

Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas, México

Laura Glenys Polanco Florián¹
Omar Guadalupe Alvarado Gómez^{1§}
Orquídea Pérez González¹
Ramiro González Garza²
Emilio Olivares Sáenz¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León-Ciudad Universitaria. Avenida Universidad s/n, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. CP. 66455. Tel. 01(811) 060 9649 y 275 4609. (polancolaura7@gmail.com; orquideapg@hotmail.com; emolivares@gmail.com). ²Biociencia S. A. de C.V. Agustín Melgar 2317 Norte, Colonia Reforma, Monterrey, Nuevo León, México. CP. 64550. Tel. 01(811) 3246160. (biociencia01@prodigy.net.mx).

Autor para correspondencia: omar.alvaradogm@uanl.edu.mx.

Resumen

El cultivo de cítricos es afectado por varios hongos fitopatógenos, los cuales pueden causar enfermedades y reducir su producción. El hongo *Lasiodiplodia* spp. causa muerte regresiva y otros síntomas en cítricos y en otros cultivos en diversos países, incluyendo México. El objetivo de este trabajo fue identificar cepas fúngicas aisladas de árboles de cítricos con síntomas de muerte regresiva y evaluar su patogenicidad en condiciones de invernadero. Los hongos aislados fueron identificados con base en sus características morfológicas como *Lasiodiplodia theobromae*, *Fomitopsis meliae* y *Eutypella citricola*, confirmados con la amplificación por PCR y secuenciación de la región ITS al comparar con las secuencias del GenBank. En el bioensayo de invernadero se comprobó que *L. theobromae* y *F. meliae* provocan síntomas de marchitez, muerte descendente y lesiones necróticas en las áreas inoculadas a partir del cuarto día posterior a la inoculación en plantas de naranjo dulce variedad Valencia. *F. meliae* + *L. theobromae* causaron daños más severos, provocando lesiones necróticas de 22 a 27 cm de longitud, marchitez y muerte regresiva y ambos fueron reaislados a partir de las lesiones producidas. *E. citricola* sólo produjo necrosis alrededor del área inoculada. De acuerdo con los resultados de la prueba de patogenicidad, los hongos *L. theobromae* y *F. meliae* causan muerte regresiva de los cítricos.

Palabras clave: *Lasiodiplodia*, hongos fitopatógenos, patogenicidad.

Recibido: marzo de 2019

Aceptado: mayo de 2019

Introducción

El cultivo de cítricos es afectado por varios hongos fitopatógenos, los cuales pueden causar diversas enfermedades y reducen su producción. Estos patógenos causan lesiones en las hojas, canchales, necrosis, pudriciones de raíces, pedúnculos y frutos, marchitez, muerte de ramas y muerte regresiva (McBride *et al.*, 2010; Adesemoye *et al.*, 2014). El hongo *Lasiodiplodia* spp. ha sido reportado como causante de muerte regresiva y otros síntomas en cítricos y en una amplia gama de cultivos (Adesemoye *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2016).

En México, la pudrición del pedúnculo y muerte regresiva de ramas fue observada en árboles de mango (*Mangifera indica* L.) en los estados de Guerrero y Michoacán. Los patógenos identificados fueron *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* y *Neofusicoccum parvum* (Sandoval *et al.*, 2013). En Guerrero, se reportó la especie *L. theobromae* en árboles de zapote mamey (*Pouteria zapota* [Jacq] H. E. Moore and Stearn) ocasionando marchitez, muerte de la yema apical y consecuentemente muerte descendente con secamiento gradual a los 22 días después del injerto (Tovar *et al.*, 2013). En Nayarit, la muerte regresiva ha sido observada en huertos de guanábano, iniciando en las ramas, las cuales continuaban secándose desde la punta hacia la base y se pudo identificar a *L. theobromae* como el agente causal (Hernández *et al.*, 2013).

La patogenicidad de *Lasiodiplodia* spp. ha sido objeto de estudio en diferentes cultivos, Al-Sadi *et al.* (2014) aislaron a *L. theobromae* a partir de árboles de lima (*Citrus aurantifolia* S.), inocularon al hongo y produjeron síntomas de muerte regresiva en 40% de las plantas inoculadas de las cuales fue reaislado posteriormente. De la misma manera Cedeño y Palacios (1992), demostraron mediante los postulados de Koch que *L. theobromae* produjo gomosis y lesiones en las plantas de cítricos inoculadas, síntomas parecidos a los observados en el campo. Al mismo tiempo, las características morfológicas y las dimensiones de los conidios reaislados, permitieron asociar a *L. theobromae* como el causante de la enfermedad.

A principios del año 2015, citricultores del estado de Sinaloa reportaron la muerte regresiva de árboles en limón persa (*Citrus latifolia* Tan). En ese mismo año, productores de Nuevo León reportaron la muerte de ramas en dirección descendente al tronco principal en limón persa y naranja dulce (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) variedad Valencia injertada sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.); posteriormente, también se observaron síntomas similares en huertas de cítricos en el estado de Tamaulipas. En varios de los casos se aisló e identificó a *Lasiodiplodia* spp. como el posible agente causal; sin embargo, no existen publicaciones al respecto. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar cepas fúngicas aisladas de árboles de cítricos con síntomas de muerte regresiva y evaluar su patogenicidad bajo condiciones de invernadero.

Materiales y métodos

Muestreo de plantas y aislamiento de hongos

El muestreo fue dirigido hacia árboles de naranja dulce (*Citrus sinensis* L.) con síntomas de muerte regresiva y necrosis en el tronco y ramas, recolectados en huertas de los municipios de General Terán y Montemorelos, Nuevo León, y Llera de Canales, Tamaulipas.

Los tejidos afectados con síntomas de necrosis y muerte regresiva fueron cortados en secciones de aproximadamente 1 cm en la zona de transición entre la parte necrótica y la parte aparentemente sana, se desinfectaron con blanqueador comercial al 10% por 1 min, posteriormente se lavaron con agua bidestilada, se sembraron en cajas Petri con papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a 25 ± 2 °C con un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad (Marques *et al.*, 2013). Los hongos aislados se resembraron mediante el método de punta de hifa en agar agua y se incubaron en las mismas condiciones de luz y temperatura durante 4 semanas, con el fin de obtener cepas puras (Twizeyimana *et al.*, 2013).

Identificación morfológica y molecular de hongos

Para la identificación morfológica de los hongos aislados se tomaron características culturales como crecimiento, color, tipo y forma de la colonia, además la velocidad de crecimiento (Úrbaz *et al.*, 2013) observados con el microscopio en preparaciones de los hongos teñidos con lactofenol. La identificación de las especies de hongos se realizó utilizando las claves de Phillips *et al.* (2013).

Para la identificación molecular, las cepas se cultivaron en PDA a 25 ± 2 °C por 7 días. La extracción del ADN se realizó utilizando el DNeasy Plant Mini Kit^{MR} (Qiagen, Inc.) con ligeras modificaciones a las instrucciones del fabricante y el ADN fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro Take3^{MR} (Bioselec).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en volúmenes de 25 µL. Se amplificó la región ITS-1, gen ribosomal 5.8S e ITS-2 utilizando los oligonucleótidos ITS-1 fu 5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3' e ITS-4 5'-tcctccgcttattgatgc-3' (White *et al.*, 1990).

Para las reacciones se utilizaron 5 µL de solución amortiguadora de PCR 5X, 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de dNTP's (2.5 mM), 0.2 µL de la enzima go-Taq (5U µL⁻¹) (Promega^{MR}), 9.8 µL de agua grado Mili-Q, 2 µL de cada primer (10 pmol µL⁻¹) y 2 µL de ADN. La PCR consistió de un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 20 s, 55 °C por 25 s y 72 °C durante 50 s, seguido de un paso de elongación final por 4 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1%, previamente teñido con 0.5 ng µL⁻¹ de bromuro de etidio y se compararon con un marcador de peso molecular (ladder-100^{MR}, Axygen).

Los productos de la PCR obtenidos fueron secuenciados en la compañía Macrogen (EE. UU.) y comparados con secuencias del GenBank para confirmar la identidad de hongos a nivel de especie.

Evaluación de la patogenicidad de los hongos aislados

Para determinar la patogenicidad de las cepas aisladas se realizó un bioensayo en condiciones de invernadero en las instalaciones de la Facultad de Agronomía de la UANL localizadas en Gral. Escobedo, NL. Este municipio se localiza a 25° 47' 5.98" latitud norte y 100° 17' 12.12" longitud oeste a una altura de 481 msnm.

Para la evaluación de la patogenicidad se utilizaron plantas de naranjo dulce (*C. sinensis*) variedad Valencia de un año de injertadas, las cuales median de 60 a 75 cm de altura y se obtuvieron de un vivero comercial. El inóculo se obtuvo cultivando los hongos en PDA durante 6 días a 25 ± 2 °C y 50% de humedad relativa.

Se estableció un diseño completamente al azar con 9 tratamientos. Tres tratamientos con los hongos individualmente, tres tratamientos donde las diferentes cepas fueron combinadas por parejas, un tratamiento con la combinación de las tres cepas, un control (plantas inoculadas con PDA estéril) y un control absoluto de plantas en las cuales sólo se realizó el corte (Cuadro 1). Para cada tratamiento se utilizaron tres repeticiones.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos utilizados en la evaluación de la prueba de patogenicidad de los hongos aislados.

Tratamientos	Número
Control absoluto (corte)	1
Control (PDA estéril)	2
<i>Fomitopsis meliae</i> (F)	3
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (L)	4
<i>Eutypella citricola</i> (E)	5
F+L	6
F+E	7
L+E	8
F+L+E	9

Para la inoculación de los hongos, a las plantas se le realizaron heridas longitudinales de 1 cm utilizando navajas estériles. La corteza fue desprendida ligeramente a modo de pestaña, provocando una herida por planta. En la herida se inocularon los hongos colocando discos miceliales de 5 mm de diámetro tomados del margen del crecimiento micelial, luego se cerró la pestaña y se cubrió con parafilm para evitar la desecación del hongo y de la planta. Se realizaron observaciones periódicas a intervalos de siete días para medir la longitud de las lesiones. De las plantas inoculadas con síntomas de necrosis y muerte regresiva, se procedió a reaislar e identificar los hongos fitopatógenos siguiendo el método previamente descrito.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (Anova) para determinar la efectividad media de cada tratamiento y una comparación múltiple de medias con el método de Tukey ($p \leq 0.05$) con el programa estadístico SPSS 22 (IBM Corp., 2013).

Resultados

Aislamiento, purificación e identificación de hongos

En los cultivos realizados, entre los 2 y 5 días, crecieron varios hongos, los cuales fueron purificados por punta de hifa e identificados mediante sus características morfológicas como *L. theobromae*, el cual en medio PDA mostró inicialmente una coloración de la colonia blanquecina, volviéndose gris y obscureciendo al pasar los días, los conidios inicialmente de forma ovalada, hialinos y sin septos, pero al envejecer el cultivo llegaron a ser septados y adquirieron una coloración café. *Fomitopsis* sp. fue identificado por su micelio aéreo de color grisáceo-negro y

conidios hialinos, unicelulares, ovoides y elipsoidales. *E. citricola* fue identificado por su crecimiento colonial de color blanco, con micelio aéreo y al madurar formó picnidios oscuros y dispersos. Los conidios presentes fueron hialinos, filiformes, unicelulares y algunos con forma curvada.

Con respecto a la identificación molecular, se tuvo éxito con la extracción de ADN de las 3 especies de hongos aislados a partir de muestras sintomáticas de naranjo dulce. En los 3 casos se tuvieron en promedio $30 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN con relaciones de absorbancia 260/280 entre 1.8 y 2 indicando buena calidad.

En las reacciones de PCR, se logró la amplificación de ADN de las tres especies de hongos utilizando los primers universales para hongos ITS-1fu/ITS-4. La secuencia consenso de los productos de PCR fue de 515 pb para la región ITS-1, 5.8S e ITS-2, además de secuencias parciales de 18S y 28S RNA. Al comparar las secuencias de ADN de los aislamientos con secuencias del GenBank, en los tres casos coincidieron 99% de similitud con *L. theobromae* (accesión JN048466.1), *F. meliae* (HQ248221.1) y *E. citricola* (KM396616.1).

Prueba de patogenicidad

Cuatro días posteriores a la inoculación, las plantas inoculadas con *F. meliae* (tratamiento 3), mostraron síntomas de necrosis, marchitez y muerte de ramas en dirección descendente. Después de 32 días las lesiones necróticas exteriores midieron entre 9.5 y 29 cm de largo, siendo este hongo el causante de síntomas más agresivos de muerte descendente (Cuadro 2, Figura 1). Al finalizar el bioensayo, se realizaron cortes longitudinales de las plantas con síntomas de marchitez, pudiéndose observar en los mismos, manchas de color café en los tejidos vasculares.

Cuadro 2. Longitud promedio de las lesiones en tallos en los tratamientos de inoculación con hongos en plantas de naranjo dulce (*C. sinensis*).

Tratamientos	Longitud de las lesiones ¹ (cm)
3 <i>Fomitopsis meliae</i> (F)	25 ±1.52 a
6 F + L	22 ±8.11 a
9 F + L + E	3 ±1.33 b
7 F + E	3 ±0.96 b
4 <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (L)	2 ±0.4 b
8 L + E	2 ±0.43 b
5 <i>Eutypella citricola</i> (E)	1.56 ±0.51 b
1 Control absoluto (corte)	0 b
2 Control (PDA estéril)	0 b

¹= promedio de tres repeticiones ±2 desviaciones estándar a los 32 días después de la inoculación. Tratamientos con la misma letra no tienen diferencia significativa al nivel de significancia 0.05.

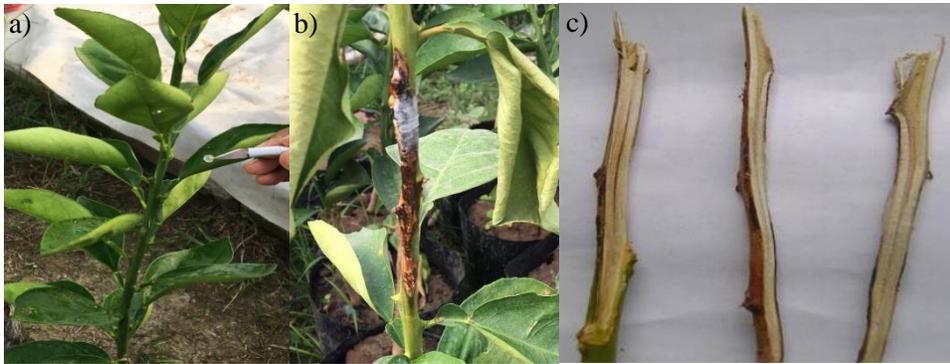


Figura 1. Prueba de patogenicidad de hongos causantes de muerte regresiva en naranjo dulce (*C. sinensis* L.). a) inoculación con discos de micelio; b) síntomas de muerte regresiva; y c) haces vasculares del tallo.

En los tratamientos en los cuales se utilizó como inóculo a *E. citricola*, los síntomas fueron menos agresivos, ya que solamente se observó necrosis de 1 a 4 cm alrededor de la zona inoculada, pero no expresaron síntomas de marchitez.

De todas las plantas inoculadas se realizaron montajes directos en laminillas y resiembras en PDA. Las características morfológicas y de crecimiento colonial fueron similares a las descritas previamente para las cepas de *F. meliae* y *L. theobromae* utilizadas para la inoculación. La secuenciación de ADN de los productos de PCR coincidieron en 99% únicamente para *L. theobromae* y *F. meliae*, para el re-aislamiento de *E. citricola* a partir de las plantas inoculadas no fue posible la amplificación por PCR y por lo tanto tampoco la secuenciación de ADN.

Discusión

Está reportado que el género *Lasiodiplodia* spp. y otros géneros pertenecientes a la familia Botryosphaeraceae causan muerte regresiva en diversas especies leñosas (Adesemoye *et al.*, 2014). Otros síntomas comunes son gomosis, cancrrosis, pudrición del pedúnculo y frutos (McDonald y Eskalen, 2011). En México existen reportes de *L. theobromae* como causante de muerte regresiva en mango, zapote y guanábana (Sandoval *et al.*, 2013; Tovar *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2013), pero no hay ningún reporte en cítricos. En el presente trabajo se logró aislar a *L. theobromae* y se comprobó su patogenicidad. El estudio de esta especie donde no habían sido detectadas resulta de gran interés, ya que algunos factores posiblemente estén influyendo para que produzcan la enfermedad. Uno de esos factores puede ser el estrés por sequía (Mullen *et al.*, 1991), puesto que algunas especies pueden estar presentes en los cultivos como saprófitas y no causar ningún tipo de síntomas (Trakunyingcharoen *et al.*, 2015) hasta que se presenten las condiciones favorables.

Con respecto a la identificación de *F. meliae* causante de este problema en cítricos, estos resultados coinciden con lo reportado por Roccotelli *et al.* (2014), quienes demostraron mediante pruebas de patogenicidad que al inocular a *F. meliae* en ramas de limón (*Citrus lemon*), éste puede colonizar rápidamente las ramas inoculadas, lo que indica que es un patógeno potencial de los cítricos. Nuestros resultados también coinciden con lo reportado por Mayorquin *et al.* (2016), quienes señalan que *Eutypella* sp. causó cancrros y lesiones necróticas en las ramas de cítricos inoculadas. A pesar de que *F. meliae* es un patógeno agresivo (Roccotelli *et al.*, 2014), su patogenicidad disminuyó cuando fue combinado con *E. citricola*.

La longitud de las lesiones varió dependiendo del hongo inoculado. Esta diferencia en el largo de las lesiones puede ser comparado con lo reportado por Chen *et al.* (2014), donde *Lasiodiplodia citricola* produjo cancro y decaimiento en ramas del nogal (*Juglans nigra*) cuando fueron inoculados mediante una suspensión de esporas, a diferencia de la inoculación con discos de micelio. No obstante, el método de inoculación empleado para *Lasiodiplodia* spp. ha demostrado que es un patógeno agresivo, porque provoca necrosis, decoloración vascular, marchitamiento de copa y muerte regresiva (Adesemoye *et al.*, 2014; Linaldeddu *et al.*, 2014).

El hecho de poder reaislar los hongos de las plantas inoculadas, evidencian que se logró la infección porque se registró penetración de las hifas de los patógenos y colonización del sistema vascular de las plantas (Figura 1).

Conclusiones

Se logró el aislamiento de 3 hongos fitopatógenos de árboles de cítricos con síntomas de muerte regresiva en los estados de Nuevo León y Tamaulipas, México. Los hongos fueron identificados como *L. theobromae*, *F. meliae* y *E. citricola* mediante características culturales, morfológicas, moleculares y patogénicas. De las especies identificadas únicamente *L. theobromae* y *F. meliae*, reprodujeron los síntomas de la enfermedad en condiciones de invernadero, las cuales fueron reaisladas y se corroboró su identificación.

Literatura citada

- Adesemoye, A. O.; Mayorquin, J. S.; Wang, D. H.; Twizeyima, M.; Lynch, S. C.; and Eskalen, A. 2014. Identification of species of Botryosphaeriaceae causing bot gummosis in citrus in California. *Plant Disease*. 98:55-61. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0492-re>.
- Al-Sadi, A. M.; Al-Ghaithi, A. G.; Al-Fahdi, N. and Al-Yahyai, R. 2014. Characterization and pathogenicity of fungal pathogens associated with root diseases of citrus in Oman. *Int. J. Agric. Biol.* 16:371-376.
- Cedeño, L. y Palacios, P. E. 1992. Identificación de *Botryodiplodia theobromae* como la causante de lesiones y gomosis en cítricos. *Fitopatol. Venezolana*. 1:10-13.
- Chen, S. F.; Morgan, D. P.; Hasey, J. K.; Anderson, K. and Michailides, T. J. 2014. Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English walnut in California. *Plant Dis.* 98:636-652. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0706-RE>.
- Hernández, F. L. M.; Gómez, J. R. y Agustín, J. A. 2013. Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. *Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. Libro técnico número 1.* 87 p.
- IBM Corp. Released. 2013. IBM SPSS Statistic for Windows, Version 22.0. Armonk, NY. IBM Corp.
- Linaldeddu, B. T.; Deidda, A.; Scanu, B.; Franceschini, A.; Serra, S.; Berraf, T. A.; Zouaoui, B. M.; Ben Jamaa, M. L. and Phillips, A. J. L. 2014. Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine and other woody hosts in Italy, Algeria and Tunisia, with descriptions of *Lasiodiplodia exigua* and *Lasiodiplodia mediterranea* sp. nov. *Fungal Diversity* 71:201-214. DOI 10.1007/s13225-014-0301-x.

- Marqués, M. W.; Lima, N. B.; Morais, M. A.; Michereff, S. J.; Phillips, A. J. L. and Camara, M. P. S. 2013. Botryosphaeria, Neofusicoccum, Neocytalidium and Pseudofusicoccum species associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity* 61:195-208. DOI 10.1007/s13225-013-0258-1.
- Mayorquin, J. S.; Wang, D. H.; Twizeyimana, M. and Eskalen, A. 2016. Identification, distribution and pathogenicity of Diatrypaceae and Botryosphaeriaceae associated with citrus branch canker in the southern California desert. *Plant Dis.* 100:2402-2413. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0362-re>.
- McBride, S.; French, R.; Schuster, G. y Ong, K. 2010. Guía de enfermedades de los cítricos. AgriLife Extension. Texas A&M System. 12 p.
- McDonald, V. and Eskalen, A. 2011. Botryosphaeriaceae species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Dis.* 95:1465-1473. Doi:10.1094 / PDIS-02-11-0136.
- Mullen, J. M.; Gilliam, C. H.; Hagan, A. K. and Morgan, J. G. 1991. Canker of dogwood caused by *Lasiodiplodia theobromae*, a disease influenced by drought stress or cultivar selection. *Plant Disease.* 75:886-889.
- Phillips, A. J. L.; Alves, A.; Abdollahzadeh, J.; Slippers, B.; Wingfield, M. J.; Groenewald, J. Z.; and Crous, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Micology.* 76:51-167. Doi:10.3114/sim0021.
- Roccotelli, A.; Schena, L.; Sanzani, S. M.; Cacciola, S. O.; Mosca, S.; Faedda, R.; Ippolito, A. and Magnano di San Lio, G. 2014. Characterization of basidiomycetes associated with wood rot of citrus in southern Italy. *Phytopathology.* 104:851-858. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-10-13-0272-R>.
- Rodríguez, G. E.; Guerrero, P.; Barradas, C.; Crous, P. W. and Alves, A. 2016. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology.* 121:1-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>.
- Sandoval, S. M.; Nieto, A. D.; Sandoval, I. S.; Téliz, O. D.; Orozco, S. M. y Silva, R. H. V. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia.* 47:61-73.
- Tovar, P. J. M.; Mora, A. J. A.; Nava, D. C.; Téliz, O. D.; Villegas, M. A. and Leyva, M. S. G. 2013. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stern] grafts in Mexico. *Rev. Fitotec. Mex.* 36:233-238.
- Trakunyingcharoen, L.; Lombard, L.; Groenewald, J. Z.; Cheewangkoon, R.; To-anum, C. and Crous, P. W. 2015. *Caulicolus* Botryosphaeriales from Thailand. *Persoonia.* 34:87-99. <http://dx.doi.org/10.3767/003158515X685841>.
- Twizeyimana, M.; Forster, H.; McDonald, V.; Wang, D. H.; Adaskaveg, J. E. and Eskaten, A. 2013. Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado in California. *Plant Dis.* 97:1580-1584. <http://dx.doi.org/10.1094 / PDIS-03-13-0230-re>.
- Úrbaez, T. J. R.; Peduto, F.; Vossen, P. M.; Krueger, W. H. and Gubler, W. D. 2013. Olive twig and branch dieback: etiology, incidence and distribution in California *Plant Dis.* 97:23-244. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0390-re>.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. and Taylor, J. 1990. *PCR Protocols: a guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego, CA. 315-322 pp.