

DETECCIÓN DE UN ORGANISMO TIPO VIROIDE EN OLIVOS (*Olea europaea* L.) CON SÍNTOMAS DE MALFORMACIÓN DE HOJAS¹

Detection of viroid like-organism on olive plants (*Olea europaea* L.) with sickle leaf symptoms

Guido Herrera M.² y Mónica Madariaga V.²

ABSTRACT

A series of tests were conducted on samples from North and Central regions of Chile in order to identify the pathological agent causing sickle leaf symptoms. The plants were tested using double strand RNA, ELISA, mechanical transmission to herbaceous hosts and electron microscopy to identify virus organisms, double run gel electrophoresis to identify viroids and PCR to detect phytoplasm like organisms. Virus or phytoplasms could not be identified, and double run electrophoresis results suggested the presence of viroids in samples showing sickle leaf symptoms.

Key words: *Olea europaea*, virus, phytoplasm.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del olivo (*Olea europaea* L.) en Chile se concentra entre la I y III regiones, con más del 75% del total de hectáreas plantadas en el país. En el valle de Azapa, con más de 1.200 hectáreas plantadas, la mayor parte del material genético corresponde al cv. "Azapa", que probablemente proviene de la variedad Sevillana, el cual se ha propagado vegetativamente constituyendo una población relativamente homogénea. En los últimos años se han introducido nuevas variedades (Sotomayor, 1994), con el objeto de desarrollar el cultivo en la zona bajo la perspectiva de la exportación de aceitunas.

En la zona norte, la falta de antecedentes respecto de enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus, hace necesario investigar la incidencia de estos factores en el desarrollo de las plantas y sus efectos en la variabilidad de la producción. Los antecedentes mundiales (Barba, 1993) indican que las plantas de olivo se ven afectadas por una serie de alteraciones, tales como detención de crecimiento, malformación de hojas, amarillez y hojas encorvadas (sickle leaf), algunas de las cuales han sido atribuidas a problemas de origen viral.

Específicamente, el síntoma de hoja encorvada en olivo ha sido descrito en Italia y Portugal (Thomas, 1958); las hojas con esta malformación presentan además reducción de tamaño y amarillez. Se observa también una reducción en el crecimiento de las ramas y reducción en la fruta producida. En Chile, la hoja encorvada se encuentra en olivares de la zona norte y central. El agente causal de esta malformación es desconocido, aunque se ha logrado transmitir experimentalmente de plantas enfermas a otras sanas mediante injertación (Waterworth y Monroe, 1975).

¹Recepción de originales: 10 de diciembre de 1998.
Trabajo financiado en parte, por el proyecto FIA N° C96-1-A013.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.
E-mail: gherrera@platina.inia.cl

En diferentes regiones del mundo se han detectado varios virus afectando los cultivos de olivos, pero ninguno de ellos ha sido asociado a síntomas en particular. Entre los virus detectados están: Arabis mosaic virus (ArMV) (Savino *et al.*, 1979); Strawberry latent ringspot virus (SLRSV) (Marte *et al.*, 1986); Cherry leaf roll virus (CLRV) (Savino y Gallitelli, 1981); Cucumber mosaic virus (CMV) (Savino y Gallitelli, 1983); Olive latent virus 1 (OLV1) (Gallitelli y Savino, 1985) y Olive latent virus 2 (OLV2) (Grieco *et al.*, 1992). Recientemente, Faggioei y Barba (1995) describieron otro virus de naturaleza filamentosa denominado Olive vein yellow virus (OVYV).

Los viroides son microorganismos que sólo han sido encontrados en las plantas, y que, a diferencia de los virus, no tienen un capsómero de proteínas. Los viroides consisten en una hebra de ácido ribonucleico circular, que se puede replicar y transmitir en forma independiente de una planta a otra (Hannold, 1993). Algunos de ellos son importantes patógenos de cultivos, tales como el "Potato spindle tuber viroid (PSTVd)" en papa y "Avocado sunblotch viroid (ASBVd)" en palto. La identificación específica de ellos requiere de una detallada comparación de la secuencia de bases entre el viroide a identificar y los ya conocidos (Hannold, 1993).

Aún no se conocen los efectos que los virus y viroides tienen en los aspectos agronómicos del cultivo del olivo (propagación, producción y susceptibilidad a otros factores bióticos y abióticos), pero el uso de material libre de estos microorganismos parece una forma adecuada de prevenir el efecto de estos patógenos en las plantas propagadas. En Chile, normalmente el olivo se propaga mediante el sistema de estacas, permitiendo que patógenos tipo virus, viroides y fitoplasmas se perpetúen en el cultivo.

Considerando la presencia de plantas de olivo con detención de crecimiento, malformación de hojas y hojas encorvadas en las zonas norte y central de Chile, la presente investigación tuvo

por objetivo determinar la posible naturaleza patológica de estos problemas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen del material. Se colectaron muestras de plantas de olivos (*Olea europaea* L.) que mostraban disminución de crecimiento y malformación de hojas u hojas encorvadas (sickle leaf) (Figura 1) y muestras de plantas sanas provenientes de Arica, Copiapó y Santiago.

Estas muestras se sometieron a una serie de pruebas a fin de establecer el origen patológico del problema. Con el objeto de detectar la presencia de virus se sometieron a la prueba del ácido ribonucleico de doble hebra viral (ARNdh), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), microscopía electrónica y hospederos diferenciales. Su origen viroidal se investigó mediante la prueba de electroforesis de doble corrida y su origen fitoplasmal mediante la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con partidores universales.

Prueba de ARNdh. La extracción de los ácidos nucleicos se realizó macerando 3 a 4 g de tejido

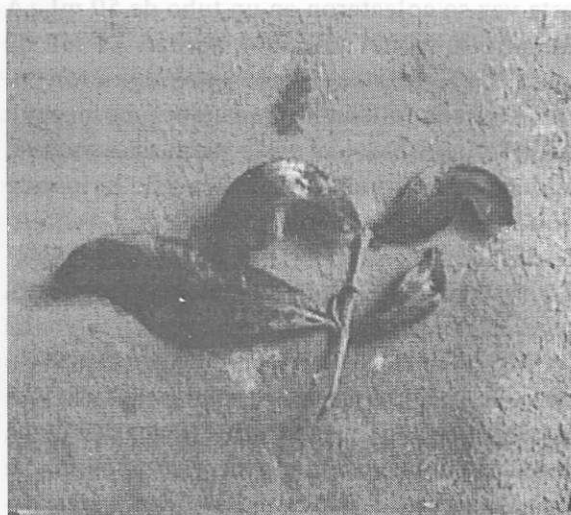


Figura 1. Síntomas de encorvamiento de la hoja (sickle leaf) en plantas de olivo.

Figure 1. Symptoms of sickle leaf in olive plants.

en 8 mL de STE 1X (0,1M NaCl; 0,05 M tris 0,001 M EDTA; 0,01% DIECA). El extracto se colectó en un tubo de polietileno de alta densidad (50 mL) y se agregó 1 mL de Sodio Dodecil Sulfato (SDS) de una solución al 10%, 0,5 mL de bentonita de una suspensión acuosa al 2 %, y 9 mL de fenol saturado con STE 1X. El homogeneizado se mezcló vigorosamente por 30 min a temperatura ambiente. Luego, las muestras se centrifugaron a 8.000 g durante 15 min a 4°C. Por cada 10 mL de sobrenadante rescatado se le agregó 2,1 mL de etanol 95%.

Para aislar los ácidos nucleicos se procedió de la siguiente manera: se prepararon dos porciones de 1 g cada una de celulosa (CF-11) por muestra, se agregó 25 mL de STE 1X (100 mM TrisCl, 1 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,0) conteniendo 16% de etanol y con esta suspensión se formaron dos columnas preparadas en jeringas de 20 mL taponadas con lana de vidrio. La suspensión de celulosa se mezcló bien, colocándose en las columnas y se dejó escurrir el exceso de STE/etanol. Posteriormente, se agregó la muestra a la primera columna permitiendo que escurriera completamente. Enseguida, se lavó lentamente la columna con 40 mL de STE 1X, conteniendo un 16% de etanol, descartándose dicha porción. Luego, se agregaron 10 mL de STE 1X, pero esta vez se colectaron en un tubo de 50 mL. A la muestra recuperada se le agregó 2,1 mL de etanol 95%. Los mismos pasos se siguieron para la segunda columna, agregando como muestra la solución obtenida en la primera columna, agregando finalmente 6 mL de STE 1X, los que se colectan en un tubo de 50 mL.

Para precipitar los ácidos nucleicos, a la muestra recolectada se le adicionó 0,5 mL de acetato de sodio 3 M (pH 5,5) y 20 mL de etanol 95%. Se almacenaron por 2 h como mínimo a -20°C, de esta manera, se precipitaron los ácidos nucleicos de doble hebra. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 8.000 g por 25 minutos, descartando completamente el sobrenadante y dejando los tubos invertidos para secar el pellet.

Para evaluar las muestras, se resuspendieron en 100 µL de tampón muestra TAE (24,2 g tris; 5,71 mL de EDTA 0,5 M en 100 mL de agua). En algunos casos, las muestras así preparadas se almacenaron indefinidamente a -20° C. Los ARN de doble hebra se analizaron en geles verticales (160 mm de largo por 140 mm de ancho y 1,5 mm de espesor) al 6% de poliacrilamida preparado en buffer TAE. Las muestras normalmente se sometieron a electroforesis 3 a 4 h, a 50-60 mA, en tampón TAE 1X (0,04 M tris; 0,02 M NaCl; 0,001M EDTA). Los geles se tiñeron con nitrato de plata.

Prueba ELISA. Para los efectos del procedimiento de la prueba serológica ELISA, en placas de poliestireno se colocaron 100 µL de antígeno y se incubó a 4° C durante 16 h. Para la preparación del antígeno, se procedió de la siguiente forma: 1-2 g de hojas se trituraron dentro de una bolsa plástica en solución de extracción (1:10 peso:volumen (p:v)) en tampón carbonato (0,014 M Na₂CO₃; 0,0035 M NaHCO₃, pH 9,6), el extracto se centrifugó a 2.000 rpm durante 2 min, colectándose el sobrenadante para cubrir los pocillos de las placas con 100 µL, incubando durante 16 h a 6°C. Enseguida, estas placas se lavaron 3 veces cada 5 min con solución de lavado PBS-T (8 g NaCl; 0,2 g KH₂PO₄; 2,9 g Na₂HPO₄; 0,2 g KCl y 0,02 mL Tween-20 para 1 L de agua).

Una vez terminado este período, a las placas se les agregó BSA (Bovine Serum Albumin) al 3% en PBS por 2 h a 36° C. Después de un lavado similar al anterior, se adicionó inmunoglobulinas (1:1000 volumen/volumen (v/v)) (obtenidas en Sanofi, Francia) específicas para la detección de los virus indicados en el Cuadro 2, incubándose 2 h a 36° C. Posteriormente, se agregó un segundo antisuero producido en cabra, incubándose a 36°C durante 2 h. Finalmente, las placas se lavaron y se agregó sustrato (p-nitrofenil-fosfato, Sigma 104) adicionándose a razón de 1 mg/mL de dietanolamina, pH 9,8. La evaluación de las reacciones ELISA se realizaron en un lector de placas ELISA (Biotek, modelo 312e)

a 405 nm, midiendo la absorbancia cada 15, 30 y 60 min. Se consideró como muestra positiva, sólo aquella que presentaba una absorbancia superior a dos veces el valor obtenido con los controles sanos.

Microscopía electrónica. Se colocó una grilla de malla 300, sobre una gota de extracto de planta infectada durante 3 min. Una vez seca, la grilla se colocó sobre una gota de contrastante (molibdato de amonio al 2% ó con KPT (fosfotungstato de potasio) al 2%), durante 3 a 5 min. Posteriormente, se observó bajo el microscopio electrónico marca Zeiss, modelo EM 300.

Transmisión mecánica a hospederos herbáceos. Muestras de hojas de olivo con síntomas de hojas encorvadas se trituraron en tampón fosfato 0,01 M más 0,001% de dietilditiocarbamato (DIECA). El extracto se frotó con algodón sobre hojas de plantas indicadoras (Cuadro 3). Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero (temperatura entre 18° C y 22° C) durante un período de 30 días, al cabo de los cuales, se evaluó la presencia de síntomas.

Prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La aislación de ácidos nucleicos se realizó de acuerdo a la metodología de Kirkpatrick *et al.* (1987). Para ello, 0,5 g de tejido se incubaron durante 10 min en 6 mL de tampón de molienda (125 mM fosfato de potasio; 30 mM ácido ascórbico; 10% de sacarosa; 0,15% BSA; 2% polivinilpirrolidone (PVP); pH 7,6). Después de la incubación el tejido se molió agregando otros 8 mL de tampón. El homogeneizado se centrifugó a 4° C durante 4 min a 3.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó a 4° C durante 25 min a 8.000 rpm. El pellet se resuspendió en 1,5 mL de tampón de extracción CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2% 2-mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM tris-HCl; pH 8,0) a 60° C durante 30 min. Posteriormente se agregó igual volumen de la mezcla cloroformo/alcohol (24:1 v/v). Después de la centrifugación, la fase acuosa se precipitó con 2/3 de volumen de isopropanol a -20° C y se centrifugó a

11.000 rpm; el pellet se lavó con etanol al 70%, secando al vacío y disolviendo el pellet en 100 µL de agua estéril. Finalmente, la preparación de digirió con 50 µg/mL de Rnasa A durante 30 min a 37° C.

Para la realización de las pruebas de PCR se seleccionó un par de oligonucleótidos universales para la detección de fitoplasma (Lee *et al.*, 1993) R16F2 5'-ACG ACT GCT AAG ACT GG-3' y R16R2 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'. Para la amplificación de ADN se agregaron 5 µL de ADN extraído a una mezcla de 35 µL de 0,5 µM de cada partidor, 100 µM de la 4 bases (dNTPs) y 1 unidad de Taq polimerasa. Se cubrió con aceite mineral y se sometió a un termociclador (Thermolyne, modelo AMPLITRON II) sujeto a 35 ciclos: 1 min de desnaturalización a 94° C, 2 min a 50° C, 3 min a 72° C de extensión y un período de elongación final de 72° C durante 10 min.

Para el análisis de los productos de amplificación se colocaron alícuotas de 10 µL de reacción de PCR en un gel de electroforesis de 6% acrilamida en tampón TBE (89 mM tris; 80 mM ácido bórico; 2,5 mM EDTA; pH 8,3). Los geles fueron corridos a 70 volts durante aproximadamente 2 horas. Posteriormente los geles se tiñeron con plata.

Prueba electroforética de doble corrida. La extracción de los ácidos nucleicos se realizó triturando en un mortero de porcelana 0,5 g de hojas en presencia de tampón de extracción (tris HCl 100 mM; NaCl 100 mM; EDTA 10 mM; SDS 2%). El extracto se mezcló con 0,5 mL de cloroformo saturado con fenol y mercaptoetanol 0,01 mL. Luego, en tubos eppendorf se centrifugaron durante 15 min a 8.000 rpm. En seguida, se colectó el sobrenadante, se adicionaron 0,5 mL de cloroformo y se centrifugó durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo conteniendo 0,1 vol de 3 M de acetato de sodio, pH 5,2. La precipitación de los ácidos nucleicos se realizó agregando 2 vol de etanol, seguido por incubación a -20° C durante 1 h.

Después de centrifugar durante 15 min a 8.000 rpm, el pellet se secó al vacío y se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril. Las muestras se corrieron en un gel conteniendo 5% poliacrilamida (0,12% bisacrilamida; 0,12% de TEMED) en un tampón electroforético (44,5 mM tris; 44,5 mM ácido bórico; 1,25 mM de EDTA y 4 M de urea) y 0,07% de persulfato de amonio. Los bolsillos del gel se llenaron con una mezcla de 10 µL de muestra, 10 µL de tampón electroforético doblemente concentrado y trazas de xileno-cianol. La primera corrida se realizó en condiciones nativas a 15-18° C en 44,5 mM de tampón electroforético usando 500 V y alrededor de 30 mA. La corrida se detuvo cuando los colorantes corrieron unos 5 cm, lo cual tomó 1 h. Posteriormente, el gel cubierto con papel plástico se sometió a un baño de 60°C durante 5 min, que corrido nuevamente con la polaridad invertida, se detuvo cuando los colorantes llegaron al borde de los bolsillos de gel, lo cual tomó aproximadamente 1 h. El gel se fijó durante 15 min en 10% de etanol y 1% de ácido acético. Luego, se sumergió 1 h en 10 mM de AgNO₃, seguido de dos lavados de agua durante 1 min. Finalmente, el gel se reveló en una mezcla de 375 mM de NaOH y 2,3 mM de formaldehído.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presentan los resultados con las diferentes pruebas a las cuales fueron sometidas las muestras, las que indicaron que en la prueba de ARN de doble hebra y microscopio electrónico no se encontraron organismos tipo virus; esto sugiere que los virus no estarían involucrados como causa de los síntomas observados en las plantas. Asimismo, los resultados con la prueba de PCR utilizando partidores universales para la detección de fitoplasma también fueron negativas, descartándose la presencia de estos organismos como agentes causales. Sin embargo, en forma consistente, las pruebas de electroforesis de doble corrida para la detección de viroides fueron positivas (Figura 2) en muestras de olivos provenientes de Arica, Copiapó y Santiago con síntomas de hojas encorvadas. Estas reacciones fueron negativas con seis muestras colectadas en la zona central con ausencia de sintomatología. Este resultado, y la ausencia de otros organismos tipo virus y fitoplasma, sugieren que el posible agente causal de los síntomas que presentan las plantas podría ser un viroide.

Cuadro 1. Reacción de muestras de olivo con (Arica y Copiapó) y sin (Santiago) síntomas de encorvamiento de hoja a las pruebas de ARN de doble hebra, electroforesis de doble corrida, reacción en cadena de la polimerasa y microscopía electrónica

Table 1. Reaction of olive samples with (Arica and Copiapó) and without (Santiago) sickle leaf symptoms to double strand RNA, double run electrophoresis, polimerase chain reaction and electron microscopy tests

Prueba virológica	Patógeno a detectar	Origen de las muestras ¹											
		Arica				Copiapó				Santiago			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
RNA de doble hebra	virus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electroforesis doble corrida	viroide	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	fitoplasma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microscopía electrónica	virus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Cuatro muestras distintas por localidad.

+: reacción positiva.

- : reacción negativa.

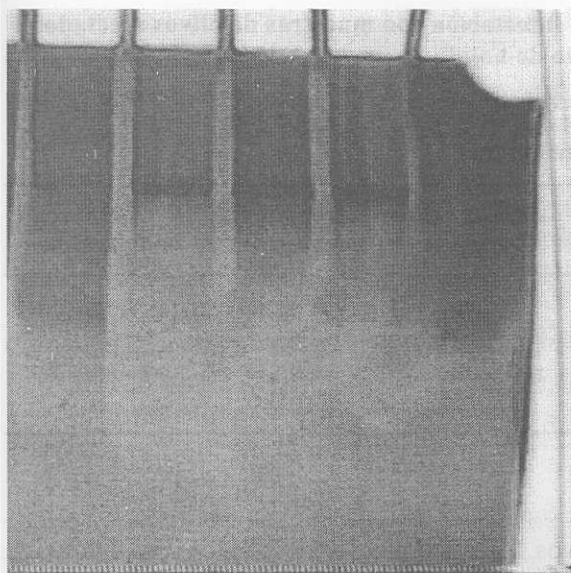


Figura 2. Diferenciación de viroides basados en electroforesis de doble corrida. Bandas 1, 2, 3 y 4 muestras de olivos con síntomas de encorvamiento de hojas; banda 5 control sano.

Figure 2. Viroid detection by double run electrophoresis. Band 1, 2, 3 and 4 olive samples with sickle leaf symptoms; band 5 healthy control.

La ausencia de virus detectada en las plantas infectadas, fue corroborada con la prueba ELISA (Cuadro 2) a lo menos para 8 diferentes virus. Todas las pruebas fueron negativas para los virus CMV, ArMV, CLRV, SLRSV, RRSV, Potyvirus en general y los nepovirus TomRSV

y GFLV. Asimismo, todas las transmisiones mecánicas a hospederos diferenciales no mostraron transmisión de agentes tipo virosos (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

La disminución parcial de crecimiento en plantas de olivo, malformación de hojas y diferentes grados de amarillez, se reconocen como de posible etiología viral (Barba, 1993). Barba (1993) menciona a SLRV, CLRV, CMV, Olive latent virus 1 y 2 como presentes en olivos, pero a ninguno de ellos se les ha asociado a síntomas determinados. Particularmente, el síntoma de hoja encorvada o "sickle leaf" fue descrito en California en 1958 (Thomas, 1958), y estudiado posteriormente por Waterworth y Monroe (1975). Estos últimos determinaron que el síntoma es transmisible por injertación a plantas sanas. Esto descarta que esta malformación se deba a factores nutricionales, fisiológicos u otro orden. No obstante, dichos autores encontraron que el agente transmisible no es transmitido mecánicamente a hospederos herbáceos, y mediante microscopía electrónica no encontraron virus o fitoplasmas involucrados en las plantas afectadas. Los mismos autores no investigaron el factor viroide como posible causante de los síntomas observados en las plantas.

Cuadro 2. Reacción de muestras de olivos afectadas con encorvamiento de hojas en prueba ELISA para 8 diferentes virus

Table 2. Reaction of olive samples affected with sickle leaf symptoms by ELISA against 8 virus antiserum

Nº Muestra	Antisueros ¹							
	CMV	ArMV	CLRV	SLRSV	RRSV	POTYVIRUS	TomRSV	GFLV
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-

¹CMV: Cucumber mosaic virus; ArMV: Arabis mosaic virus; CLRV: Cherry leaf roll virus; SLRSV: Strawberry latent ringspot virus; RRSV: Raspberry ringspot virus; TomRSV: Tomato ringspot virus; GFLV: Grape fan leaf virus.

Cuadro 3. Reacción de hospederos diferenciales a la infección con muestras de olivos afectados con encorvamiento de hoja¹

Table 3. Reaction of herbaceous hosts to the infection with olive samples affected with sickle leaf symptoms

Muestra Nº	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Nicotiana cleveelandi</i>	<i>Nicotiana melagosphum</i>	<i>Chenopodium quiona</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	<i>Gomphrena globosa</i>
1	0/10	0/13	0/17	0/40	0/25	0/5
2	0/10	0/13	0/17	0/40	0/25	0/5
3	0/10	0/13	0/17	0/40	0/25	0/5
4	0/10	0/13	0/17	0/40	0/25	0/5

¹Plantas con síntomas/Total plantas inoculadas.

La presente investigación corrobora los resultados de Waterworth y Monroe (1975), en el sentido de no encontrar elementos de juicio para asociar los síntomas a virus o fitoplasmas. Mediante la prueba ELISA se cubrió un amplio rango de virus pertenecientes a los grupo nepovirus, cucumbervirus y potyvirus. Con el fin de ampliar más el rango de detección de posibles virus involucrados en los síntomas descritos se utilizó la prueba de ARN de doble hebra que cubre la detección de la mayor parte de los virus con ARN como ácido nucleico. Todas las pruebas resultaron negativas. Por otro lado, las transmisiones a hospederos herbáceos que incluyeron los típicos hospederos de virus pertenecientes al grupo de nepovirus y que alcanzaron a 6 especies y más de 440 inoculaciones, en ninguna planta se obtuvieron resultados positi-

vos. Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo y de acuerdo a las electroforesis de doble corrida, sugieren que el posible agente asociado a los síntomas de encorvamiento de hojas en olivo podría ser un viroide.

CONCLUSIONES

La ausencia de organismos tipo virus, de acuerdo a prueba de ARN de doble hebra, ELISA y microscopía electrónica, ausencia de organismos tipo fitoplasma, considerando la reacción negativa a PCR con partidores universales y los resultados positivos a las pruebas de electroforesis de doble hebra, sugieren una asociación de los síntomas de encorvamiento foliar o "sickle leaf" en olivo a un organismo tipo viroide.

RESUMEN

Muestras de plantas de olivo (*Olea europaea* L.) provenientes de la zona norte y central de Chile se sometieron a una serie de pruebas a fin de establecer la naturaleza del posible agente causal de la malformación de hojas u hojas encorvadas ("sickle leaf"). Las plantas se sometieron a la prueba de ARN de doble hebra, ELISA, transmisión a plantas hospederas herbáceas y microscopía electrónica para determinar la presencia de virus, electroforesis de doble corri-

da para la detección de viroides y PCR para identificar posibles fitoplasmas. Todas las pruebas demostraron la ausencia de organismos tipo virus y fitoplasmas. Sólo se lograron resultados positivos con la prueba de electroforesis de doble corrida sugiriendo la presencia de viroides en las plantas con síntomas de hojas encorvadas.

Palabras claves: *Olea europaea*, virus, fitoplasma.

LITERATURA CITADA

- BARBA, M. 1993. Viruses and virus-like diseases of olive. *Bulletin EPPO* 23: 493-497.
- FAGGIOLI, F. AND BARBA, M. 1995. An elongated virus isolated from olive (*Olea europaea* L.). *Acta Horticulturae* 386: 593-597.
- GALLITELLI, D. AND SAVINO, V. 1985. Olive latent virus 1. A single RNA spherical virus isolated from olive in Apulia. *Annals of Applied Biology* 106: 295-303.
- GRIECO, F.; MARTELLI, G.; SAVINO, V. AND PIAZZOLLA, P. 1992. Properties of olive latent 2. *Rivista di Patologia vegetale* 2: 125-136.
- HANNOLD, D. 1993. Diagnostic methods applicable to viroids. *In: Plant virus diseases*. Mathews R.E.F. (Ed.) CRC Press. London, UK. p. 295-314.
- KIRKPATRICK, B.; STENGER, D.; MORRIS, T. AND PURCELL, A. 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238: 197-200.
- LEE, I.; HAMMOND, R.; DAVIS, R. AND GUNDERSEN, D. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organism. *Phytopathology* 83: 834-842.
- MARTE, M.; GADANI, F.; SAVINO, V. AND RUGINI, E. 1986. Strawberry latent ringspot virus associated with a new diseases of olive in central Italy. *Plant Diseases* 70: 171-172.
- SAVINO, V.; BARBA, M.; GALLITELLI, D. AND MARTELLI, G. 1979. Two nepovirus isolated from olive in Italy. *Phytopathology Mediterranea* 18: 135-142.
- SAVINO, V. AND GALLITELLI, D. 1981. Cherry leaf roll virus in olive. *Phytopathology Mediterranea* 20: 202-203.
- SAVINO, V. AND GALLITELLI, D. 1983. Isolation of cucumber mosaic virus from Olive in Italy. *Phytopathology Mediterranea* 22: 76-77.
- SOTOMAYOR, E. 1994. Establecimiento de un banco de olivo en el valle de azapa. *Simiente* 64: 40.
- THOMAS, H. 1958. Sick leaf of olive. *Plant Diseases Reporter* 42:1154.
- WATERWORTH, H. AND MONROE, R. 1975. Graft transmission of sick leaf disorder. *Plant Diseases Reporter* 59: 366-367.