

# Comparación del método de reacción almidón – iodo con la Amplificación por Polimerasa y Recombinasa para el diagnóstico del Huanglongbing (HLB) de los cítricos

Comparison of the starch-iodine reaction technique with the Recombinase Polymerase Amplification for citrus Huanglongbing (HLB) diagnosis

Luis Roberto González Segnana<sup>1\*</sup> , Dario Rafael Acosta Aveiro<sup>1</sup>, Cesar Darío Pino Quintana<sup>1</sup> y Diego Dionisio González Espínola<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias. San Lorenzo, Paraguay.

## RESUMEN

El Huanglongbing (HLB) es una de las enfermedades más importantes de los cítricos a nivel mundial. Su diagnóstico a nivel de campo es difícil cuando se basa en los síntomas visuales ya que pueden ser confundidos con síntomas similares de otras enfermedades o deficiencias nutricionales de la planta. Métodos moleculares son utilizados para el diagnóstico de la enfermedad, los cuales son laboriosos, requieren tiempo y tienen un costo elevado, además de no permitir una rápida detección en el campo. En relación a esta problemática, el método de diagnóstico de reacción almidón-iodo (RAI) fue propuesto por diversos autores como una alternativa barata para la diagnosis de HLB, sin embargo, el método no ha sido ampliamente utilizado, posiblemente por falta de difusión. En el presente trabajo se demostró la eficacia del método de diagnóstico por RAI, mediante su comparación con el método molecular de Amplificación por recombinasa y polimerasa(ARP), siendo éste un método molecular que permite la detección de HLB a nivel de campo, pero que tiene un costo superior. Fueron extraídas un total de 825 muestras de hojas de 33 plantas de naranjo dulce (*Citrus sinensis*L.) de plantíos del Departamento de Caazapá, Paraguay. Las muestras fueron analizadas por el método de RAI, la tinción e intensidad de la coloración fueron observadas por microscopia óptica. Entre estas se seleccionaron 33 muestras con reacciones positivas y negativas para ser analizadas por el método de ARP. Resultados revelaron una correlación del 93,6% entre ambos métodos. El método de RAI, además de permitir diferenciar los síntomas de HLB de otras enfermedades y deficiencias nutricionales en la planta, es un método sencillo, rápido, eficaz, y económico para el diagnóstico de la enfermedad.

**Palabras clave:** HLB, cítricos, detección.

## ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is one of the most important citrus diseases worldwide. A field level diagnosis is difficult when it is based on visual symptoms, since they can be confused with similar symptoms of other diseases or nutritional deficiencies of the plant. Molecular methods are used for the diagnosis of the disease, which are laborious, time-consuming and costly, in addition to not allowing rapid detection in the field. In relation to this problem, the method of starch-iodine reaction (RAI) was proposed as a cheap alternative for the diagnosis of HLB by various authors, however, the method has not been widely used, possibly due to lack of diffusion. In the present work the efficacy of the RAI diagnostic method was demonstrated, by comparison with the molecular method of Amplification by recombinase and polymerase (ARP); a molecular method that allows the detection of HLB in the field, but with higher cost. A total of 825 leaf samples were taken from 33 sweet orange (*Citrus sinensis* L.) plants from orchards of the Department of Caazapá, Paraguay. The samples were analyzed by RAI method, staining and intensity of coloration were observed by optical microscopy. Among these, 33 samples were selected with positive and negative reactions to be analyzed by the ARP method. Results revealed a correlation of 93.6% between both methods. The RAI method, in addition to differentiating HLB symptoms from other diseases and nutritional deficiencies in the plant, is a simple, fast, effective, and economical method for diagnosis if the disease.

**Keywords:** HLB, citrus, detection.

## \*Autor para correspondencia:

luis.gonzalez@agr.una.py

## Conflicto de interés:

El autor declara no tener conflicto de interés.

## Licencia:

Artículo publicado en acceso abierto con una licencia Creative Commons CC-BY

## Historial:

Recibido: 18/03/2019;  
Aceptado: 28/10/2020

## Período de Publicación:

Julio-Diciembre de 2020

## INTRODUCCIÓN

En el Paraguay los cítricos se encuentran distribuidos en casi todos los Departamentos del país, fundamentalmente debido a las condiciones agroecológicas propicias para su cultivo. La producción generada en estas fincas es destinada principalmente al consumo como fruta fresca, además, en algunos casos, para el abastecimiento de industrias instaladas en algunos Departamentos como en el de Itapúa (González & Tullo, 2019).

Entre las diversas enfermedades que pueden afectar a este cultivo, el Huanglongbing (HLB) también conocida como la enfermedad de los brotes amarillos, dragón amarillo o greening, es considerada como la más devastadora de los últimos diez años a nivel mundial, provocando rápidas y severas pérdidas, tanto en el rendimiento como en la calidad del fruto, y representa una peligrosa amenaza para citricultores e industrias de jugo cítrico a nivel mundial (Bassanezi, Montesino, Gasparoto, Bergamin Filho & Amorim, 2011; Bové, 2006; Hall & Hentz, 2010; Manjunath, Halbert, Ramadugu, Webb & Lee, 2008).

La enfermedad se describió por primera vez en 1929 y se informó por primera vez en China en 1943. Como agentes causales están identificadas tres especies de  $\alpha$ -Proteobacterias restringidas al floema, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' en Asia, '*Ca. L. africanus*' en África (Jagoueix, Bove & Garnier, 1994) y '*Ca. L. americanus*' en Brasil, Sudamérica (Texeira et al., 2005).

En el año 2007, un fitoplasma del grupo 16SrIX se asoció con síntomas de HLB en Brasil en plantas libres de *Liberibacter* spp (Teixeira et al., 2008). Más recientemente en el mismo país, otro fitoplasma del grupo 16SrIII fue encontrado en plantas con ausencia de '*Ca. L. asiaticus*' y '*Ca. L. americanus*'. Coinfección con '*Ca. L. asiaticus*' y 16SrIII también fueron encontradas. Secuencias del gen del ARN ribosómico 16S (ARNr) confirmaron que el fitoplasma del grupo 16SrIII está asociado con síntomas de HLB en los estados de Sao Paulo y Minas Gerais (Wulff et al., 2019).

En Paraguay se observaron los primeros síntomas de HLB en plantíos cítricos de los Departamentos de Amambay, Canindeyú, Alto Paraná, Itapúa y Cordillera, en las cuales fue detectada la especie '*Ca. Liberibacter asiaticus*' (SENAVE, 2017). Actualmente la enfermedad se encuentra reportada en plantíos cítricos de nueve Departamentos de la Región Oriental de Paraguay (Amambay, Canindeyú, Alto Paraná, Itapúa, Caazapá, Guairá, Caaguazú, Cordillera, y San Pedro), existiendo Departamentos donde aún no fue reportado entre ellos: Misiones, Paraguari, Central, Ñeembucú y Concepción, además de toda la

Región Occidental o Chaco.

La transmisión de estas bacterias ocurre por medio de insectos psílidos como *Diaphorinacitri* kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) y *Triosa eritreaeerytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Triozidae (Aidoo et al., 2019; Duan, Gottwald, Zhou & Gabriel, 2008; Hall, 2008) *D.citri* es considerado el vector más importante debido a su amplia distribución en el mundo (Burckhardt, Ouvrard, & others, 2012). En el Paraguay *D.citri* fue reportado en el año 2008 (SENAVE, 2017).

Hasta el momento no existen variedades comerciales, porta injertos resistentes o métodos de control curativos para HLB y prevenir la infección de las plantas es esencial para controlar la enfermedad. Esto se logra tentativamente plantando plántulas sanas, eliminando plantas enfermas y controlando el insecto vector (Albrecht & Bowman, 2012; Gottwald, da Graça & Bassanezi, 2007).

El rápido diagnóstico de plantas con HLB es crucial para el planeamiento de medidas de control a nivel regional. En la actualidad, el diagnóstico de HLB de rutina se realiza mediante la inspección visual para detectar los síntomas típicos de HLB, los que pueden ser confundidos con síntomas similares de otras enfermedades o deficiencias nutricionales de la planta (Bové, 2006; Sagaram, DeAngelis, Trivedi, Andersen, Lu & Wang, 2009).

Métodos moleculares son utilizados para confirmación del diagnóstico de HLB, entre los cuales el método de reacción en cadena de la polimerasa es el más utilizado (Polimerase Chain Reaction; PCR) (Gopal, Gopi, Palanivel & Sreenivasulu, 2007; Li, Levy, & Hartung, 2009). Otros métodos de detección serológica de HLB son el uso de anticuerpos monoclonales (Ding, Duan, Yuan, Shao & Hartung, 2016).

Estos métodos pueden ser laboriosos y requieren equipos, reactivos especiales y personal capacitado, demandan tiempo y su costo un gran número de muestras, es elevado. Entre los métodos moleculares que requieren menos equipamientos y no demandan mucho tiempo, la amplificación isotérmica mediada por Bucle (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP) se ha propuesto para la detección de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' y su vector *D.citri* (Ghosh et al., 2016). También, la tecnología de la amplificación isotérmica por polimerasa-recombinasa ha permitido la obtención de métodos rápidos de diagnóstico de fitopatógenos (Kim & Easley, 2011).

La amplificación isotérmica se realiza utilizando tres enzimas; una proteína de unión al ADN de cadena simple, una recombinasa y una polimerasa de ADN con actividad desplazante (Piepenburg, Williams, Stemple & Armes, 2006). Puede llevarse a cabo en un

rango constante de temperatura (de 20°C a 45°C), evitando así el uso de equipos sofisticados como el termociclador (Zaghloul & El-shahat, 2014). Agdia Inc. ha desarrollado una plataforma de detección basada en esta tecnología y tiene disponible un kit de detección del HLB, denominado AmplifyRP® (Russell, McOwen, Bohannon, Amato & Bohannon, 2015). Este permite una rápida y fácil detección a nivel de campo. Sin embargo, todos los métodos citados pueden ser de alto costo o difícil obtención para el productor.

Entre las alternativas para un rápido y barato diagnóstico del HLB, el método de reacción almidón-iodo (RAI) ha sido propuesto por varios autores y se ha validado por el método de PCR. Sin embargo, su uso se ha limitado a actividades académicas. El método se basa en la gran acumulación de almidón en las hojas de plantas cítricas afectadas por el HLB, el cual, mediante una reacción específica del yodo con el almidón, desarrolla una coloración parda oscura muy notoria y típica que permite diferenciar aquellas plantas infectadas de las no infectadas (González, et al., 2007).

El objetivo del presente trabajo fue demostrarla eficacia del método de tinción Reacción Almidón-Iodo (RAI) en comparación con el método molecular de amplificación de la recombinasa-polimerasa (ARP) para el diagnóstico de HLB en cítricos, de forma a difundir el uso de esta técnica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción (FCA-UNA).

### Material vegetal

Fueron colectadas muestras de plantas de naranjo dulce (*Citrus sinensis*L.), variedad Valencia, de aproximadamente 10 años de edad, de parcelas de productores citrícolas del Departamento de Caazapá en el distrito de Higinio Morínigo.

Además, muestras de hojas con síntomas correspondientes a otras enfermedades como: exocortis (CEVd), psorosis (CPsV) y tristeza de los cítricos (CTV), así mismo a efectos comparativos fueron igualmente colectadas hojas con deficiencias nutricionales (Zn, Mn, Mg) de la colección de cítricos de parcelas experimentales de la FCA-UNA localizadas en el Campus de San Lorenzo.

Las muestras de hojas fueron colectadas en bolsas plásticas enumeradas y trasladadas en frío hasta el Laboratorio de Biología de la FCA/UNA para su procesamiento.

## Tinción de Reacción Almidón-Iodo

Fueron seleccionadas un total de 33 plantas cítricas, de las cuales se colectaron 25 hojas por planta, obteniéndose un total de 825 muestras, las cuales fueron sometidas al método RAI. Las muestras se procesaron siguiendo la metodología descrita por González et al. (2007), por lo que de cada muestra se hizo un corte transversal de una sección de la hoja, luego los cortes fueron sumergidos por dos minutos en una solución de Iodo ( $KI = 8,8 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $I_2 = 2,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) a temperatura ambiente y posteriormente fueron lavados en agua destilada e inmediatamente observados en microscopio óptico BOECO modelo BM 120, acoplado a una cámara MOTICAM 2300.

## Amplificación por Polimerasa y Recombinasa

Muestras que presentaron la mejor tinción (más intensa y fiable) por el método RAI fueron seleccionadas como "muestras positivas" para el diagnóstico molecular. De la misma forma, muestras que no presentaron tinción fueron seleccionadas como "muestras negativas". En total fueron analizadas 33 muestras de plantas (21 positivas y 12 negativas). Secciones de la nervadura central de 0,06 g de peso fueron cortadas y cada una analizadas por el método molecular ARP mediante el uso del kit AmplifyRP® de la marca AGDIA. Cada corte (individualmente) se introdujo en una bolsa plástica, se añadió 300 µL de tampón de extracción AMP1, y seguidamente fue macerado y homogeneizado. Posteriormente se procedió a calentarlos en bloque de calor a una temperatura de 39°C por 3 minutos, mientras que en un tubo de 200 µL se añadió: un gránulo de reacción ADN de 'Ca.Liberibacter asiaticus' del kit, 10 µL de diluyente PD1 para disolver el gránulo de ADN, 1 µL del extracto de la muestra y luego fue incubado en el bloque de calor durante 20 minutos. Se retiró el tubo del bloque de calor y se procedió a realizar los pasos de detección colocando el tubo en la cámara de detección y de reacción específica del kit, para luego esperar 20 minutos antes de interpretar los resultados.

## Análisis de los datos

Obtenidos estos datos, con independencia del método, se determinó la eficacia (sensibilidad y especificidad) del método RAI en comparación con el método ARP a través del método estadístico de concordancia Kappa de Cohen al 5% de probabilidad de error ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y CONCLUSION

En los cortes transversales de las hojas infectadas con HLB (Figura 1b) se observó la tinción y coloración púrpura oscura de gránulos de almidón acumulados en las células parenquimatosas del

floema, a diferencia de los cortes de hojas de control sin infección de HLB (Figura 1c).

En la Tabla 1 podemos observar las muestras de hojas analizadas con síntomas correspondientes a otras enfermedades como exocortis(CEVd); psorosis(CPsV); tristeza de los cítricos (CTV). Ninguna de ellas presentó tinción ni coloración alguna en toda la superficie de corte, siendo visiblemente indistinguibles de las hojas sanas sin infección con HLB. Así mismo, las muestras de hojas con síntomas de deficiencias nutricionales de manganeso (Mn) y magnesio (Mg), tampoco presentaron tinción ni coloración alguna. Sin embargo, en el caso de deficiencia de zinc (Zn), se observó una leve tinción de coloración púrpura clara correspondientes a la tinción normal del almidón contenido en los casos de deficiencias de este elemento (Smith, 1975; Yelenosky & Guy, 1977; Schaffer, Liu, Goldschmidt, Boyer & Goren, 1986; Onuki, Truc, Nesumi, Hong & Kobayashi (2002); González et al. 2007). Esta leve tinción y coloración en casos de deficiencias de Zn es menos intensa comparada con las de las hojas infectadas por HLB en las que se observan la tinción y coloración purpura oscura a negra total en la superficie de corte (Figura 2).

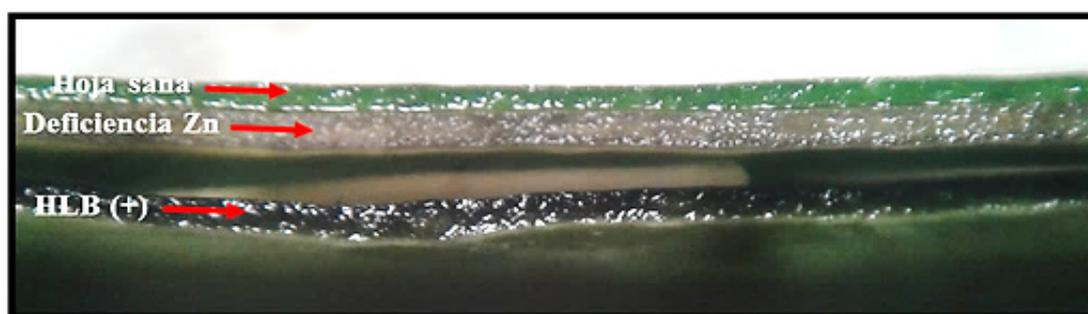
En cuanto a la comparación entre las técnicas de diagnóstico, 32 de las 33 muestras finales dieron los mismos resultados en las dos técnicas de diagnóstico; y sólo una muestra positiva por el método RAI tuvo un resultado opuesto con la técnica molecular ARP. Los resultados obtenidos y sometidos al análisis estadístico de concordancia Kappa de Cohen expresado en porcentaje proyectaron una concordancia del 93,6 % entre RAI y ARP.

El método de RAI podría permitir a los productores hacer su propio monitoreo de la enfermedad en el campo. No requiere un alto nivel de experiencia en la realización de la prueba, sin embargo, el método debe ser aplicado correctamente para garantizar la precisión de las pruebas.

Entre las limitaciones, dado el lento desarrollo de síntomas de HLB, arboles infectados que aún no demuestran síntomas pueden pasar desapercibidos para la detección de la enfermedad, estos pueden permanecer asintomáticos durante varios meses, o años, sirviendo de fuentes de inóculo. La detección temprana de la enfermedad es un desafío difícil para el control de su diseminación (Pandey & Wang, 2019).



**Figura 1.** Comparación de tinción y coloración de cortes de hojas sanas e infectadas por HLB en cítricos A. Parte superior: corte de hoja infectada (positivo) por HLB, parte inferior: corte de hoja sana (negativo) sin HLB. B. Pecíolo de hoja infectada (positivo) por HLB. C. Pecíolo de hoja sana (negativo) sin HLB. FCA-UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2017.



**Figura 2.** Tinción de cortes de hoja. Corte superior de la hoja sana, corte medio de la hoja con deficiencia de Zn y corte inferior de hoja positiva HLB. FCA-UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2017.

**Tabla 1.** Comparación de resultados para el diagnóstico de la enfermedad HLB de los cítricos entre el método reacción almidón- iodo (RAI) y el método molecular AmplifyRP® (ARP). FCA-UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2017.

N° de Muestra (sobre 33 muestras)	Resultados	
	RAI	AmplifyRP® (ARP)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 25		Con tinción (+) HLB (+)
15, 17, 18, 21, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33		Sin tinción (-) HLB (-)
26		Sin tinción (-) HLB (-)
Exocortis(CEVd); psorosis(CPsV); tristeza de los cítricos (CTV)	Sin tinción (-)	No probado
Deficientes en manganeso (Mn) y magnesio (Mg)	Sin tinción (-)	No probado
Deficientes en Zinc (Zn)	Leve tinción (-)	No probado

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidoo, O. F., Tanga, C. M., Mohamed, S. A., Rasowo, B. A., Khamis, F. M., Rwomushana, I., ... Borgemeister, C. (2019). Distribution, degree of damage and risk of spread of *Trioza erytreae* (Hemiptera: Triozidae) in Kenya. *Journal of Applied Entomology*, 143(8), 822–833.
- Albrecht, U. & Bowman, K. D. (2012). Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Science* 185-186, 118–130. 10.1016/j.plantsci.2011.09.008
- Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Gasparoto, M. C. G., Bergamin Filho, A. & Amorim, L. (2011). Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 130 (4), 577–586. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9779-1>
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: A Destructive, Newly-Emerging, Century-Old Disease of Citrus. *Journal of Plant Pathology* 88 (1), 7-37. Recuperado de: <http://jstor.org/stable/41998278>
- Burckhardt, D. & Ouvrard, D. (2012). A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea). *Zootaxa* 3509 (1) : 1-34.
- Ding, F., Duan, Y., Yuan, Q., Shao, J. & Hartung, J. S. (2016). Serological detection of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' in citrus, and identification by GeLC-MS/MS of a chaperone protein responding to cellular pathogens. *Scientific Reports* 6 (1), 1–11.
- Duan, Y. P., Gottwald, T., Zhou, L. J. & Gabriel, D. W. (2008). First report of dodder transmission of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' to tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Disease* 92 (5), 831.
- Ghosh, D. K., Bhose, S., Warghane, A., Motghare, M., Sharma, A. K., Dhar, A. K. & Gowda, S. (2016). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based method for rapid and sensitive detection of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' in citrus and the psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 25 (2), 219–223.
- González, L. R. & Tullo, C. C. (2019). Cultivo de cítricos. Guía técnica. Facultad de Ciencias Agrarias. UNA. 80 p.
- González, P., Etxeberria, E., Achor, D., Dawson, W., Spann, T., Yates, J. D. & Albrigo, G. (2007). Uso de la reacción almidón – yodo para la selección de hojas sospechosas con HLB: Distribución anatómica de niveles anormalmente altos de almidón en arboles de Naranja Valencia positivos al HLB. Horticultural Sciences Department, University of Florida. Consultado 5 mayo 2016. Disponible en: <http://calcitrusquality.org/wp-content/uploads/2009/05/Pedro-Gonzalez-Uso-de-la-Reaccion-Ioco-Almidon-Articulo-Completo.pdf>
- Gopal, K., Gopi, V., Palanivel, S. & Sreenivasulu, Y. (2007). Molecular detection of greening disease in citrus by PCR: tissue source and time of detection. *Annals of Plant Protection Sciences* 15 (2), 384–390.
- Gottwald, T. R., da Graça, J. V da & Bassanezi, R. B. (2007). Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress* 6 (1), 1–18.
- Hall, D. G. & Hentz, M. G. (2010). Sticky Trap and Stem-Tap Sampling Protocols for the Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(2), 541–549. <https://doi.org/10.1603/EC09360>.
- Hall, D. G. (2008). Biological control of *Diaphorina citri*.

- In *Proceedings of the International Workshop on Huanglongbing of citrus*, 1–7.
- Jagoueix, S., Bove, J. M. & Garnier, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the  $\alpha$  subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-379> .
- Kim, J. & Easley, C. J. (2011). Isothermal DNA amplification in bioanalysis: strategies and applications. *Bioanalysis* 3 (2), 227–239. <https://doi.org/10.4155/bio.10.172>.
- Li, W., Levy, L. & Hartung, J. S. (2009). Quantitative distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in citrus plants with citrus huanglongbing. *Phytopathology* 99 (2), 139–144.
- Manjunath, K. L., Halbert, S. E., Ramadugu, C., Webb, S. & Lee, R. F. (2008). Detection of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in Diaphorina citri and Its Importance in the Management of Citrus Huanglongbing in Florida. *Phytopathology* 98(4), 387–396. <https://doi.org/10.1094/PHTO-98-4-0387>.
- Onuki, M., Truc, N. T. N., Nesumi, H., Hong, L. T. T. & Kobayashi, H. (2002). Useful histological method for distinguishing citrus yellowing leaves infected with huanglongbing from those caused by other factors. In: *Proceedings of the 2002 annual workshop of JIRCAS Mekong Delta Project*, 114–118.
- Pandey, S. S. & Wang, N. (2019). Targeted Early Detection of Citrus Huanglongbing Causal Agent 'Candidatus Liberibacter asiaticus' before Symptom Expression. *Phytopathology* 109 (6), 952–959. <https://doi.org/10.1094/PHTO-11-18-0432-R>.
- Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L. & Armes, N. A. (2006). DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology* 4(7), 1115–1121. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>.
- Russell, P. F., McOwen, N., Bohannon, S., Amato, M. A. & Bohannon, R. (2015). Rapid On-Site Detection of the Huanglongbing/Citrus Greening Causal Agent 'Candidatus Liberibacter asiaticus' by AmplifyRP®, a Novel Rapid Isothermal Nucleic Acid Amplification Platform. *Acta Horticulturae* 1065, 905–912.
- Sagaram, U. S., DeAngelis, K. M., Trivedi, P., Andersen, G. L., Lu, S. E. & Wang, N. (2009). Bacterial Diversity Analysis of Huanglongbing Pathogen-Infected Citrus, Using PhyloChip Arrays and 16S rRNA Gene Clone Library Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (6), 1566 LP – 1574. <https://doi.org/10.1128/AEM.02404-08>.
- Schaffer, A. A., Liu, K.-C., Goldschmidt, E. E., Boyer, C. D. & Goren, R. (1986). Citrus Leaf Chlorosis Induced by Sink Removal: Starch, Nitrogen, and Chloroplast Ultrastructure. *Journal of Plant Physiology* 124 (1), 111–121. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(86\)80183-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80183-3).
- SENAVE (Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas, Paraguay). (2017). *HLB EN PARAGUAY. Experiencias en la Gestión Nacional*. Consultado 7 mar. 2019. Disponible en: <http://web.senave.gov.py:8081/docs/libros/Libro%20HLB%202017.pdf>.
- Smith, P. F. (1975). Zinc accumulation in the wood of citrus trees affected with blight. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 1974, 87, 91–95.
- Teixeira, D. C., Wulff, N. A., Martins, E. C., Kitajima, E. W., Bassanezi, R., Ayres, A. J., ... Bové, J. M. (2008). A Phytoplasma Closely Related to the Pigeon Pea Witches'-Broom Phytoplasma (16Sr IX) Is Associated with Citrus Huanglongbing Symptoms in the State of São Paulo, Brazil. *Phytopathology*, 98 (9), 977–984. <https://doi.org/10.1094/PHTO-98-9-0977>.
- Teixeira, D. C., Ayres, J., Kitajima, E. W., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C. & Bové, J. M. (2005). First Report of a Huanglongbing-Like Disease of Citrus in Sao Paulo State, Brazil and Association of a New Liberibacter Species, "Candidatus Liberibacter americanus", with the Disease. *Plant Disease*, 89 (1), 107. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0107A>.
- Wulff, N. A., Fassini, C. G., Marques, V. V., Martins, E. C., Coletti, D. A. B., Teixeira, D. do C., ... Bové, J. M. (2019). Molecular characterization and detection of 16SrIII group phytoplasma associated with huanglongbing symptoms. *Phytopathology*, 109 (3), 366–374. <https://doi.org/10.1094/PHTO-03-18-0081-R>.
- Yelenosky, G. & Guy, C. L. (1977). Carbohydrate accumulation in leaves and stems of 'Valencia' orange at progressively colder temperatures. *Botanical Gazette*, 138 (1), 13–17.
- Zaghloul, H. & El-shahat, M. (2014). Recombinase polymerase amplification as a promising tool in hepatitis C virus diagnosis. *World Journal of Hepatology*, 6(12), 916.