

## Bệnh Huanglongbing trên cây có múi: các triệu chứng điển hình và phương pháp chẩn đoán tại hiện trường

Phùng Trường Trinh<sup>1</sup>, Nguyễn Quốc Trung<sup>2</sup>, Đồng Huy Giới<sup>2</sup>,  
La Việt Hồng<sup>3</sup>, Phạm Minh Triển<sup>1</sup>, Chu Đức Hà<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>2</sup>Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

### An overview of Huanglongbing disease of citrus: typical symptoms and point-of-care diagnosis methods

Phung Truong Trinh<sup>1</sup>, Nguyen Quoc Trung<sup>2</sup>, Dong Huy Gioi<sup>2</sup>,  
La Viet Hong<sup>3</sup>, Pham Minh Trien<sup>1</sup>, Chu Duc Ha<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>University of Engineering and Technology, Vietnam National University Hanoi

<sup>2</sup>Vietnam National University of Agriculture

<sup>3</sup>Hanoi Pedagogical University 2

\*Corresponding author: cd.ha@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.13.5.2024.040-050>

#### TÓM TẮT

Nghiên cứu này cung cấp một cái nhìn toàn diện về các triệu chứng và phương pháp phát hiện bệnh Huanglongbing, một trong những bệnh nghiêm trọng nhất ảnh hưởng đến các đối tượng cây có múi hiện nay. Triệu chứng điển hình của bệnh Huanglongbing được ghi nhận là sự xuất hiện của các đốm vàng không đối xứng trên lá, sự biến đổi màu sắc không đồng đều trên quả, và tổn thương nghiêm trọng đối với hệ thống rễ cây. Do vậy, việc phân biệt giữa bệnh Huanglongbing và các tình trạng thiếu hụt dinh dưỡng là cần thiết để đảm bảo áp dụng đúng các biện pháp quản lý và điều trị, tránh lãng phí nguồn lực. Đồng thời, các phương pháp phát hiện sớm và chính xác tại hiện trường, như khuếch đại DNA đẳng nhiệt thông qua vòng và khuếch đại nucleic acid đẳng nhiệt là chìa khóa để kiểm soát hiệu quả sự lây lan của bệnh. Ngoài ra, việc áp dụng công nghệ tiên tiến như xử lý ảnh và giám sát từ xa thông qua thiết bị bay không người lái cũng có thể cung cấp những công cụ giám sát bệnh hiệu quả. Kết quả từ nghiên cứu này góp phần vào việc phát triển các chiến lược quản lý bệnh Huanglongbing, từ đó cải thiện sức khỏe và năng suất cây có múi, đảm bảo sự phát triển bền vững và ổn định của các vùng canh tác tập trung cây có múi.

#### ABSTRACT

This study provided a comprehensive overview of the symptoms and detection approaches of Huanglongbing disease, one of the most serious diseases affecting citrus today. Typical symptoms of Huanglongbing disease are noted as the appearance of asymmetrical yellow spots on leaves, uneven color changes on fruits, and severe damage to the plant's root system. Therefore, distinguishing between Huanglongbing disease and nutritional deficiencies is necessary to ensure the correct application of management and treatment measures, avoiding waste of resources. At the same time, early and accurate detection methods at the scene, such as loop-mediated isothermal amplification and recombinase polymerase amplification, are the key to effectively controlling the spread of Huanglongbing disease. Furthermore, the use of new technologies,

#### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 14/05/2024

Ngày phản biện: 25/06/2024

Ngày quyết định đăng: 14/08/2024

#### Từ khóa:

Cây có múi, Huanglongbing, khuếch đại nucleic acid đẳng nhiệt, phát hiện, tại hiện trường, triệu chứng.

#### Keywords:

Citrus, detection, Huanglongbing, loop-mediated isothermal amplification, point-of-care, symptoms

such as image processing and remote monitoring via unmanned vehicles, can provide effective disease surveillance tools. Taken together, the findings of this study could help to establish Huanglongbing disease control systems, which improve citrus health and productivity while also maintaining the sustainable and stable development of citrus cultivation areas.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây có múi, hay còn gọi là cây họ cam chanh (Rutaceae), bao gồm nhiều loài, điển hình như cam ngọt (*Citrus sinensis*), chanh (*C. limon*), bưởi (*C. grandis*) và quýt (*C. deliciusae*). Cây có múi có nguồn gốc từ khu vực Đông Nam Á và đã được thuần hóa và nhân giống rộng rãi trên toàn thế giới [1] vì giá trị dinh dưỡng cao và hương vị thơm ngon [2]. Cụ thể, cây có múi rất giàu vitamin C, chất xơ, và chứa nhiều khoáng chất thiết yếu, giúp tăng cường hệ miễn dịch và hỗ trợ sức khỏe tim mạch [2]. Tuy nhiên, các loại cây có múi cũng đối mặt với nhiều loại sâu bệnh hại, trong đó, đáng chú ý nhất là bệnh Huanglongbing (vàng lá gân xanh) [3]. Đây là một trong những bệnh nguy hiểm nhất đối với cây có múi, do vi khuẩn gram âm *Candidatus Liberibacter* gây ra, được truyền từ cây này sang cây thông qua vector [3-5]. Huanglongbing gây ra tình trạng vàng lá, gây giảm năng suất và chất lượng quả, cây bị chết không được phát hiện và xử lý kịp thời. Trong giai đoạn 2006 - 2011, bệnh Huanglongbing có thể làm ảnh hưởng nặng nề đến vùng trồng cây có múi tại bang Florida (Hoa Kỳ), năng suất sụt giảm 23%, gây tổn thất doanh thu khoảng 1,71 tỷ USD. Hơn nữa, sản lượng cam ở bang Florida đã giảm 67,4%, từ 6,94 - 3,33 tỷ tấn trong khoảng giai đoạn 8 năm, từ mùa 2007 - 2008 đến 2015 - 2016 [6]. Do đó, quản lý và phòng chống bệnh Huanglongbing là một trong những sự chú ý cao từ các nhà nông học và áp dụng các biện pháp tích cực để kiểm soát sâu bệnh và cải thiện sức khỏe cây trồng [7].

Hiện nay, sự hiểu biết về các triệu chứng của bệnh Huanglongbing và khả năng phân biệt chính xác bệnh này với các tình trạng thiếu hụt dinh dưỡng là yếu tố cực kỳ quan trọng [8-12]. Theo đó, các quan sát đều ghi nhận triệu chứng điển hình của bệnh Huanglongbing thường bao

gồm sự thay đổi không đồng nhất của màu sắc trên lá và quả [3, 8-10], điều này đôi khi có thể gây nhầm lẫn với các dấu hiệu của thiếu dinh dưỡng [8-12]. Do vậy, khả năng phát hiện sớm và chính xác bệnh Huanglongbing là chìa khóa để thực hiện các biện pháp quản lý hiệu quả, ngăn chặn sự lây lan và giảm thiểu thiệt hại [3, 13]. Nghiên cứu và phát triển các phương pháp phát hiện bệnh Huanglongbing ngay tại hiện trường (point-of-care) có thể cung cấp các công cụ mạnh mẽ và hiệu quả cho các nhà nông học và quản lý vườn canh tác tập trung cây có múi, hỗ trợ việc chẩn đoán chính xác và nhanh chóng và đảm bảo sự phát triển bền vững của ngành trồng cây có múi [14-16]. Trong bối cảnh hiện nay, việc khám phá và hiểu rõ hơn về khả năng và tiềm năng của các phương pháp này là điều cần thiết để đối phó hiệu quả hơn với bệnh Huanglongbing. Tuy nhiên, các bài nghiên cứu tổng quan mô tả một cách toàn diện về triệu chứng và các phương pháp chẩn đoán bệnh Huanglongbing vẫn chưa được cập nhật đầy đủ [3, 7, 10, 13, 17].

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm mô tả một cách toàn diện về triệu chứng điển hình và các phương pháp chẩn đoán bệnh Huanglongbing trên cây có múi. Cụ thể, các triệu chứng điển hình của bệnh Huanglongbing trên các cơ quan/bộ phận chính trên cây có múi đã được mô tả và so sánh với các triệu chứng xảy ra trong tình trạng thiếu hụt dinh dưỡng. Sau đó, các phương pháp chẩn đoán bệnh Huanglongbing, dựa trên mô tả hình thái và cách tiếp cận sinh học phân tử đã được tóm lược. Cuối cùng, một số giải pháp phát hiện bệnh Huanglongbing ngay tại hiện trường đã được đề xuất. Các kết quả này đã góp phần thiết lập một chiến lược toàn diện và hiệu quả hơn trong việc quản lý và ngăn ngừa bệnh Huanglongbing, nhằm bảo vệ các vùng trồng

cây có múi và tăng cường tính bền vững trong sản xuất nông nghiệp tại các địa phương.

## 2. TRIỆU CHỨNG ĐIỂN HÌNH CỦA BỆNH HUANGLONGBING TRÊN CÂY CÓ MÚI

Tác nhân gây bệnh Huanglongbing ban đầu được cho là nhóm mycoplasma, sau đó, dựa trên quan sát hình thái và đặc điểm sinh trưởng, tác nhân gây bệnh Huanglongbing được xác định là vi khuẩn. Dựa trên trình tự 16S rRNA, tác nhân gây bệnh thuộc chi *Candidatus Liberibacter*, họ Rhizobiaceae, nhóm alphaproteobacteria. Ít nhất 45 chủng *Candidatus Liberibacter* spp. đã được xác định, gồm 3 loài, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, '*Candidatus Liberibacter africanus* (chỉ tồn tại ở châu Phi) và *Candidatus Liberibacter americanus* (chỉ tồn tại ở Brazil) [3, 5]. Vector truyền bệnh được xác định là loài rầy chổng cánh châu Á (*Diaphorina citri*), có đặc điểm chịu được nhiệt độ cao nhưng nhạy cảm với độ ẩm cao, và rầy cam quít châu Phi (*Trioza erytreae*), nhạy cảm với nhiệt độ. Một số nghiên cứu cho thấy, mức độ nhiễm *Candidatus Liberibacter asiaticus* tại các mô cơ quan chính trên cây có múi rất khác nhau, như tại mẫu lá, gân lá và vỏ cây có thể dao động từ  $7 \times 10^8$  gen tương đồng/g (ở cây bưởi) đến  $2 \times 10^{11}$  gen tương đồng/g (ở cây cam ngọt), trung bình đạt  $10^{10}$  gen tương đồng/g. Trong điều kiện nhà kính, *Candidatus Liberibacter asiaticus* dễ dàng xâm nhiễm trong các mẫu rễ cây có múi, với nồng độ ở ngưỡng  $1 \times 10^{10} - 6 \times 10^{10}$  gen tương đồng/g rễ, trong khi gần như không phát hiện được tác nhân gây bệnh trong mẫu rễ khi trồng ngoài thực địa. Ở mẫu quả có triệu chứng thu thập từ các nhánh nhiễm bệnh, nồng độ *Candidatus Liberibacter asiaticus* không đồng đều giữa các mô trong quả, dao động từ  $10^5 - 10^9$  gen tương đồng/g (giá trị trung bình đạt  $2 \times 10^7 - 4 \times 10^7$  gen tương đồng/g).

### 2.1. Triệu chứng trên lá cây có múi bị bệnh Huanlongbing

Một trong những triệu chứng điển hình trên lá của cây có múi bị ảnh hưởng bởi bệnh Huanglongbing là sự xuất hiện của các đốm bất

đối xứng xung quanh gân lá chính [3]. Đây không chỉ là đặc điểm đặc trưng để phát hiện bệnh Huanglongbing mà còn phản ánh mức độ nhiễm trùng nghiêm trọng của cây có múi [8-10].

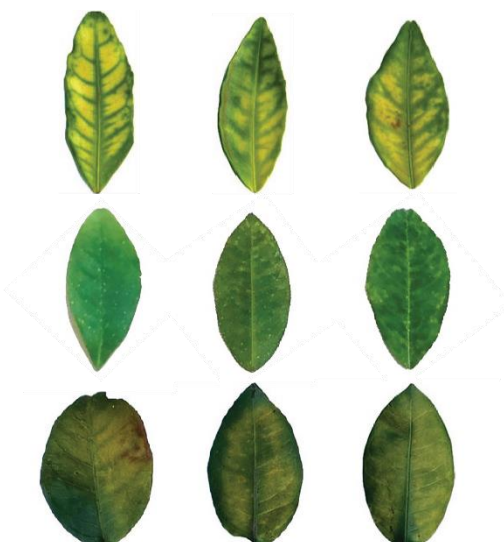
Tuy nhiên, việc chẩn đoán gặp phải thách thức do các triệu chứng của bệnh Huanglongbing có thể bị nhầm lẫn với tình trạng thiếu sắt (Fe) hoặc các rối loạn chuyển hóa khác, do làm lá trên cây có múi đều chuyển sang màu vàng [11], điều này làm tăng độ phức tạp của quá trình phát hiện bệnh [4, 8]. Theo đó, ấu trùng của rầy chổng cánh châu Á chủ yếu tập trung nhiều (~64,5%) ở mặt dưới của lá so với mặt trên (~35,5%) [12]. Vết đốm do bệnh Huanglongbing thường xuất hiện chủ yếu ở lá non và lá trưởng thành ở các vị trí ngẫu nhiên trên tán.

### 2.2. Triệu chứng trên quả cây có múi bị bệnh Huanlongbing

Các triệu chứng trên quả của cây có múi bị nhiễm bệnh Huanglongbing bao gồm sự thay đổi màu sắc, thường xuất hiện từ cuống quả, trong khi quả chín sinh lý thường có sự thay đổi màu sắc (màu xanh sang vàng/cam) bắt đầu từ vị trí đỉnh quả [18]. Một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng quả bị bệnh Huanglongbing thường nhỏ hơn so với đối chứng, không đồng nhất về hình dạng và hạt có thể chuyển sang màu nâu hoặc đen [19]. Những biến đổi này không chỉ ảnh hưởng đến chất lượng của quả mà còn gây rụng quả non. Đặc biệt, mặc dù một số triệu chứng của bệnh Huanglongbing có thể tương tự như tình trạng thiếu hụt dinh dưỡng, nhưng điểm đặc trưng của bệnh Huanglongbing là thường xuất hiện cục bộ trên một cành hoặc một phần của cây trước khi lan rộng, khác biệt với sự phân bố đồng đều gây ra bởi tình trạng thiếu hụt dinh dưỡng trên toàn bộ cây.

### 2.3. Triệu chứng trên toàn bộ cây có múi bị bệnh Huanglongbing

Nhìn chung, các triệu chứng thường thấy trên cây có múi nhiễm bệnh Huanglongbing là sự xuất hiện của các đốm vàng và hiện tượng gân lá vàng trên những chiếc lá trưởng thành, cùng với hiện tượng các chồi chuyển sang màu vàng (Hình 1).



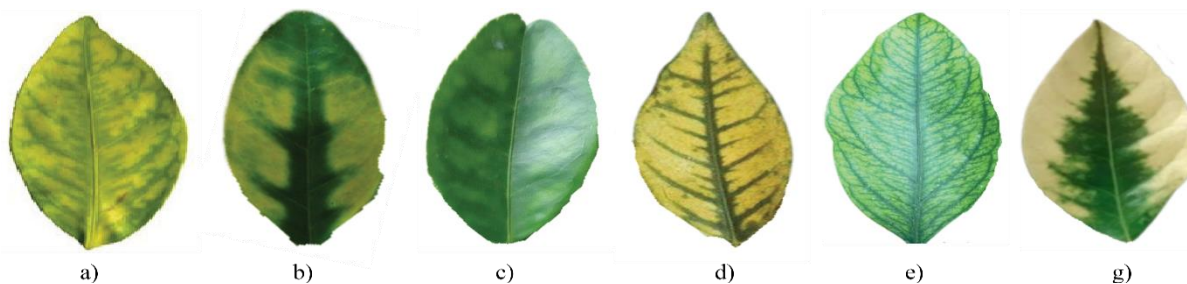
Hình 1. Triệu chứng điển hình của bệnh Huanglongbing trên lá cây có múi

Ngoài ra, các biểu hiện khác như chết chồi, ra hoa trái mùa, và sự chuyển màu vàng của toàn bộ cây, cũng như rụng quả là những dấu hiệu điển hình. Các triệu chứng này thường không xuất hiện đồng đều trên toàn bộ tán cây mà chỉ ảnh hưởng đến từng phần. Đáng chú ý, bệnh Huanglongbing gây ra tổn thương nghiêm trọng đối với hệ thống rễ của cây có múi [20], dẫn đến khả năng phát sinh rễ con giảm dần theo thời gian [21] và sinh khối rễ giảm 40 - 50% (so với cây khỏe mạnh) [22].

#### 2.4. Sự khác biệt giữa cây có múi nhiễm bệnh Huanglongbing và thiếu hụt dinh dưỡng

Việc phân biệt giữa cây có múi nhiễm bệnh Huanglongbing và các trường hợp thiếu hụt dinh dưỡng là hết sức quan trọng vì nó ảnh hưởng trực tiếp đến các quyết định quản lý và điều trị cho vườn cây [9]. Theo đó, bệnh Huanglongbing gây ra bởi các chủng *Candidatus Liberibacter spp.* [3, 5] không thể điều trị bằng các biện pháp bổ sung dinh dưỡng

và đòi hỏi phải loại bỏ cây nhiễm bệnh để ngăn chặn sự lây lan [7, 10], trong khi các triệu chứng do thiếu hụt dinh dưỡng {điển hình như kẽm (Zn) [23, 24], mangan (Mn) [6, 25], magiê (Mg) [26], Fe và canxi (Ca) [6, 23]} có thể được khắc phục hiệu quả bằng cách điều chỉnh chế độ bón phân và dinh dưỡng cho cây [6, 27]. Nếu nhầm lẫn giữa hai tình trạng này, có thể dẫn đến việc áp dụng những biện pháp không phù hợp, ví dụ như bón phân cho một cây bị nhiễm bệnh Huanglongbing không mang lại kết quả cải thiện sức khỏe cây [4, 28] mà còn lãng phí nguồn lực và thời gian [29]. Ngược lại, nếu một cây chỉ thiếu dinh dưỡng mà được xử lý như một cây nhiễm bệnh Huanglongbing, điều này có thể dẫn đến việc loại bỏ không cần thiết hoặc bỏ qua cơ hội để cải thiện sức khỏe và năng suất của cây qua bón phân. Do đó, việc chẩn đoán chính xác không chỉ giúp bảo vệ sức khỏe cây trồng mà còn góp phần vào việc quản lý nguồn lực kinh tế một cách hiệu quả [8-10].



Hình 2. Triệu chứng điển hình của bệnh Huanglongbing (a), thiếu hụt Mg (b), Mn (c), Zn (d), Fe (e) và Ca (g) trên lá cây có múi

Như đã mô tả, các triệu chứng của cây nhiễm bệnh Huanglongbing thường bao gồm các đốm vàng không đối xứng trên lá [3, 4]. Điều này khác biệt rõ rệt so với các triệu chứng thiếu hụt dinh dưỡng, thường xuất hiện đối xứng hai bên của gân lá [11, 12]. Cụ thể, lá cây có múi thiếu hụt Zn thường có đốm vàng giữa các gân lá, đối xứng qua gân chính [23, 24], làm cho lá cây bị biến dạng, nhỏ hơn và hẹp hơn, có màu vàng úa [30, 31]. Tương tự, tình trạng thiếu hụt Mn làm xuất hiện các đốm màu xanh nhạt - xanh đậm một cách rõ rệt ở các lá non, và các triệu chứng này cũng xuất hiện một cách đối xứng [6, 25, 30]. Khi cây thiếu Mg, các lá thể hiện hình dạng "V" ngược, với phần màu xanh ở hai bên của gân lá khác biệt so với màu vàng của phần còn lại của lá [26]. Những thiếu hụt này dẫn đến các khoảng màu đối xứng [26], khác với các mô hình không đối xứng của bệnh Huanglongbing [3, 4]. Trong khi đó, tình trạng thiếu hụt Fe có thể gây ra triệu chứng lá non bị phai màu, chuyển sang màu xanh nhạt. Thiếu hụt Ca được biểu hiện qua việc màu xanh của diệp lục bị mờ đi ở các vị trí mép lá và giữa các gân chính. Tình trạng này cũng làm cho lá trở nên nhỏ hơn, dày lên, lượng lá thừa thớt và giảm sản lượng trái (Hình 2).

Tóm lại, việc phân biệt chính xác giữa cây có múi bị nhiễm bệnh Huanglongbing và các trường hợp thiếu hụt dinh dưỡng là điều thiết yếu để đảm bảo việc triển khai các chiến lược quản lý sức khỏe cây trồng một cách phù hợp [8-10]. Sự phân biệt đúng đắn không chỉ góp phần cải thiện sức khỏe và năng suất của cây trồng mà còn giúp ngăn ngừa sự lãng phí nguồn lực và tối ưu hóa hiệu quả kinh tế tại các vùng canh tác cây có múi tập trung.

### 3. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN CỦA BỆNH HUANGLONGBING TRÊN CÂY CÓ MÚI

Phát hiện bệnh Huanglongbing trong các vườn canh tác tập trung cây có múi đặc biệt khó khăn khi các cá thể cây thường không sinh trưởng và phát triển tương đồng nhau. Một dấu hiệu quan trọng để nhận biết bệnh Huanglongbing là sự xuất hiện của những vùng trên lá có màu sắc thay đổi không đồng đều [3,

4]. Thời điểm thuận lợi nhất để nhận diện bệnh Huanglongbing là từ tháng 9 đến tháng 5 năm sau, kéo dài từ mùa thu, đông và xuân; trong khi thời gian còn lại vào mùa hè, bắt đầu từ tháng 6 đến tháng 8, thường là giai đoạn lá cây phát triển mạnh, khiến dấu hiệu bệnh không rõ ràng. Ví dụ, các nghiên cứu đã ghi nhận sự biến thiên theo mùa của mật độ của vi khuẩn *Candidatus Liberibacter asiaticus* trong cây có múi bị nhiễm bệnh và vector truyền bệnh (rầy chổng cánh châu Á) tại khu vực trồng ở Pakistan [32]. Cụ thể, vi khuẩn *Candidatus Liberibacter asiaticus* được phát hiện ở những cây trồng ở những khu vực có nhiệt độ tối đa lên tới gần 50°C (nhiệt độ trung bình đạt 42°C), tuy nhiên vi khuẩn này hiện diện ở mức rất thấp trong cơ thể của rầy chổng cánh châu Á vào mùa hè (tháng 6 đến tháng 8) và mùa thu (tháng 9 đến tháng 11) [32]. Điều này cho thấy nhiệt độ mùa hè nóng bức ở Pakistan có thể kìm hãm sự nhân lên của *Candidatus Liberibacter asiaticus* trong vector truyền bệnh, nên cây ít nhiễm bệnh Huanglongbing vào thời điểm này [32, 33].

Bước đầu tiên và cực kỳ quan trọng trong quá trình xử lý, kiểm soát bệnh Huanglongbing là phải cắt bỏ những cành cây và quả bị bệnh, đồng thời đánh giá mức độ nhiễm bệnh của cây một cách chính xác thông qua việc kiểm tra kỹ lưỡng các phần khác của cây [13]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng triệu chứng của bệnh vàng lá gân xanh xuất hiện trên nhiều bộ phận của cây, bao gồm lá, quả, cành non và nhánh [13]. Tuy nhiên, việc nhận diện và phân biệt bệnh này không hề đơn giản do sự đa dạng và thay đổi liên tục của các triệu chứng [8-10], đặc biệt khi chúng có thể trùng lặp với các bệnh khác hoặc tình trạng thiếu hụt dinh dưỡng ở cây có múi [6, 23-26].

Phương pháp kiểm tra bằng vẽ vòng tròn (pen test) được coi là cách tiếp cận phổ biến và hiệu quả nhất để phân biệt giữa triệu chứng bệnh Huanglongbing và tình trạng thiếu chất dinh dưỡng ở cây [8-10]. Đây là một kỹ thuật chẩn đoán trực quan, giúp xác định một cách chính xác các mẫu đồng nhất trên cả hai mặt của lá dựa trên việc quan sát mẫu vết đốm trên

lá để xác định tính đối xứng của các triệu chứng. Cụ thể, sử dụng bút để đánh dấu hai vòng tròn trên các nửa đối diện của lá dọc theo gân chính. Sau đó, các dấu hiệu và triệu chứng trong hai vòng tròn này được so sánh để xem chúng có giống nhau hay không. Nếu các triệu chứng giống nhau và có tính đối xứng qua gân chính của lá, điều này thường chỉ ra rằng nguyên nhân là do thiếu hụt dinh dưỡng [6, 23-26]. Ngược lại, nếu các triệu chứng không đối xứng và không giống nhau, điều này có thể gây ra bởi bệnh Huanglongbing [8-10]. Phương pháp này hữu ích trong việc giúp người trồng cây nhanh chóng xác định nguyên nhân của vấn đề mà không cần đến các phương pháp phức tạp hơn như xét nghiệm phòng thí nghiệm, từ đó có thể áp dụng các biện pháp quản lý phù hợp.

Phát hiện sớm bệnh Huanglongbing ở giai đoạn sớm là hết sức cần thiết để ngăn chặn và quản lý bệnh hiệu quả trong vườn canh tác tập trung cây có múi [9, 13, 32, 34]. Việc phát hiện sớm không chỉ giúp hạn chế sự lây lan của bệnh trong vườn canh tác tập trung, mà còn cho phép áp dụng các biện pháp kiểm soát kịp thời, từ đó giảm thiểu chi phí đầu tư cho việc quản lý bệnh. Tuy nhiên, một điểm gây khó khăn trong việc chẩn đoán bệnh Huanglongbing ở giai đoạn sớm là tải lượng vi khuẩn *Candidatus Liberibacter* spp. thấp và phân bố không đồng đều trong các cơ quan/bộ phận chính trên cây có múi [35, 36]. Vì vậy, nhiều cách tiếp cận đã được áp dụng để phát hiện sự hiện diện của các tác nhân gây bệnh ở cấp độ tế bào hoặc phân tử [3, 37], có thể kể đến như kỹ thuật sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (transmission electron microscopy) [37, 38], phản ứng chuỗi polymerase (PCR, polymerase chain reaction) [34, 39, 40], PCR định lượng (quantitative PCR) [39] và khuếch đại DNA đẳng nhiệt thông qua vòng (LAMP, loop-mediated isothermal amplification) [15, 33, 41].

Sử dụng kính hiển vi trong việc phát hiện bệnh trên cây có múi, đặc biệt là bệnh Huanglongbing cũng có thể là một phương pháp hữu hiệu để nghiên cứu sự hiện diện của các tác nhân gây bệnh ở cấp độ tế bào hoặc

phân tử [3, 37]. Theo đó, kính hiển vi điện tử truyền qua (transmission electron microscopy) được sử dụng để kiểm tra các lớp mỏng thu thập từ mẫu lá, cuống lá, thân, và mô rễ của cây có múi nghi ngờ nhiễm bệnh Huanglongbing [37]. Mẫu mô được cố định bằng dung dịch glutaraldehyde ( $C_5H_8O_2$ ) 3% trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó bảo quản qua đêm trong dung dịch đệm potassium phosphate ( $KH_2PO_4$  và  $K_2HPO_4$ ) 0,1 mol/L (pH 7,2) trong tủ lạnh [3]. Mẫu tiếp tục được rửa trong dung dịch đệm và xử lý bằng dung dịch osmium tetroxide ( $OsO_4$ ) 2% trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó được khử nước bằng acetone ( $C_3H_6O$ ), cắt thành các đoạn có kích thước 90 - 100 nm và nhuộm bằng uranyl acetate ( $C_4H_6O_6U$ ) 2%. Cuối cùng, các mẫu được nhuộm sau bằng lead citrate ( $C_{12}H_{10}O_{14}Pb_3$ ) và kiểm tra bằng hệ thống kính hiển vi điện tử truyền qua Morgagni 268 [3, 17]. Tuy nhiên, phương pháp sử dụng kính hiển vi để chẩn đoán bệnh Huanglongbing có một số nhược điểm đáng kể. Trước hết, phương pháp này đòi hỏi kỹ năng chuyên môn cao từ người thực hiện, yêu cầu kiến thức sâu rộng về vi sinh học và kỹ thuật kính hiển vi, điều mà nhiều nông dân có thể không có. Quá trình chuẩn bị mẫu và quan sát dưới kính hiển vi cũng rất tốn thời gian và công sức, đòi hỏi sự tỉ mỉ và kiên nhẫn. Chi phí đầu tư cho kính hiển vi và các thiết bị liên quan thường rất cao, và việc duy trì, bảo dưỡng thiết bị cũng tốn kém. Một hạn chế lớn khác là kính hiển vi thường không phát hiện sớm bệnh, chỉ quan sát được khi bệnh đã phát triển đến giai đoạn muộn. Thêm vào đó, phương pháp này yêu cầu môi trường phòng thí nghiệm với điều kiện ánh sáng và không gian làm việc thích hợp, không thuận tiện cho việc kiểm tra tại chỗ trong các vườn trồng.

Để chẩn đoán chính xác bệnh Huanglongbing, các kỹ thuật sinh học phân tử, phổ biến nhất là PCR, qPCR và LAMP đã được áp dụng. Cụ thể, các bộ mồi đặc hiệu theo trình tự 16S-rRNA OI1/OI2c và OA1/OI2c lần lượt được sử dụng để phát hiện *Candidatus Liberibacter asiaticus* và *Candidatus Liberibacter africanus* bằng kỹ thuật PCR [39].

Một locus gene quan trọng khác được sử dụng để chẩn đoán bệnh Huanglongbing là operon rplKAJL-rpoBC [40]. Đây là một operon đặc trưng ở vi khuẩn, mã hóa các protein K, A, J và L của tiểu đơn vị ribosome lớn, protein B và C của tiểu đơn vị  $\beta$  của enzyme RNA polymerase [40]. Bộ mồi f-rplA2/r-rplJ5 đặc hiệu cho operon rplKAJL-rpoBC được sử dụng để khuếch đại vùng trình tự có kích thước 703 bp cho *Candidatus Liberibacter asiaticus* và 669 bp tương ứng cho *Candidatus Liberibacter africanus*, trong khi *Candidatus Liberibacter americanus* được phát hiện bởi một bộ mồi f-GB1/r-GB3 (đặc hiệu cho vùng 16S rRNA) [34]. Tiếp theo, qPCR cũng được sử dụng để phân tích sự có mặt của *Candidatus Liberibacter spp.* trong mẫu cây có múi, đặc biệt là ở giai đoạn sớm [35]. Ví dụ, dựa vào trình tự genome của *Candidatus Liberibacter asiaticus* (mã số GenBank từ NZ\_ABQW01000001 đến NZ\_ABQW01000034) [42], 30 cặp mồi đặc hiệu cho các gene mã hóa t-RNA methyltransferase, elongation factor protein, outer membrane protein, RNA polymerase b-subunit, DNA polymerase, rDNA, 23S và 16S rRNA đã được thiết kế để nhận diện tác nhân gây bệnh [34]. Phản ứng qPCR sau đó đã được chuẩn hóa với mẫu dò Taqman.

Việc phát hiện bệnh ngay tại hiện trường đóng vai trò hết sức quan trọng trong quản lý sức khỏe cây trồng [16, 43-45], đặc biệt là trong việc kiểm soát các bệnh nghiêm trọng như Huanglongbing trên cây có múi [43]. Phương pháp này cho phép người nông dân và các chuyên gia nông nghiệp nhận diện và xử lý các vấn đề sức khỏe của cây một cách nhanh chóng và hiệu quả, ngay tại nơi xuất hiện bệnh, không cần phải chờ đợi các kết quả phân tích từ phòng thí nghiệm [45]. Điều này không chỉ tiết kiệm thời gian và nguồn lực, mà còn giúp giảm thiểu sự lây lan của bệnh trong thời gian chờ đợi, từ đó hạn chế được sự tổn thất về mặt năng suất và kinh tế. Bên cạnh đó, phương pháp phát hiện bệnh tại hiện trường còn tăng cường khả năng giám sát dịch bệnh liên tục, góp phần vào việc lập kế hoạch và thực hiện các biện pháp

quản lý bền vững cho các vườn cây trồng. Theo đó, kỹ thuật LAMP đã được áp dụng thành công trong việc xác định sự có mặt của một gene (mã số GenBank: ACT57606.1), mã hóa protein LIBASIA\_05175 đặc trưng ở *Candidatus Liberibacter asiaticus* [33]. Điều kiện cho phản ứng LAMP là ngưỡng 65°C trong 60 phút, với các kết quả không có sự nhân lên của đối chứng âm hoặc hiện tượng dương tính giả [33]. Để tối ưu hơn cho quy trình phát hiện bệnh Huanglongbing tại Ấn Độ, trình tự 16S rDNA của ba chủng *Candidatus Liberibacter asiaticus*, bao gồm 'MH B-L3P4 Mo' (mã số GenBank: JQ900235) thu thập tại vùng trung tâm Ấn Độ, 'KhM-ii' (mã số GenBank: JQ692187) thu thập tại vùng Đông Bắc của Ấn Độ và 'CHE-R' (mã số GenBank: KC411976) thu thập tại phía Nam của Ấn Độ, được lựa chọn để thiết kế các cặp mồi LAMP [46]. Theo đó, cặp mồi ngoài (outer primer), bao gồm F<sub>3H1</sub> (5' AATGGGGGCAACCCTGAT 3') và B<sub>3H1</sub> (5' CTTAATCGCCGCCTACG 3'), và cặp mồi trong (internal primer), bao gồm FIP<sub>H1</sub> (5' ACGGTCATTATCTTTCCGGCGTTTTTCATGCCGCTTGATTGAAG 3') và BIP<sub>H1</sub> (5' AGCAGCCGCGGCTAACTTCGTTTTTCGCCAGGTATTCCGCACAA 3'), và cặp mồi tạo vòng (loop primer), bao gồm mồi tạo vòng xuôi FL<sub>H1</sub> (5'AAGAGCTTACATCCCTAAGGCC 3') và mồi tạo vòng ngược BL<sub>H1</sub> (5' AGCCGCGGTATACGAAGGGG 3') được thiết kế để sử dụng trong phản ứng LAMP với nhiệt độ gắn mồi 65°C trong 60 phút [46]. Có thể thấy rằng, kỹ thuật LAMP có độ nhạy và đặc hiệu cao, giúp phát hiện sớm bệnh ngay cả khi lượng DNA hoặc RNA trong mẫu rất thấp, với thời gian thực hiện nhanh chóng (chỉ trong khoảng 30 - 60 phút). LAMP hoạt động ở nhiệt độ đẳng nhiệt (khoảng 60 - 65°C), không cần thiết bị nhiệt độ thay đổi phức tạp, điều này làm cho quá trình khuếch đại dễ thực hiện và tiện lợi. Kết quả của LAMP có thể được quan sát bằng mắt thường thông qua sự thay đổi màu sắc hoặc độ đục, không cần thiết bị phân tích phức tạp. Tuy nhiên, thiết kế mồi cho LAMP phức tạp và tốn thời gian vì yêu cầu nhiều đoạn mồi khác

nhau, đồng thời do LAMP có độ nhạy cao, nguy cơ nhiễm chéo và phát hiện kết quả giả dương cũng cao hơn. Mặc dù có một số hạn chế, LAMP vẫn là một công cụ mạnh mẽ và tiện lợi trong chẩn đoán bệnh Huanglongbing.

#### 4. ĐỀ XUẤT MỘT SỐ GIẢI PHÁP TRONG PHÁT HIỆN BỆNH HUANGLONGBING TRÊN CÂY CÓ MÚI TẠI HIỆN TRƯỜNG

Xử lý ảnh đang ngày càng được chứng minh là công cụ hữu hiệu trong việc phát hiện sớm và chính xác bệnh Huanglongbing trên cây có múi [8, 47]. Công nghệ này cho phép tự động hóa quá trình phát hiện các triệu chứng bệnh như sự xuất hiện không đối xứng của các đốm vàng và biến đổi màu sắc trên lá [3, 8-10], nhờ vào sự hỗ trợ của các thuật toán học máy và trí tuệ nhân tạo, cải thiện độ chính xác và giảm chi phí so với các phương pháp truyền thống [3, 34, 37-40]. Việc áp dụng xử lý ảnh có khả năng phục vụ cho việc giám sát diện rộng thông qua thiết bị bay không người lái (unmanned aerial vehicle) hoặc hệ thống mặt đất không người lái (unmanned ground vehicle), mang lại khả năng quét và phân tích nhanh các khu vực lớn, cung cấp dữ liệu liên tục để theo dõi tiến trình và mức độ lây lan của bệnh Huanglongbing. Đồng thời, theo dõi tình trạng cây bằng công nghệ IoT kết hợp với các cảm biến môi trường giúp giám sát theo thời gian thực các yếu tố như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, và tình trạng dinh dưỡng của cây trồng. Dữ liệu thu thập được từ các cảm biến này có thể được truyền về trung tâm xử lý, nơi các thuật toán phân tích dữ liệu cho phép phát hiện sớm các dấu hiệu bất thường hoặc những thay đổi môi trường có thể làm tăng nguy cơ lây lan bệnh. Việc này không chỉ giúp nông dân có thể phản ứng kịp thời bằng cách điều chỉnh các biện pháp chăm sóc, mà còn tối ưu hóa việc sử dụng tài nguyên như nước và phân bón, từ đó có thể quản lý vườn cây một cách chính xác, hiệu quả và bền vững hơn trong việc phòng chống và kiểm soát bệnh Huanglongbing.

Kỹ thuật LAMP cũng đem lại tiềm năng to lớn trong việc phát hiện sớm bệnh Huanglongbing tại hiện trường, đặc biệt ở

những khu vực thiếu hụt cơ sở hạ tầng điện. Phương pháp này không chỉ nổi bật về độ đơn giản và tốc độ, mà còn về chi phí hiệu quả, giúp nông dân và các nhà quản lý dịch bệnh nắm bắt tình hình một cách nhanh chóng và chính xác múi [33, 43, 45, 46]. Kỹ thuật LAMP có thể được tiến hành ngay tại hiện trường, mà không cần đến các trang thiết bị phức tạp hay sử dụng điện năng [48]. Độ đặc hiệu cao trong phát hiện mầm bệnh cùng với khả năng tích hợp với các công nghệ di động hiện đại cho phép thu thập và phân tích dữ liệu một cách linh hoạt, cải thiện đáng kể khả năng quản lý dịch bệnh trong các cộng đồng nông nghiệp. Nhờ đó, LAMP mở ra hướng tiếp cận mới trong việc bảo vệ và nâng cao năng suất cây trồng trước những thách thức do bệnh Huanglongbing gây ra. Trước hết, LAMP có thể được triển khai tại các trạm kiểm tra nhanh trong vườn hoặc các trung tâm nông nghiệp địa phương, nơi nông dân có thể dễ dàng tiếp cận và sử dụng để phát hiện sớm bệnh trên cây trồng. Điều này giúp giảm thời gian chờ đợi kết quả so với các phương pháp truyền thống và cho phép nông dân thực hiện các biện pháp can thiệp kịp thời. Việc cải tiến và tối ưu hóa kỹ thuật LAMP cũng cần được chú trọng, bao gồm việc phát triển các bộ mồi đặc hiệu và nhạy cảm hơn đối với các biến thể mới của tác nhân gây bệnh.

Gần đây, kỹ thuật khuếch đại nucleic acid (bao gồm DNA và RNA) mục tiêu dựa vào hoạt tính của enzyme recombinase và polymerase (recombinase polymerase amplification) mang lại nhiều lợi thế vượt trội trong việc phát hiện bệnh Huanglongbing ngay tại hiện trường, làm thay đổi cách thức giám sát và quản lý bệnh trên cây có múi [49, 50]. Khả năng khuếch đại nucleic acid được thực hiện thông qua sự tương tác cụ thể của các enzyme và protein, như recombinase, protein bám sợi đơn (single-stranded DNA binding protein) và DNA polymerase thay thế sợi. Những yếu tố này giúp mồi gắn chính xác vào gene mục tiêu và khởi đầu quá trình tổng hợp sợi DNA mới. Kỹ thuật này có thể diễn ra trong khoảng nhiệt độ từ 24 - 45°C, do vậy còn gọi là khuếch đại



nucleic acid đẳng nhiệt. Với khả năng hoạt động hiệu quả ở nhiệt độ thấp và hoàn thành quá trình trong vòng chưa đầy 20 phút, kỹ thuật khuếch đại nucleic acid đẳng nhiệt không chỉ tăng cường tốc độ phản ứng mà còn đảm bảo độ chính xác cao, nhờ vào độ nhạy và độ đặc hiệu cao trong việc nhận diện các chủng *Candidatus*. Đặc biệt, kỹ thuật khuếch đại nucleic acid đơn giản trong thao tác và không đòi hỏi trang thiết bị phức tạp, làm cho nó trở thành công cụ lý tưởng cho các khu vực có điều kiện hạn chế về cơ sở hạ tầng. Mới đây, trình tự genome của 9 chủng *Candidatus* *Liberibacter asiaticus*, bao gồm 'A4' (mã số GenBank: NZ\_CP010804.2), 'gxpsy' (mã số GenBank: NC\_020549.1), 'Ishi-1' (mã số GenBank: NZ\_AP014595.1), 'JXGC' (mã số GenBank: NZ\_CP019958.1), 'psy62' (mã số GenBank: NC\_012985.3), 'ReuSP1' (mã số GenBank: NZ\_CP061535.1), 'JRPAMB1' (mã số GenBank: NZ\_CP040636.1), 'CoFLP' (mã số GenBank: NZ\_CP054558.1) và 'TaiYZ2' (mã số GenBank: NZ\_CP041385.1), chủng *Candidatus* *Liberibacter africanus* 'PTSAPSY' (mã số GenBank: NZ\_CP004021.1) và chủng *Candidatus* *Liberibacter americanus* 'São Paulo' (mã số GenBank: NC\_022793.1) đã được thu thập để thiết kế mồi (có kích thước 30 - 36 nucleotide) và mẫu dò (có kích thước 46 - 52 nucleotide) đặc hiệu cho gene *fusA* (mã số GenBank từ OQ507405 đến OQ507466) [50]. Với quá trình ủ ở 45°C trong 30 phút, kỹ thuật khuếch đại nucleic acid đẳng nhiệt dựa trên mồi và mẫu dò đặc hiệu cho gene *fusA* đã cho phép phát hiện 11 chủng *Candidatus* spp. ở hàm lượng rất thấp (~ 10<sup>1</sup> bản copy/μl) [50]. Đây được xem là một trong những hướng đi tiềm năng trong việc phát hiện sự có mặt của *Candidatus* spp. trong cây có múi ngay tại hiện trường.

## 5. KẾT LUẬN

Bài tổng quan này đã làm sáng tỏ về các triệu chứng và phương pháp phát hiện bệnh Huanglongbing trên cây có múi, cung cấp thông tin quan trọng cho việc chẩn đoán và quản lý bệnh. Triệu chứng của bệnh Huanglongbing trên cây có múi bao gồm sự xuất hiện của các

đốm vàng không đối xứng trên lá, các biến đổi màu sắc của quả từ cuống, và sự suy yếu của toàn thân cây kể cả hệ rễ. Các triệu chứng này thường không đồng đều và có thể dễ dàng bị nhầm lẫn với các tình trạng thiếu hụt dinh dưỡng. Theo đó, việc phân biệt giữa bệnh Huanglongbing và thiếu hụt dinh dưỡng không chỉ giúp tránh các biện pháp quản lý không phù hợp mà còn đảm bảo sử dụng hiệu quả các nguồn lực cho việc bảo vệ và cải thiện sức khỏe cây trồng. Phát hiện và chẩn đoán sớm bệnh Huanglongbing tại hiện trường là yếu tố quan trọng, giúp hạn chế sự lây lan và ảnh hưởng tiêu cực của bệnh đến vườn cây có múi. Các phương pháp như LAMP và khuếch đại nucleic acid đẳng nhiệt mang lại hiệu quả cao trong việc xác định sự hiện diện của bệnh, thậm chí ở các giai đoạn rất sớm, góp phần vào việc kiểm soát bệnh một cách chính xác và kịp thời. Ngoài ra, các kỹ thuật hiện đại như xử lý ảnh tích hợp trên các thiết bị theo dõi đồng ruộng trong quá trình giám sát sức khỏe cây cũng đem lại những tiến bộ đáng kể trong việc theo dõi và phản ứng nhanh chóng với tình hình bệnh. Tóm lại, bài tổng quan này đã đóng góp vào việc xây dựng chiến lược toàn diện và hiệu quả hơn trong quản lý và phòng ngừa bệnh Huanglongbing, qua đó bảo vệ các vùng canh tác cây có múi tập trung và nâng cao sự bền vững trong canh tác nông nghiệp tại các địa phương.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Rao M. J., Zuo H. & Xu Q. (2021). Genomic insights into citrus domestication and its important agronomic traits. *Plant Commun.* 2(1): 100138.
- [2]. Liu S., Lou Y., Li Y., Zhang J., Li P., Yang B. & Gu Q. (2022). Review of phytochemical and nutritional characteristics and food applications of *Citrus* L. fruits. *Front Nutr.* 9: 968604.
- [3]. Ghosh D., Kokane S., Savita B. K., Kumar P., Sharma A. K., Ozcan A., Kokane A. & Santra S. (2022). Huanglongbing pandemic: Current challenges and emerging management strategies. *Plants.* 12(1): 160.
- [4]. Tipu M. M. H., Masud M. M., Jahan R., Baroi A. & Hoque Akma (2021). Identification of citrus greening based on visual symptoms: A grower's diagnostic toolkit. *Heliyon.* 7(11): e08387.
- [5]. Hu B., Rao M. J., Deng X., Pandey S. S., Hendrich C., Ding F., Wang N. & Xu Q. (2021). Molecular signatures between citrus and *Candidatus* *Liberibacter asiaticus*.

PLoS Pathog. 17(12): e1010071.

- [6]. Kwakye S. & Kadyampakeni D. M. (2022). Micronutrients improve growth and development of HLB-affected *Citrus* trees in Florida. *Plants*. 12(1): 73.
- [7]. Li X., Ruan H., Zhou C., Meng X. & Chen W. (2021). Controlling citrus Huanglongbing: Green sustainable development route is the future. *Front Plant Sci*. 12: 760481.
- [8]. Deng Xiaoling, Zhu Zihao, Yang Jiacheng, Zheng Zheng, Huang Zixiao, Yin Xianbo, Wei Shujin & Lan Yubin (2020). Detection of citrus Huanglongbing based on multi-input neural network model of UAV hyperspectral remote sensing. *Remote Sensing*. 12(17): 2678.
- [9]. Sanchez L., Pant S., Xing Z., Mandadi K. & Kourouski D. (2019). Rapid and noninvasive diagnostics of Huanglongbing and nutrient deficits on citrus trees with a handheld Raman spectrometer. *Anal Bioanal Chem*. 411(14): 3125-3133.
- [10]. Arredondo Valdes R., Delgado Ortiz J. C., Beltran Beache M., Anguiano Cabello J., Cerna Chavez E., Rodriguez Pagaza Y. & Ochoa Fuentes Y. M. (2016). A review of techniques for detecting Huanglongbing (greening) in citrus. *Can J Microbiol*. 62(10): 803-811.
- [11]. Inoue H., Yamashita-Muraki S., Fujiwara K., Honda K., Ono H., Nonaka T., Kato Y., Matsuyama T., Sugano S., Suzuki M. & Masaoka Y. (2020). Fe<sup>(2+)</sup> Ions alleviate the symptom of citrus greening disease. *Int J Mol Sci*. 21(11): 4033.
- [12]. Ammar El-Desouky, Hall David G. & Shatters Robert G., Jr. (2013). Stylet morphometrics and citrus leaf vein structure in relation to feeding behavior of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, Vector of citrus Huanglongbing bacterium. *PLoS One*. 8(3): e59914.
- [13]. Thakuria Dwipendra, Chaliha Chayanika, Dutta Pranab, Sinha Sakshi, Uzir Panchali, Singh S. Basanta, Hazarika Samarendra, Sahoo Lingaraj, Kharbikar L. L. & Singh Dinesh (2023). Citrus Huanglongbing (HLB): Diagnostic and management options. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 125: 102016.
- [14]. Warghane Ashish, Kokane Amol, Kokane Sunil, Motghare Manali, Surwase Datta, Chodhury Supratik Pal, Biswas Kajal Kumar & Ghosh Dilip Kumar (2019). Molecular detection and coat protein gene based characterization of *Citrus tristeza* virus prevalent in Sikkim state of India. *Indian Phytopathology*. 73(1): 135-143.
- [15]. Agarwal A., Martoni F., Eow L., Rodoni B. C. & Blacket M. J. (2023). LAMP assay for the detection of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psylloidea: Psyllidae). *Sci Rep*. 13(1): 10895.
- [16]. Lillis L., Siverson J., Lee A., Cantera J., Parker M., Piepenburg O., Lehman D. A. & Boyle D. S. (2016). Factors influencing Recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care. *Mol Cell Probes*. 30(2): 74-8.
- [17]. Iftikhar Yasir, Rauf Saeed, Shahzad Umbreen & Zahid Muhammad Awais (2016). Huanglongbing: Pathogen detection system for integrated disease management – A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 15(1): 1-11.
- [18]. Bové Joseph M. (2014). Huanglongbing or yellow shoot, a disease of *Gondwanan* origin: Will it destroy citrus worldwide? *Phytoparasitica*. 42(5): 579-583.
- [19]. Dala-Paula B. M., Plotto A., Bai J., Manthey J. A., Baldwin E. A., Ferrarezi R. S. & Gloria M. B. A. (2018). Effect of Huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. *Front Plant Sci*. 9: 1976.
- [20]. Graham J. H., Johnson E. G., Gottwald T. R. & Irey M. S. (2013). Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by Huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. *Plant Dis*. 97(9): 1195-1199.
- [21]. Johnson E. G., Wu J., Bright D. B. & Graham J. H. (2014). Association of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathology*. 63(2): 290-298.
- [22]. Shahzad Faisal, Chun Changpin, Schumann Arnold & Vashisth Tripti (2020). Nutrient uptake in Huanglongbing-affected sweet orange: transcriptomic and physiological analysis. *J Amer Soc Hort Sci*. 145(6): 349-362.
- [23]. Zhang M. Q., Guo Y., Powell C. A., Doud M. S., Yang C. Y., Zhou H. & Duan Y. P. (2016). Zinc treatment increases the titre of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in huanglongbing-affected citrus plants while affecting the bacterial microbiomes. *J Appl Microbiol*. 120(4): 1067-1078.
- [24]. Srivastava A. K. & Singh Shyam (2005). Zinc nutrition, a global concern for sustainable citrus production. *Journal of Sustainable Agriculture*. 25(3): 5-42.
- [25]. Papadakis I. E., Giannakoula A., Therios I. N., Bosabalidis A. M., Moustakas M. & Nastou A. (2007). Mn-induced changes in leaf structure and chloroplast ultrastructure of *Citrus volkameriana* (L.) plants. *J Plant Physiol*. 164(1): 100-103.
- [26]. Tanoi K. & Kobayashi N. I. (2015). Leaf senescence by magnesium deficiency. *Plants*. 4(4): 756-772.
- [27]. Uthman Q. O., Kadyampakeni D. M. & Nkedi-Kizza P. (2020). Manganese adsorption, availability, and uptake in citrus under microsprinkler irrigation. *Agrosystems, Geosciences & Environment*. 3(1): e20061.
- [28]. Atta A. A., Morgan K. T., Kadyampakeni D. M. & Mahmoud K. A. (2021). The Effect of Foliar and Ground-Applied Essential Nutrients on Huanglongbing-Affected Mature Citrus Trees. *Plants*. 10(5): 925.
- [29]. Hamido S. A., Ebel R. C. & Morgan K. T. (2019). Interaction of Huanglongbing and foliar applications of copper on water relations of *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Plants*. 8(9): 298.

- [30]. Uthman Q. O., Kadyampakeni D. M., Nkedi-Kizza P., Kwakye S. & Barlas N. T. (2022). Boron, manganese, and zinc sorption and leaf uptake on citrus cultivated on a sandy soil. *Plants*. 11(5): 638.
- [31]. Subba P., Mukhopadhyay M., Mahato S. K., Bhutia K. D., Mondal T. K. & Ghosh S. K. (2014). Zinc stress induces physiological, ultra-structural and biochemical changes in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco) seedlings. *Physiol Mol Biol Plants*. 20(4): 461-473.
- [32]. Razi Muhammad F., Keremane Manjunath L., Ramadugu Chandrika, Roose Mikeal, Khan Iqar A. & Lee Richard F. (2013). Detection of citrus Huanglongbing-associated '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus and *Diaphorina citri* in Pakistan, seasonal variability, and implications for disease management. *Phytopathology*. 104(3): 257-268.
- [33]. Rigano L. A., Malamud F., Orce I. G., Filippone M. P., Marano M. R., do Amaral A. M., Castagnaro A. P. & Vojnov A. A. (2014). Rapid and sensitive detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by loop mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *BMC Microbiol*. 14: 86.
- [34]. Nageswara-Rao M., Miyata S., Ghosh D., Irej M., Garnsey S. M. & Gowda S. (2013). Development of rapid, sensitive and non-radioactive tissue-blot diagnostic method for the detection of citrus greening. *Mol Cell Probes*. 27(5-6): 176-183.
- [35]. 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.
- [36]. Tatineni S., Sagaram U. S., Gowda S., Robertson C. J., Dawson W. O., Iwanami T. & Wang N. (2008). In planta distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology*. 98(5): 592-999.
- [37]. Pandey S. S., Xu J., Achor D. S., Li J. & Wang N. (2023). Microscopic and transcriptomic analyses of early events triggered by '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in young Flushes of Huanglongbing-positive citrus trees. *Phytopathology*. 113(6): 985-997.
- [38]. Albrecht Ute, Hall David G. & Bowman Kim D. (2014). Transmission efficiency of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and progression of Huanglongbing disease in graft- and psyllid-inoculated citrus. *HortScience*. 49(3): 367-377.
- [39]. Li W., Hartung J. S. & Levy L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *J Microbiol Methods*. 66(1): 104-115.
- [40]. Teixeira D. C., Eveillard S., Sirand-Pugnet P., Wulff A., Saillard C., Ayres A. J. & Bove J. M. (2008). The *tufB-secE-nusG-rplKAL-rpoB* gene cluster of the liberibacters: sequence comparisons, phylogeny and speciation. *Int J Syst Evol Microbiol*. 58(6): 1414-1421.
- [41]. Choi C. W., Hyun J. W., Hwang R. Y. & Powell C. A. (2018). Loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, a causal agent of citrus Huanglongbing. *Plant Pathol J*. 34(6): 499-505.
- [42]. Duan Y., Zhou L., Hall D. G., Li W., Doddapaneni H., Lin H., Liu L., Vahling C. M., Gabriel D. W., Williams K. P., Dickerman A., Sun Y. & Gottwald T. (2009). Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics. *Mol Plant Microbe Interact*. 22(8): 1011-1020.
- [43]. Kalimuthu K., Arivalagan J., Mohan M., Samuel Selvan Christyraj J. R., Arockiaraj J., Muthusamy R. & Ju H. J. (2022). Point of care diagnosis of plant virus: Current trends and prospects. *Mol Cell Probes*. 61: 101779.
- [44]. Lau H. Y. & Botella J. R. (2017). Advanced DNA-based point-of-care diagnostic methods for plant diseases detection. *Front Plant Sci*. 8: 2016.
- [45]. Lau H. Y., Wang Y., Wee E. J., Botella J. R. & Trau M. (2016). Field demonstration of a multiplexed point-of-care diagnostic platform for plant pathogens. *Anal Chem*. 88(16): 8074-8081.
- [46]. Ghosh Dilip Kumar, Bhose Sumit, Warghane Ashish, Motghare Manali, Sharma Ashwani Kumar, Dhar Arun Kumar & Gowda Siddarama (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.
- [47]. Yang D., Wang F., Hu Y., Lan Y. & Deng X. (2021). Citrus Huanglongbing detection based on multi-modal feature fusion learning. *Front Plant Sci*. 12: 809506.
- [48]. LaBarre Paul, Hawkins Kenneth R., Gerlach Jay, Wilmoth Jared, Beddoe Andrew, Singleton Jered, Boyle David & Weigl Bernhard (2011). A simple, inexpensive device for nucleic acid amplification without electricity - Toward instrument-free molecular diagnostics in low-resource settings. *PLOS ONE*. 6(5): e19738.
- [49]. Ghosh D. K., Kokane S. B., Kokane A. D., Warghane A. J., Motghare M. R., Bhose S., Sharma A. K. & Reddy M. K. (2018). Development of a recombinase polymerase based isothermal amplification combined with lateral flow assay (HLB-RPA-LFA) for rapid detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *PLoS One*. 13(12): e0208530.
- [50]. Moran F., Herrero-Cervera M., Carvajal-Rojas S. & Marco-Noales E. (2023). Real-time on-site detection of the three '*Candidatus Liberibacter*' species associated with HLB disease: a rapid and validated method. *Front Plant Sci*. 14: 1176513.