

RECYT

Año 21 / N° 31 / 2019 / 16–21

Aplicación de la biotecnología en cítricos para el desarrollo de plantas libres de patógenos en Paraguay

Application of biotechnology in citrus for the development of pathogen-free plants in Paraguay

Johana C. González Coria^{1,*}, Katherine J. Zawadski¹.

1- Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Nacional de Itapúa. Abog. Lorenzo Zacarías López 255 y Ruta 1, Barrio Ca'aguy Rory. Encarnación, Paraguay.

* E-mail: joha160990@gmail.com

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar una revisión acerca del estado de la citricultura en Paraguay y evaluar cuáles son las estrategias biotecnológicas que se aplican para la obtención de plantas libres de patógenos. En Paraguay, existen dos centros principales de investigación, el Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA) y la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción (UNA), a través de los cuales se da a conocer las principales enfermedades, la psorosis, cancrrosis, el virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y el *Huanglongbing* (HLB). A través del Programa de Mejoramiento Cítrico se han obtenido plantas libres de enfermedades mediante la aplicación de técnicas biotecnológicas principalmente el microinjerto de ápices caulinares *in vitro*, que permite el desarrollo de una citricultura más eficiente y productiva, en períodos de tiempo cortos comparado con las técnicas convencionales.

Palabras clave: Enfermedades cítricas; Microinjerto de ápices caulinares; Plantas libres de patógenos; Programa de Mejoramiento Cítrico.

Abstract

The objective of this work was to review the status of citrus in Paraguay and to evaluate the biotechnological strategies applied to obtain plants free of pathogens. There are two main research centers in Paraguay: The Paraguayan Institute of Agrarian Technology (IPTA) and the Faculty of Agrarian Sciences of the National University of Asuncion (UNA), through which the main diseases are reported. These include psorosis, cancrrosis, the citrus sadness virus (CTV) and the *Huanglongbing virus* (HLB). Through the Citrus Improvement Program, disease-free plants have been obtained by applying biotechnological techniques, mainly the *in vitro* shoot apex micrografting, which allows the development of a more efficient and productive citrus crop, in short periods of time compared with the conventional techniques.

Keywords: Citrus diseases; Micrografting of caulina apices; Plants free of pathogens; Citrus Improvement Program.

Introducción

Los recursos fitogenéticos son la base de la seguridad alimentaria mundial y representan un valor potencial destinado a la alimentación y la agricultura. Por ello, resulta de suma importancia mantener la diversidad genética de las variedades tradicionales y regionales de los cultivares mejorados y de plantas silvestres. Las tendencias mundiales abren un espacio cada vez mayor al uso de la biotecnología, ya que se enfrentan al reto de cómo satisfacer las necesidades de una población creciente. La biotecnología puede contribuir al aumento y mejoramiento de la producción de alimentos y de especies de importancia económica, ya que mediante esta tecnología es posible obtener material de ele-

vada productividad. El desarrollo alcanzado en el cultivo de tejidos, desde sus inicios hasta la fecha, representa un gran aporte a la agricultura y, en la actualidad constituye una vía fundamental en la actividad científico-tecnológica. El uso de técnicas biotecnológicas ofrece la posibilidad de multiplicar masivamente genotipos valiosos incluyendo los frutales que se encuentran amenazados (1).

Los cítricos constituyen el principal rubro de la fruticultura en Paraguay, siendo la naranja (*Citrus sinensis*), el pomelo (*Citrus paradisi*), la mandarina (*Citrus reticulata*) y el limón (*Citrus lemon*) las principales especies en cuanto a la producción. Las plantaciones de los mismos se pueden realizar en cualquier época del año siendo los meses de abril a agosto los más favorables (2).

En Paraguay, las plantas de naranja dulce (*Citrus sinensis* L.) se cultivan generalmente en pequeñas fincas en los Departamentos de Itapúa, Alto Paraná, Cordillera y Boquerón, abarcando un total de aproximadamente 12.000 ha. Esta producción está totalmente destinada al mercado interno, ya sea como fruta fresca o para la producción de zumos transformados. La mayoría de los huertos pertenecen a pequeños agricultores, pero hay tres grandes empresas, Frutika e Industrias Trociuk en el Departamento de Itapúa, y Estancia Estrella, en Mbaracayú, Departamento de Alto Paraná (2).

Paraguay dejó de ser un país exportador de cítricos a finales de la década de los 60, por la aparición de enfermedades como la tristeza de los cítricos, la exocortis y psorosis que fueron detectadas en todas las plantaciones del país. A partir de ese momento Paraguay pasó a ser un importador de frutas frescas. Actualmente, el 70% de las frutas cítricas comercializadas en el mercado general provienen de Brasil, Argentina y Uruguay. Por lo tanto, para intentar mejorar la producción nacional de cítricos se han perfeccionado métodos para acelerar el proceso y obtener cultivos libres de patógenos, como lo es el microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (3).

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar una revisión acerca del estado de la citricultura en Paraguay y evaluar cuáles son las estrategias biotecnológicas que se aplican para la obtención de plantas libres de patógenos.

Resultados y Discusión

Enfermedades que afectan a los cítricos

Las plantas cítricas se pueden ver afectadas por enfermedades producidas por patógenos que son capaces de afectar el desarrollo y la producción de la misma, alterando todos los procesos metabólicos normales de la célula. Lo que conlleva a la muerte de las variedades más susceptibles y una producción minimizada en plantas con cierto grado de resistencia (4).

En décadas anteriores, las zonas productivas de cítricos en Paraguay se vieron afectadas por varios patógenos causantes de enfermedades como el virus de la tristeza de los cítricos, la exocortis y la psorosis, produciendo importantes pérdidas económicas en la producción. Estas enfermedades causaron importantes limitaciones a las nuevas plantaciones puesto que en el país no se disponían de yemas libres de patógenos (4,5).

El virus de la tristeza de los cítricos es una enfermedad causada por un virus que posee diferentes estirpes que se diferencian en su patogenicidad. La transmisión se produce por injerto de corteza, yemas, brotes y tejidos foliares, así como por medio de insectos: *Toxoptera aurantii*, *Toxoptera citricidus*, *Aphis gossypii* y *A. spiraecola*. No existe un tratamiento efectivo contra el virus de la tristeza (6).

La exocortis es una enfermedad que se transmite por

injerto de yemas infectadas en árboles sanos o de forma mecánica a través de la poda con herramientas contaminadas (7). No son causados por virus, sino por patógenos restringidos al reino vegetal denominados viroides. La exocortis se caracteriza por producir escamas y grietas verticales, manchas amarillas en brotes tiernos y enanismo. Asimismo, las plantas afectadas suelen presentar un follaje pobre, un vigor escaso y una cosecha baja (8). La única forma de combatir la enfermedad es mediante la prevención con el uso de plantas libres de patógenos (9).

La psorosis es una enfermedad producida por el virus *Citrus psorosis virus*, cuyo síntoma principal es la formación de costras y descamaciones en troncos y ramas. El virus es transmitido mediante la propagación del material afectado. Este virus puede eliminarse utilizando las técnicas de termoterapia y microinjerto. Las especies más afectadas a esta enfermedad son el naranjo dulce, mandarina y pomelo, siendo el naranjo amargo y el limón rugoso asintomáticos (10).

Además de las enfermedades descritas anteriormente, existen otras que afectan en la actualidad a la producción citrícola paraguaya. Entre estas se encuentran la leprosis, la clorosis variegada de los cítricos y la cancrrosis, aunque la enfermedad más importante a nivel mundial continúa siendo el Huanglongbing (HLB).

La leprosis de los cítricos es una enfermedad causada por un virus, se transmite a través de ácaros del género *Brevipalpus* y afecta primordialmente a naranjos y mandarinos. Fue registrada por primera vez en el Sur de América en Paraguay por Spegazzini (1920) (11).

La clorosis variegada de los cítricos afecta principalmente al naranjo dulce, es producida por la bacteria gran negativa denominada *Xylella fastidiosa subsp. pauca*. Las hojas presentan lesiones gomosas, abultadas en el envés y en el haz aparece una clorosis. Cuando los síntomas se expanden, las hojas nuevas resultan ser pequeñas y tienden a curvarse hacia arriba. El tamaño de los frutos se reduce considerablemente y la cáscara se endurece. Una vez infectado el árbol, se vuelve improductivo en tres años y su crecimiento se reduce notablemente (12).

La cancrrosis de los cítricos es causado por la bacteria *Xanthomonas axonopodis pv citri* (Xac) y es potencialmente destructiva. Se caracteriza por formar lesiones corchosas con un halo típico en todas las partes aéreas del árbol. Genera infecciones severas que causan defoliación, gajos secos, caída prematura de frutos y manchas redondas en los frutos (13).

Finalmente, la enfermedad más devastadora para la citricultura a nivel mundial es el HLB. Es causado por bacterias gran negativas del género *Candidatus Liberibacter*: denominado *Candidatus*. Estas bacterias se introducen a la planta mediante un vector (psílido) en el floema del hospedador, y se contaminan en su totalidad a través del sistema vascular, causando la muerte después de dos a tres años de la infección. Los síntomas que presentan los árboles

son manchas en hojas, hojas más pequeñas con algunos síntomas de deficiencia nutricionales y venas amarillas. Las frutas presentan colores anormales, formas irregulares, sabor amargo y presentan semillas abortadas. En la actualidad no existe tratamiento efectivo para esta enfermedad (14).

Técnicas para el diagnóstico de enfermedades

Para el diagnóstico de estas enfermedades que afectan a los cítricos existen varias técnicas de detección, entre ellas se encuentran los métodos biológicos, serológicos y moleculares. Los ensayos biológicos se realizan empleando plantas indicadoras de especies cítricas, que expresan los síntomas característicos de la enfermedad en cuestión. Es el método más utilizado para la detección de la presencia de patógenos que se propagan a través del injerto. Las desventajas de este método se basan en costos elevados, la larga duración que implica en obtener un diagnóstico y el requisito de contar con plantas indicadoras específicas para cada enfermedad. Por otra parte, las técnicas serológicas se fundamentan en la reacción antígeno-anticuerpo, la cual posibilita la identificación y caracterización de fitopatógenos. Para ello, se lleva a cabo la detección de antígenos, ya sean estructurales o no, presentes en los patógenos. Entre estos métodos se encuentran la técnica inmunoenzimática (ELISA), la inmunofluorescencia y la inmunoelectromicroscopía. La inmunofluorescencia permite detectar la presencia de CTV, el virus de la psorosis, la leprosis, entre otros patógenos, y a través de la inmunoelectromicroscopía resulta posible la detección de los viriones del virus de la tristeza de los cítricos (15).

Las técnicas moleculares se fundamentan en la detección de ácidos nucleicos. Permite la detección de cualquier tipo de patógeno y presentan mayor especificidad y sensibilidad. En contrapartida, son más costosos. El análisis mediante electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida como complemento de ensayos biológicos en cidrio Etrog (*Citrus medica*) posibilita la detección de viroides de cítricos y la certificación de materiales de propagación libres de estos patógenos. Por otra parte, la hibridación de ácidos nucleicos es la técnica más empleada para la detección de patógenos. Se ha empleado esta técnica para detectar el virus de la tristeza de los cítricos (15).

Entre todas las técnicas moleculares existentes para la detección de patógenos que afectan a los cítricos, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la principal debido a su sensibilidad y amplia posibilidad de aplicación. La PCR convencional ha permitido el diagnóstico de patógenos que afecta a los cítricos, y recientemente un nuevo fitoplasma con sintomatología semejante a la de HLB. La PCR con transcripción inversa (RT-PCR) resulta limitante en los análisis de rutina por su elevado costo y por ser muy laboriosa. Se ha aplicado en la detección de patógenos como: los virus de la tristeza de los cítricos, de la psorosis y de la leprosis (15).

Todas estas enfermedades descritas son preocupantes y requieren ser encaradas de forma específica, para combatirlas, convivir con ellas y saber cómo tratarlas. Con el fin de encontrar una condición favorable para aumentar la producción citrícola en Paraguay, se necesita fortalecer, afianzar y realizar programas de control adecuado de modo que, finalmente los agricultores puedan ser eficientes en su producción y tener una renta económica importante.

Obtención de plantas libres de patógenos

El microinjerto de ápices caulinares *in vitro* es una técnica que permite la obtención de plantas libres de patógenos. Consiste en injertar los ápices caulinares de una planta enferma en portainjertos obtenidos por germinación de semillas *in vitro*. De igual manera, se pueden emplear plantas micropropagadas como patrones. Lo esencial de esta técnica es que dichos portainjertos se encuentren libres de patógenos (16).

Existen algunos virus como el de la tristeza de los cítricos y de la psorosis que resultan difíciles de eliminar a través del microinjerto, por tanto, para asegurar la sanidad del vegetal se debe combinar con otro tratamiento como la termoterapia (3)

El microinjerto presenta la ventaja de obtener plantas genéticamente idénticas a la planta madre además de permitir la eliminación de los patógenos que son termoes- tables. Mediante este procedimiento, en Paraguay se han obtenido un gran número de variedades de plantas cítricas libres de patógenos que van directo al invernadero luego de un mes de realizar el injerto (3,16).

Centros de investigaciones en biotecnología citrícola en Paraguay

Paraguay cuenta con dos principales centros de investigación que realizan trabajos de biotecnología en cítricos buscando principalmente obtener plantas libres de patógenos que puedan ser distribuidas por todo el país.

El Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA) se creó en el año 2010 por Ley de la Nación N° 3788, con personería jurídica autárquica de derecho público vinculada con el Poder Ejecutivo, a través del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Tiene como objetivo principal la generación, rescate, adaptación, validación, difusión y transferencia de la tecnología agraria, y el manejo de los recursos genéticos agropecuarios y forestales. A través del desarrollo de programas de investigación y de tecnologías permite elevar la productividad de los productos de origen agropecuario y forestal, a fin de potenciar su competitividad para el mercado interno como el mercado de exportación (17).

Con el fin de apoyar la reactivación de la citricultura nacional, en 2016 el Centro de Investigación “Hernando Bertoni” del IPTA de Caacupé inició las ventas de mudas

de cítricos certificados, donde se dispone de 11 especies libres de enfermedades (17).

Entre las variedades de naranja que se encuentran disponibles están: Hamlim, Valencia, Mbuyapey, bonanza, folha mucha; lima Tahití; mandarina de las variedades Murcott y Okitsu; y limón de la variedad Limonaria 8^a. La especie de mayor demanda desde que inició la comercialización de los plantines es la Lima Tahití (17).

En el marco de la emergencia fitosanitaria por HLB, en el centro de investigaciones del IPTA de Caacupé, desde el 2014, se inició la construcción de invernaderos para la producción de yemas y mudas certificadas. Estos procedimientos se realizaron con el objetivo de la reactivación de la citricultura nacional, cumpliendo todos los procesos de certificación de plantas sanas y libres de la enfermedad. Este trabajo fue emprendido por varias instituciones: Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas (SENAVE), Crédito Agrícola de Habilitación (CAH) y el IPTA. Recientemente se han obtenido plantas de cítricos, logradas por microinjerto libres de patógenos para su reproducción y su posterior distribución a los productores (17).

Por otra parte, en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción (UNA) se llevan a cabo varias investigaciones biotecnológicas en cítricos. Uno de los investigadores principales es el Ing. Luis González, Máster en Agronomía (Fitopatología) de la Universidad Federal de Viçosa, Brasil; ingeniero agrónomo de la Universidad Nacional de Asunción, quien aplica esta tecnología desde hace ya más de 25 años.

Programas de mejoramiento

Para resolver los inconvenientes que surgieron luego de la aparición de las enfermedades que afectaron a la citricultura paraguaya, en el año 1990 fue establecido el Programa de Mejoramiento Cítrico en la Facultad de Ciencias Agrarias. El objetivo fue producir plantas libres de patógenos con características agronómicas adecuadas y una amplia gama de especies y variedades para su propagación comercial y experimental. El programa comenzó con la limpieza de las variedades por medio del microinjerto de ápices caulinares, la detección de patógenos celulares por medio de técnicas serológicas y moleculares, además de la multiplicación de esas variedades seleccionadas. La detección de patógenos celulares por medio de estas técnicas es un programa continuo. Dependiendo de la demanda se preparan las plantas para poder cumplir con los requerimientos que exige el mercado (4, 18).

Mediante este programa se dieron a conocer la existencia de clones (nativos e introducidos) que eran poco difundidos y que son capaces de contribuir significativamente a la diversificación cítrica con plantas de alta calidad y productividad. De igual manera, se ha logrado la detección de enfermedades que nunca antes se habían

hecho en el país como la psorosis, exocortis, tristeza de los cítricos, HLB, por medio de técnicas moleculares como la PCR (19).

Diez años después de la implementación del programa de mejoramiento cítrico se demostró que el virus de la tristeza de los cítricos era el patógeno más común, presentándose dos situaciones muy diferentes según el origen del material indexado. El Test de ELISA mostró que los cítricos seleccionados en la Región Oriental resultaron infectados en el 100% de las plantas injertadas, mientras que en la Región Occidental fueron encontradas plantas libres de este virus. Las enfermedades del grupo psorosis resultaron comunes en mandarinas y naranjas dulces. Los síntomas de exocortis fueron encontrados solamente en plantas injertadas sobre portainjertos susceptibles como el Citrange Troyer o *Poncirus trifoliata*. La presencia de exocortis fue confirmada por el indexing en la Cidra Etrog. En algunos casos, el virus de la psorosis no fue eliminado en el primer intento, por lo que se hizo necesario repetir el proceso incluyendo la termoterapia a fin de asegurar la eliminación del patógeno (19).

Dentro de este programa también se identificó la presencia de cancrrosis utilizando técnicas serológicas y biológicas, en las principales regiones productoras del país. Para ello, fueron analizadas 586 muestras foliares con síntomas parecidos a la cancrrosis en nueve departamentos de la región Oriental y en un departamento de la región Occidental. En la región Oriental se obtuvo un 33,8% de infección, y en la región Occidental un 31,4%, lo que demuestra la amplia distribución de esta bacteria en las zonas cítricas del país (20).

Por otra parte, para la obtención de plantas de naranjo dulce *Citrus sinensis* (L) Osbeck v. Folha mucha libres del virus de la psorosis, Mendoza et al. (2004) utilizaron la combinación de las técnicas de la termoterapia y microinjerto de ápices caulinares in vitro. Los resultados de las pruebas biológicas en las plantas indicadoras demostraron que las tres plantas madres obtenidas se encontraban libres de la enfermedad, comprobando la eficiencia de la combinación de la termoterapia y el microinjerto de ápices caulinares in vitro (21).

Banco de germoplasma

La Facultad de Ciencias Agrarias cuenta con varios viveros certificados por el Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas (SENAVE). La finalidad de estos viveros es la multiplicación de variedades sanas para que posteriormente puedan ser ofrecidas a los productores. Entre las variedades más demandadas se encuentran las precoces y las tardías. Dentro de las variedades precoces se hallan las Washington Navel, Bahía y Bahianinha, newhall; y dentro de las tardías están las valencias, calderón, y la folha mucha.

Asimismo, se cuenta con un banco de germoplasma

de diversas variedades de cítricos, todas obtenidas por microinjerto. Muchas de ellas han sido distribuidas a varias zonas del país de acuerdo a las necesidades de los agricultores. Las variedades que se encuentran en el banco de germoplasma se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Variedades de cítricos en el Banco de Germoplasma de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNA. (www.agr.una.py, fecha de acceso 18/12/17)

Limas Acidas	Sútil Tahiti
Limones	Eureka Frost
Naranjas	
Tempranas	Lima (Caazapá) Mbuyapey New may
Media	Westin Salustiana Bahia (Navel) Bahianinha San Miguel
Tardías	Navelate Lanelate Valencia Late Valencia Calderón Folha Murcha
Pomelos	
Blancos	Criollo (con semillas) Marsh seedless (sin semillas)
Rojos	Río Red Red Blush Texas Ruby Red Star Ruby
Mandarinas	Satsuma Okitsu Clementinas Mariscal López Montenegrina Ellendale Murcott

Conclusiones

En Paraguay existen dos centros de referencia sobre investigación de biotecnología cítrica que son el IPTA y el Facultad de Ciencias Agrarias, los cuales tienen programas de mejoramiento de cítricos. Ambos centros proveen a los productores plantas libres de enfermedades, mediante la aplicación de microinjertos de ápices caulinares principalmente, con la posterior confirmación por técnicas serológicas y moleculares de la ausencia de enfermedades en las mismas. La utilización de la biotecnología para el mejoramiento de cultivos permite llegar al productor, con materiales de excelente calidad genética y sanitaria en períodos de tiempo cortos, comparados con las técnicas convencionales.

Las enfermedades que más afectan a los cítricos son la cancrrosis, la psorosis, el virus de la tristeza de los cítricos y últimamente el más letal, el HLB. En Paraguay, no existe un control estricto de este último por parte de las instituciones encargadas de velar por el exterminio del mismo. Para

tal fin se deberían eliminar todas las plantas cítricas a fin de erradicar su propagación, así como lo viene realizando el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) en Misiones Argentina, el cual prohíbe la replicación de plantas hasta que las condiciones fitosanitarias sean las adecuadas para el cultivo de los cítricos.

Si bien estos centros de investigación vienen realizando trabajos desde hace más de 25 años, no existe suficiente información sobre los avances realizados y tampoco sobre nuevas tecnologías o innovaciones en el campo biotecnológico. Se debería apostar más fuertemente a la biotecnología en esta área de manera de recuperar el estatus de país citrícola, apostando a nuevas tecnologías y técnicas para el mejoramiento de plantas resistentes a enfermedades como también en la erradicación de los vectores transmisores de las mismas por parte de las instituciones encargadas.

Agradecimientos

En la elaboración de este trabajo de investigación tuvimos la colaboración del Ing. Luis González Segnana a quien agradecemos por la información brindada. Y a su vez, al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT).

Bibliografía

1. Kessel, A. *Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales una vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies*. Cultivos Tropicales; vol. 29(3): p. 27-37, 2008.
2. Cáceres, S.; Aguirre, A.; Costa, N.; Coll, O.; González Segnana, L.; Fariña, N.; Tassi, A.D.; Calegario, R.F.; Moraes, G.J.; Freitas-Astúa, J.; Pereira, J.A.; Salaroli, R.B.; Kitajima E.W. *Present status of citrus leprosis in Argentina and Paraguay*. Tropical plant pathology; vol 38(4): p. 282-294, 2013.
3. González Segnana, L.R.; Villalba, N.V. *Mejoramiento cítrico (Etapa I)*. Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, 2001.
4. González Segnana, L.R. *Producción de plantas cítricas libres de virus: Informe 1*. Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional de Asunción. Dirección Gral. de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, 1991.
5. González Segnana, L.R. *Producción de plantas cítricas libres de virus: Informe 2*. Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional de Asunción. Dirección Gral. de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, 1992.
6. Barahona Cockrell, M.; Sancho Barrantes, E. *Fruticultura especial: fascículo 1: cítricos*. Fruticultura II, Editorial Universidad Estatal a Distancia, 1991.
7. Lin C. Y.; Wu, M. L.; Shen, T. L.; Yeh, H. H.; Hung T. H. *Multiplex detection, distribution and genetic diversity of Hop stunt viroid and Citrus exocortis viroid infecting citrus*

- in Taiwan*. Virology Journal, vol. 12(11): p. 1-11, 2015.
8. Duran-Vila, N. *Enfermedades de cítricos causadas por viroides: exocortis y caquexia*. Vida Rural, p. 52-56, 2004.
 9. Alcántara-Mendoza, S.; Vergara-Pineda, S.; García-Rubio, O.; Cambrón-Sandoval, V.H. *Characterization of Citrus exocortis viroid in different conditions of indexing*. Revista Mexicana de Fitopatología; vol. 35: p. 284-303, 2017.
 10. Panno, S.; Davino, S.; Tuttolomondo, P.; Iacono, G.; Davino, M.; Rubio, L.; Galipienso, L. *Cítricos ornamentales como vector de enfermedades: riesgo para el comercio internacional*. Actas de Horticultura N° 68, p. 25-33, 2014.
 11. Leon, G.; Roy, A.; Choudhary, N. Brlansky, R. *Parámetros de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos por Brevipalpus yothersi (Acari: Tenuipalpidae)*. Revista Colombiana de Entomología, vol. 43(2): p. 215-222, 2017.
 12. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Ficha técnica N° 34: Clorosis variegada de los cítricos (CVC) *Xylella fastidiosa* subsp. pauca. México, D.F, 2013.
 13. González Segnana, L.R. *Cancrosis de los cítricos: detección serológica y biológica en el Paraguay*. Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional de Asunción. Dirección Gral. de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, 1996.
 14. Garza-Saldaña, J.J.; Varela-Fuentes, S.; Gómez-Flores, W. *Métodos para la detección presuntiva de Huanglongbing (HLB) en cítricos*. Biotecnología y Ciencias Agropecuarias; vol 11(2): p. 93-104, 2017.
 15. Batista, L.; Peña, I.; López, D.; Pérez, J.M.; Llauger, R. *Técnicas de diagnóstico de enfermedades que afectan a los cítricos*. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba, p. 1-12, [s.f.].
 16. Navarro, L.; Juárez, J. *Aplicaciones de la biotecnología en los cítricos y otros cultivos*. Comunidad Valenciana Agraria, p. 1-12, [s.f.].
 17. Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA) [en línea] Disponible en: (<http://ipta.gov.py/index.php/noticias/inicio-venta-de-primeras-mudas-de-citricos-sanos-en-ipta-caacupe>). (Acceso 23 Feb 2017).
 18. González Segnana, L.R. *Producción de Plantas Cítricas Libres de Virus*. Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, 1993.
 19. González Segnana, L.R.; Villalba, N.V. *Programa de Mejoramiento Cítrico: Diez años de su implementación en la Facultad de Ciencias Agrarias*. Investigación Agraria, vol. 5(1): p. 33-38, 2003.
 20. González Segnana, L.R.; Villalba, N.V. *Cancrosis de los Cítricos: Detección Serológica y Biológica en el Paraguay*. Universidad Nacional de Asunción Facultad de Ciencias Agrarias, 2000.
 21. Mendoza, G.; Villaba, N.V.; González, L.R. *Obtención de plantas de naranjo dulce Citrus sinensis (L) Osbeck V. Folha Murcha, libre del virus de la psorosis a través de termoterapia y microinjerto de ápices caulinares in vitro*. Investigación Agraria; vol. 6(1): p. 15-19, 2004.

Recibido: 18/05/2017.

Aprobado: 10/10/2018.