figura 4. Termociclador en Tiempo Real donde se lleva a cabo la reacción de qPCR. Cuenta con un rotor donde se ubican las muestras a analizar (Tubos de 0,2 mL), un sistema óptico (canales con diferentes longitudes de onda UV a infrarroja) y un software para analizar la reacción.



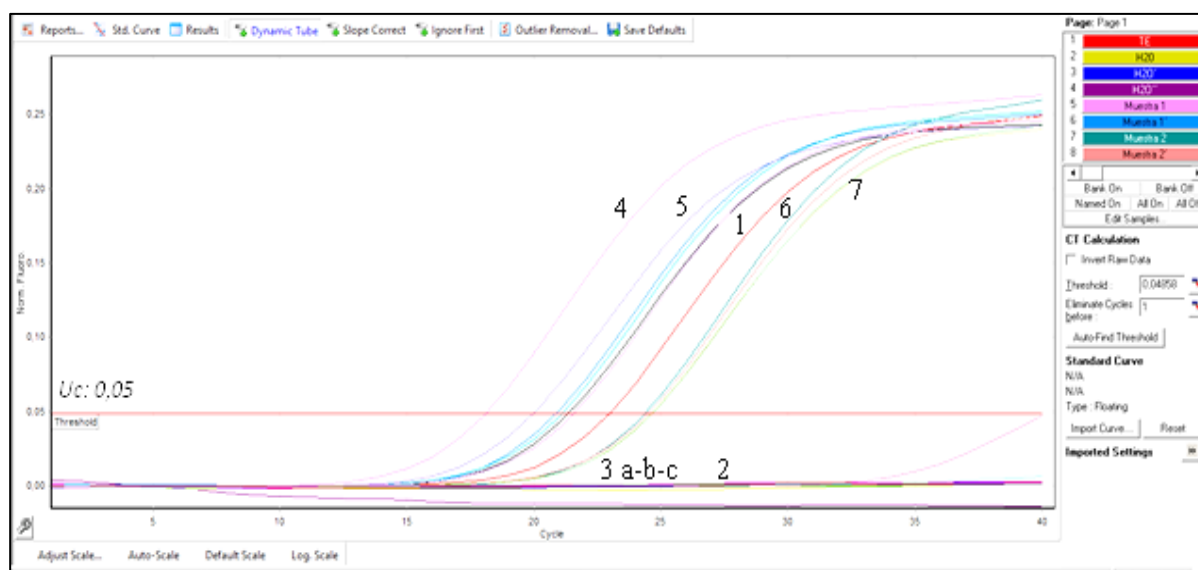


Figura 5. Diagnóstico por qPCR para detectar *X. fastidiosa* subsp. *pauca* en muestras de olivo. Control enfermo (Ce) (curva 1): suspensión bacteriana de Xfp. Control sano (Cs) (línea 2): ADN de planta de olivo sana. Controles blancos (Cb) (líneas 3a-b-c) muestras de agua. Muestra oli1 (curva 4) y su duplicado (curva 5), Muestra oli2 (curva 6), y su duplicado (curva 7) positivas para Xfp.

X. fastidiosa es un patógeno que sólo se localiza en los vasos xilemáticos y es transmitido a través de vectores, su distribución en la planta generalmente no es homogénea, por lo que el proceso de toma de muestra debe ser cuidadosa. En el IPAVE desarrollamos un protocolo para la toma,

acondicionamiento y envío de las muestras de olivo, siendo la mejor época de muestreo desde mediados de primavera hasta fines de otoño, ya que es donde se dan las mejores condiciones ambientales para la multiplicación de la bacteria dentro de la planta

Protocolo para la toma de muestras en olivo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* (Tolocka *et al.*, 2019)

- ❑ Ubicar en la planta la/s rama/s con hojas secas (Figura 6 A, B, D y E).
- ❑ De esas ramas secas, seleccionar brindillas por debajo de ese sector que tengan hojas con los siguientes síntomas: hojas color verde seco (opaco), enrolladas y preferentemente con necrosis apical (punta de flecha-PF) o en los bordes (Figura 6 C y F).
- ❑ Importante: para el diagnóstico sólo se emplea material vegetal turgente/vivo con sintomatología sospechosa.
- ❑ En plantas con la copa muy deteriorada (decaimiento) se pueden tomar las muestras de los "chupones" que presenten los mismos síntomas.
- ❑ Tener en cuenta que se necesitan entre 6 a 10 ramitas por muestra (planta).
- ❑ Colocar las brindillas en una bolsa plástica (sin papel húmedo), identificando la planta por número de planta y fila (rotulando con lápiz) o georreferenciándola, colocando la etiqueta por fuera de la bolsa.
- ❑ Colocar en una conservadora con refrigerantes (puede ser botella plástica con agua congelada, no utilizar hielo). Posteriormente conservar las muestras en un lugar fresco (heladera) hasta su posterior envío.
- ❑ Enviar por encomienda lo más rápido posible para evitar el deterioro fisiológico del material para realizar un correcto diagnóstico del mismo. Avisar fecha de envío, número de guía y empresa por la que lo transporta. El envío realizarlo a nombre de IPAVE- INTA.

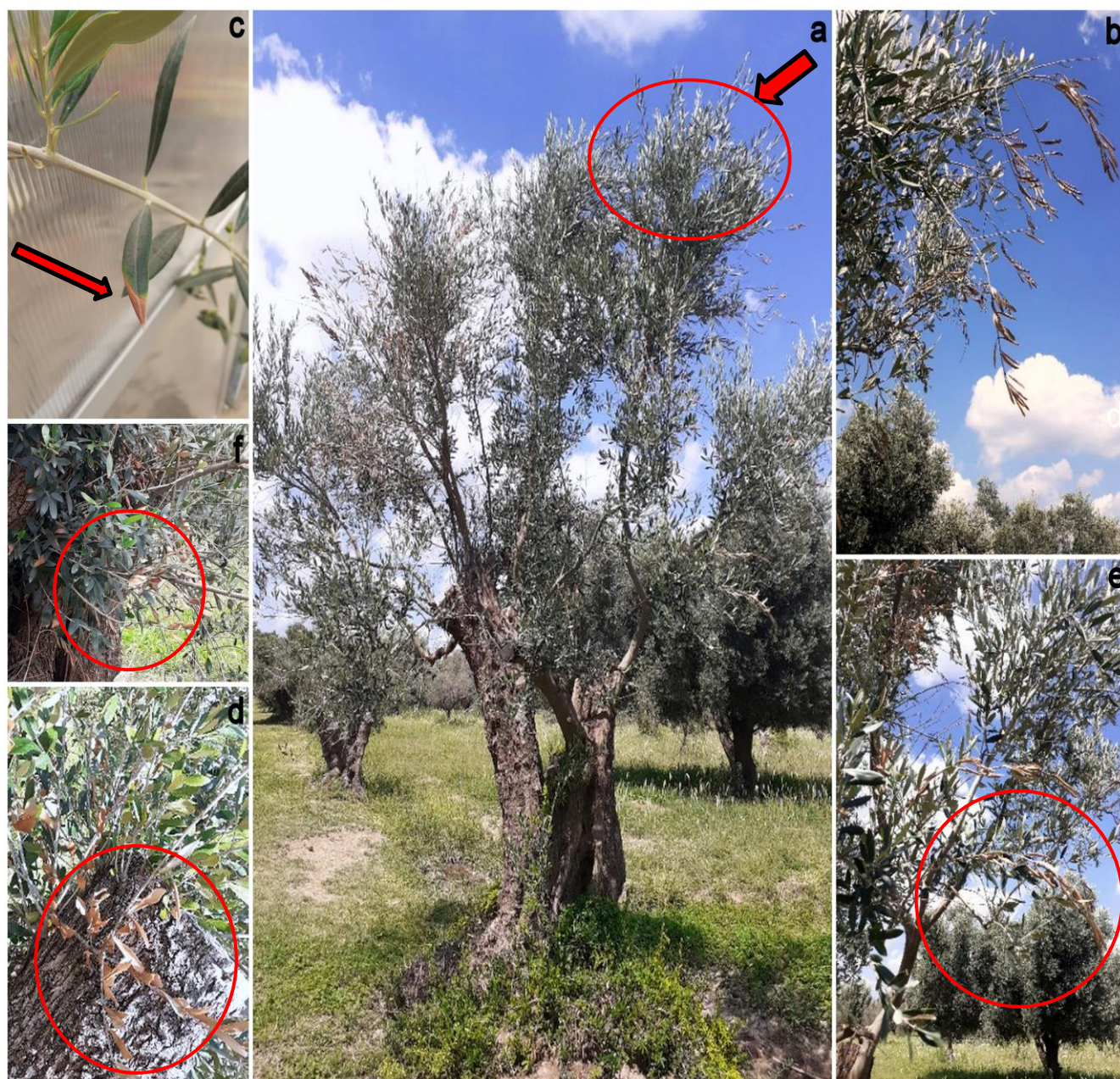


Figura 6. A. Planta de olivo con avanzado decaimiento procedente del Dpto. Cruz del Eje (Córdoba), febrero 2021. B-E. Síntoma de rama seca en el extremo superior de la copa. C. Necrosis apical en las hojas. D-F. “Chupones” con síntomas sospechosos de Xfp. Tolocka 2021.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y RESPUESTA DE DOS CULTIVARES DE OLIVO FRENTE A LA INFECCIÓN DE *X. fastidiosa* subsp. *pauca*

X. fastidiosa es una bacteria genéticamente diversa que actualmente comprende las siguientes subespecies: *fastidiosa*, *pauca*, *multiplex*, *sandyi*, *morus* y *tashke*. La caracterización taxonómica actualmente se realiza por el sistema de tipificación “Multilocus Sequence Typing” (MLST) (Yuan *et al.*, 2010) pudiendo definir subespecies

y asignar el grupo genético o tipo de secuencia (SequenceType-ST) a cada aislamiento bacteriano. Los MLST se basan en el análisis comparativo de las secuencias de siete genes constitutivos, definiendo un perfil alélico único para cada ST. Mediante esta técnica se caracterizaron aislamientos de la bacteria proveniente de

olivo de las provincias de La Rioja, Córdoba y Catamarca, identificando hasta el momento los grupos genéticos ST69, ST78 y ST90. El ST78 también se lo encontró en almendro y el ST69 en cítricos, perteneciendo ambos a la subespecie *pauca*. Con respecto al ST90, se está trabajando para determinar la subespecie a la que pertenece. Estos ST sólo están presentes en Argentina.

En el año 2022 (Fernández *et al.*, 2023) se logró la secuenciación del genoma completo de tres cepas de *X. fastidiosa* de nuestro país, dos de olivo de La Rioja (OLI17A y AM2-Angelina, ambas ST69), y una de almendro de Catamarca (ALM4, ST78), empleando las plataformas Illumina y Nanopore. El análisis reveló que los tres genomas codifican numerosos genes de virulencia implicados en la motilidad y la adhesión, aunque ciertas cepas carecen de algunos factores antivirulencia. También se identificaron plásmidos similares a los encontrados en cepas de *X. fastidiosa* presentes en cítricos de Sudamérica y olivos de Europa. El análisis genómico comparativo y la reconstrucción filogenética mostraron que las cepas argentinas se diferencian genéticamente de las encontradas en otros países, forman grupos distintos dentro de la subsp.



pauca secuenciada hasta ahora, y están estrechamente relacionadas con cepas de cítricos previamente reportadas en Argentina y Brasil. La disponibilidad de estas secuencias del genoma puede mejorar nuestra comprensión de cómo se desarrolla esta enfermedad en Argentina y proporciona datos valiosos para futuros estudios sobre genómica comparada, mecanismos de virulencia y epidemiología.

Para verificar la patogenicidad de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* se realizaron pruebas de patogenicidad, evaluando el comportamiento de dos cultivares de olivo, uno observado como susceptible (cv. Arauco) por el marcado decaimiento detectado a campo y otro como tolerante (cv. Frantoio) frente a la bacteria. Se infectaron 11 plantas de cada cultivar, incorporando también controles inoculados buffer. El procedimiento utilizado fue el llamado pinprick (pinchazo de alfiler) (Lopes *et al.*, 2005, Saponari *et al.*, 2017), empleando una aguja hipodérmica estéril y agregando la suspensión bacteriana con micropipeta, para infectar las plantas de olivo (Figura 7). Se dejaron en invernáculo y se analizaron por qPCR a los 4, 7, 12, 16 y 24 meses en los nudos subsiguientes.

Figura 7. Procedimiento de transmisión de Xfp en olivo cv. Arauco. Colocación de una gota del inóculo de la bacteria sobre cada pinchazo, realizado con la técnica pinprick.

La aparición de los primeros síntomas de la enfermedad [secado en la parte superior de las ramas y necrosis apical o punta de flecha (PF) en las hojas] fue al año y medio en el 50% de las plantas inoculadas del cv. Arauco. A los dos años de realizadas las inoculaciones, el 82% de las plantas del cv Arauco dieron positivo para la bacteria en qPCR, mientras

que en el cv. Frantoio sólo una planta fue positiva, sin mostrar síntomas. La bacteria fue reaislada de un olivo del cv. Arauco completando así los Postulados de Koch. De esta manera, en condiciones controladas de invernadero se lograron reproducir los síntomas observados a campo (Tolocka *et al.*, 2021b, Tolocka, 2022) (Figura 8)..



Figura 8. Olivo cv. Arauco infectado con la bacteria a partir de la cual se aisló *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Xfp). Tolocka, 2020. IPAVE – INTA. Córdoba.

CONCLUSIONES

La bacteria está presente en nuestro país desde hace varios años, y ha sido detectada hasta el presente en cultivos de olivo, almendro y cítricos, y también en malezas. Hasta la actualidad, sólo ha sido identificada la subespecie *pauca*, siendo éste un punto importante a tener en cuenta ya que se debe evitar la entrada de otras subespecies realizando controles a los materiales vegetales que se importan, como así también realizar la caracterización de la bacteria en nuevas zonas y hospedantes. Los relevamientos en montes de olivo y de otros hospedantes permiten la detección temprana de la bacteria y limitar su expansión. En el IPAVE se realizan los diagnósticos de *X. fastidiosa* tanto por técnicas serológicas como moleculares, además de capacitar a técnicos de diferentes Instituciones tanto privadas como estatales para implementar su diagnóstico, además de proveer

de los reactivos necesarios para serología. A partir de los resultados obtenidos, se busca continuar con los relevamientos en las principales regiones olivícolas del país, con el objetivo de detectar este patógeno en nuevas plantaciones tradicionales e intensivas y en hospedantes alternativos. Esto nos permitirá detectar la posible entrada y/o existencia de otras subespecies, caracterizando la bacteria a través de herramientas moleculares, con la finalidad de tomar adecuadas medidas preventivas antes de que se establezca la bacteria en el lugar. Finalmente, queremos resaltar que realizar un diagnóstico precoz de la bacteria es fundamental para evitar la dispersión de este patógeno en nuevas áreas productivas evitando la infección en otros hospedantes de importancia agrícola para nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brlansky, R.H., Davis, C.L., Timmer, L.W., Howd, D.S. and J. Contreras. 1991. Xylem limited bacteria in citrus from Argentina with symptoms of citrus variegated chlorosis, *Phytopathology*, 81, 1210.
- Bulletin EPPO, PM24/7(5) *Xylella fastidiosa* <https://doi.org/10.1111/epp.12923>
- Clark, M.F., A.N. Adams. 1977. Characteristic of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, *Journal of General Virology* 34, 475- 483.
- Carlucci, A., Lops, F., Marchi, G., Mugnai, L., G. Surico. 2013. Has *Xylella fastidiosa* “chosen” olive trees to establish in the Mediterranean basin?. *Phytopathologia Mediterranea Current Topics*, 52(3), 541–544.
- Coletta-Filho, H., Francisco, C., Lopes, J., De Oliveira, A. and L.F. Da Silva. 2016. First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. *Phytopathologia Mediterranea*. 55, 1: 130–135.
- Davis, M.J., Purcell, A.H. and S.V. Thomson. 1980. Isolation medium for Pierce’s disease bacterium, *Phytopathology*, 70, 425-429.
- Davis, M.J., Purcell, A.H. and S.V. Thompson. 1978. Pierce’s disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science* 199:75-77.
- Fernández, F.D., Arias-Giraldo, L.F., Tolocka, P.A., Guzmán, F.A., Roca, M.E., Otero, M.L., Conci, R.L., Haelterman, R.M. and B.B. Landa. 2023. First report of genomic sequencing of strains of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* obtained from olive (*Olea europaea* L.) and almond (*Prunus dulcis* Mill.) trees from Argentina. 4th European conference on *Xylella fastidiosa*. Lyon, France.
- Fernandez Valiela, M.V. y M. Bakarcic. 1954. Nuevas enfermedades del ciruelo en el Delta del Paraná. *IDIA* 84: 2-6.
- French, W.J., and E.W. Kitajima. 1978. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. *Plant Disease Reporter* 62 (12):1035-1038.
- Goheen, A.C., Nyland, G. and S.K. Lowe. 1973. Association of a Rickettsialike Organism with Pierce’s Disease of Grapevines and Alfalfa Dwarf and Heat Therapy of the Disease in Grapevines. *Phytopathology* 63:341-345.
- Haelterman, R. M., Tolocka, P. A., Roca, M. E., Guzmán, F. A., Fernández, F. D. and M.L. Otero. 2015. First presumptive diagnosis of *Xylella fastidiosa* causing Olive scorch in Argentina. *Journal Plant Pathology*, 97(2), 393-393.
- Haelterman R.M, P.A. Tolocka, S.F. Nome y B.I. Canteros. 2011a. Diagnóstico de *Xylella fastidiosa*, causante de la clorosis variegada de los citrus por PCR convencional y qPCR. Resúmenes 2º Congreso Argentino de Fitopatología, Mar del Plata. ISBN 978-987-544-389-1 p. 172
- Haelterman R.M, Tolocka, P.A. y M.L. Otero. 2011b. Detección de la clorosis variegada de los citrus (CVC) por PCR sin extracción de DNA convencional. Resúmenes 2º Congreso Argentino de Fitopatología, Mar del Plata. ISBN 978-987-544-389-1, p. 171.
- Haelterman, R.M., Docampo, D.M., Nome, S.F. y D.A. Ducasse. 1997. Detección de *Xylella fastidiosa* en tejidos vegetales por PCR. *Actas del IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología*. Montevideo, Uruguay, p. 33.
- Haelterman, R.M., Nome, C.F., Docampo, D.M., S.F. Nome. 1995. Hospedantes de *Xylella fastidiosa*, bacteria causal de la escaldadura del borde de la hoja del almendro (*Prunus amygdalus*), *RIA* 26(2), 65-72.
- Harper, S.J., Ward, L.I., G.R.G. Clover. 2010, erratum 2013. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications, *Phytopathology* 100(12) 1282-1288.
- Krügner, R., Sisterson, M.S., Chen, J., Stenger, D.C., M.W. Johnson. 2014. Evaluation of olive as a host of *Xylella fastidiosa* and associated sharpshooter vectors. *Plant Disease*, 98(9), 1186-1193.
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlberg A., N. Zoric. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27(2-3):95-125. doi: [10.1016/j.mam.2005.12.007](https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007). Epub 2006 Feb 3. PMID: 16460794.
- Li, W., Hartung, J. S., L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing, *Journal of Microbiological Methods* 66(1) 104-115.
- Lopes, S.A., Teixeira, D.C, Fernandes, N.G., A.J. Ayres. 2005. An experimental inoculation system to study Citrus-*Xylella fastidiosa* interactions, *Plant Disease* 89(3) <https://doi.org/10.1094/PD-89-0250>.
- Minsavage, G.V., Thompson, C.M., Hopkins, D.L., Leite, R. M. V., R.E. Stall. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, 84, 456-461.
- Mullis, K.B., and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods of Enzymology* 155: 335- 350.
- Nome, S. F., Haelterman, R. M., Docampo, D. M., Prata-viera, A. G. y L. del V. Di Feo. 1992. Escaldadura de las hojas del almendro en Argentina, *Fitopatología Brasileira*, 17, 57-60.
- Nome, S.F., B.C. Raju, A.C. Goheen, G. Nyland, and D.M. Docampo. 1980. Enzyme linked immunosorbent assay for Pierce’s disease bacteria in plant tissue. *Phytopathology* 70:746-749.
- Roca, M.E., Tolocka, P.A., Otero, M.L., Pérez, J.C. y R.M. Haelterman. 2014. Primera detección de *Xylella fastidiosa* en olivares en los departamentos Arauco y Castro Barros (La Rioja). 3º Congreso Argentino de Fitopatología, Tucumán, p. 169.
- Saponari, M., Boscia, D. Altamura, G., Loconsole, G., Zicca, S., D’Attoma, G., Morelli, M., Palmisano, F., Saponari, A.,

- Tavano, D., Savino, V. N., Dongiovanni, C. and G.P. Martelli. 2017. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* associated to the olive quick decline syndrome in southern Italy, Scientific Reports, 7:17723. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17957-z0>.
- Saponari, M., Boscia, D., Nigro, F. and G.P. Martelli. 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). Journal of Plant Pathology, 95(3), 659-668.
- Su, C.C., Deng, W.L., Jan, F.J., Chang, C.J., Huang, H., Shih, H.T. and J. Chen. 2016. *Xylella taiwanensis* sp. nov., causing pear leaf scorch disease. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66, 4766–4771.
- Tolocka, P.A. 2022. Caracterización de la bacteria *Xylella fastidiosa* en plantaciones de olivo de Argentina. Tesis Doctoral. Escuela para Graduados de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. URI: <http://hdl.handle.net/20.500.12123/14288>
- Tolocka, P.A., Giolitti, F., Guzmán, F.A., Mattio, M.F., Nome, C.F., Ortega, L.I., Paccioretti, M.A., Roca, M.E., Otero, M.L., R.M. Haelterman. 2021a. Caracterización de *Xylella fastidiosa* a partir de materiales vegetales y cepas aisladas de olivo (*Olea europaea* L.) e implementación de un sistema de diagnóstico serológico en Argentina, RIA, 47(3), 38-389.
- Tolocka, P.A., Guzmán, F.A., Giannini Kurina, F. y R.M. Haelterman. 2021b. Respuesta de dos cultivares de olivo (*Olea europaea* L.) frente a la infección de una cepa argentina de *Xylella fastidiosa*. 5º Congreso Argentino de Fitopatología.
- Tolocka, P.A., Paccioretti, M.D. y R.M. Haelterman. 2019. Anexo I: Toma de muestras en olivo para diagnóstico de *Xylella fastidiosa*. En: Manual de protocolos de manejo de plagas y patologías del olivo. Eds. https://www.researchgate.net/publication/346397235_Manual_de_protocolos_de_manejo_de_plagas_y_patologias_del_olivo#fullTextFileContent [accessed Jun 23 2021]
- Wells, J.M., Raju, B.C., Hung, H.Y., Weisburg, W.G., Mandeco, P.L., D.J. Brenner. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. International Journal of Systematic Bacteriology, 37,136- 143.
- Wells, J. M., Raju, B. C., Nyland, G., S.K. Lowe. 1981. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases, Applied and Environmental Microbiology, 42(2), 357-363.
- Yuan, X., Morano, L., Bromley, R., Spring-Pearson, S., Stouthamer, R. and L. Nunney. 2010. Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. Ecology and Epidemiology. Phytopathology, 100 (6): 601-610.