

# Huanglongbing degli agrumi a Cuba

**Autore:** Maritza Luis Pantoja y Camilo Paredes Tomás  
Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), Ave 7ma, No. 3005, entre 30 y 32, Miramar, Playa, Cuba

## La citricoltura cubana prima del rilevamento di HLB

Il programma per l'agrumicoltura a Cuba è iniziato nel 1968 con lo scopo di fornire frutta fresca per la domanda nazionale ed il mercato dell'Europa orientale. Nel 1990, l'area di coltivazione degli agrumi era di circa 144.000 ha e la produzione ottenuta era di poco superiore a un milione di tonnellate. Le piantagioni commerciali di agrumi vennero stabilite in tutto il paese. La principale specie coltivata era l'arancio dolce; tuttavia venivano coltivati anche lima persiana, mandarino e lima messicana. L'arancio acida era principalmente usata come portainnesto. Tuttavia, dopo il rilevamento della presenza del *Citrus tristeza virus* (CTV) a Cuba (Batista *et al.*, 1995) è stata necessariamente effettuata una diversificazione dei portainnesti.

La scomparsa del mercato dei paesi dell'Est, ha prodotto una situazione economica nazionale critica, a ciò si aggiungono i ripetuti uragani e l'intensa siccità, il tutto ha causato perdite di 1.165.000 t di frutta e 131 milioni di dollari. Pertanto, alla fine del 2006 l'area si era ridotta a 42.000 ha e la produzione a 288.674 t (Cueto *et al.*, 2006).

## Rilevazione di HLB e principali risultati delle indagini

L'individuazione di "huanglongbing" (HLB) in Florida, USA nel 2005 e la presenza del suo insetto vettore *Diaphorina citri* a Cuba (González *et al.*, 2000) hanno motivato il rafforzamento delle azioni per una sorveglianza epidemiologica e un programma di ricerca su questa malattia

da quarantena. Nel 2006 i batteri associati a HLB sono stati rilevati in piante con sintomi tipici di maculature asimmetriche sulle foglie in aree residenziali della provincia di L'Avana. Test molecolari specifici eseguiti utilizzando due sistemi di amplificazione PCR specifici per il rilevamento '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Clas) hanno confermato la presenza di questi patogeni nei campioni sintomatici. L'analisi BLAST ha rivelato che le sequenze nucleotidiche ottenute per l'operone rplKAJL (codice GenBank FJ394022) condividevano il 100% ed il 98% di identità rispettivamente con sequenze di ceppi di Clas dal Brasile (codice GenBank DQ471904) e Giappone (codice GenBank AY342001) (Luis *et al.*, 2008, 2009).

Per determinare la distribuzione della malattia a Cuba, sono stati condotti sopralluoghi in 11 province e nella municipalità di Isla de la Juventud. In tutte le aree ispezionate è stata verificata mediante PCR la presenza di HLB. I sintomi più frequentemente osservati nelle piante infette erano maculature asimmetriche sulle foglie (figura 1A), ingiallimento dei germogli (figura 1B), le carenze nutrizionali (figura 1C) e frutti deformati con semi abortiti e rossastri, peduncolo infossato e fasci vascolari gialli intensi (figura 1D) con columella imbrunita (figura 1E). Altri sintomi erano foglie con nervature ispessite, necrotiche o dall'aspetto suberoso (figura 1F), gialle (figura 1G) e caduta prematura della frutta. I sintomi di HLB sono stati osservati in tutte le 20 cultivar di agrumi presenti nel paese ed è stata prodotta una guida illustrata per l'identificazione della malattia in campo (Paredes *et al.*, 2015).



Figura 1. Sintomi di HLB osservati negli agrumeti durante i sopralluoghi. A: maculatura asimmetrica a chiazze; B: ingiallimento dei germogli; C: carenze nutrizionali; D: frutti deformati con semi abortiti e rossastri, peduncolo infossato e fasci vascolari imbruniti; E: columella contorta; F: nervature suberose; G: ingiallimento delle nervature secondarie

La maculatura clorotica asimmetrica è risultato il sintomo fogliare tipico osservato in tutte le specie e le varietà analizzate. Questo sintomo è stato osservato nelle foglie mature in impianti vecchi o giovani e sono risultati più frequentemente visibili da ottobre a marzo, quando le temperature sono più basse. Tuttavia, la prima sintomatologia che si osserva sono le carenze nutrizionali e l'ingiallimento dei. Arancio, mandarino e pompelmo sono risultate le specie più suscettibile che presentano i sintomi più marcati. I limoni (*Citrus limon* Burn) e le lime acide (*C. aurantifolia* Swingle e *C. latifolia* Tanaka, *C. volkameriana* Tan. & Pasq., *C. macrophylla* e altre specie simili) mostrano una maculatura asimmetrica molto forte. In queste specie però non vengono frequentemente osservati i sintomi sulla frutta e la defogliazione, il disseccamento dei rami ed il deperimento degli alberi sono più lenti.

La rilevazione del patogeno è stata effettuata mediante microscopia ottica di sezioni sottili di foglie colorate con iodio o lugol. Questa tecnica ha permesso di visualizzare la presenza di eccessivi accumuli di amido nel floema che rappresentano una risposta della pianta alla presenza del patogeno. L'analisi ha mostrato un 97% di coincidenza dei risultati di questo test rispetto alla PCR convenzionale, confermandone l'utilità per il rilevamento di HLB in sondaggi massali (Luis, 2014). Una PCR duplex è stata inoltre validata per il rilevamento simultaneo delle tre specie di Clas, utilizzando la coppia di primer GB1 / GB3 e rplA2 / rplJ5. La valutazione di questa tecnica ha dimostrato una buona efficacia ( $\geq 96,9\%$ ) per l'identificazione di HLB da foglie con clorosi asimmetrica. Questo metodo ha inoltre permesso il rilevamento del batterio in campioni di foglie con sintomi di HLB meno specifici, come carenze nutrizionali ed ingiallimento dei germogli, con percentuali di coincidenza del 43,75% e del 68,42%, rispettivamente (Collazo *et al.*, 2010). È stata inoltre messa a punto una PCR "nested" con i primer: fD1 / rP1 seguiti da OI1 / OI2c, per aumentare la sensibilità diagnostica. Attualmente questa è la tecnica utilizzata per la certificazione del materiale di propagazione degli agrumi che ha anche permesso il rilevamento del patogeno nelle ninfe e negli adulti di *D. citri*, con il 95,5% di positività (Collazo *et al.*, 2011). La tecnica del microinnesto in vitro è stata utilizzata per l'eliminazione di Clas nelle piante infette (Zamora .2015).

Studi sulla dinamica delle popolazioni di *D. citri* in tre aree agrumicole hanno consentito di ottimizzare il monitoraggio ed il controllo del vettore. Sono stati identificati come nemici naturali sei insetti predatori, un parassitoide ed un fungo entomopatogeno che sono in grado di tenere sotto controllo il vettore in tutte le fasi di sviluppo (Gonzalez *et al.*, 2008, 2010). Sulla base dei nostri risultati e dell'esperienza internazionale è stata proposta una gestione di HLB che tiene in considerazione tre aspetti fondamentali: uso di materiale di propagazione certificato prodotto in serra priva di insetti, controllo preventivo di *D. citri* e riduzione della fonte di inoculo attraverso analisi molecolari ed eradicazione di piante sintomatiche (Llauger *et al.*, 2008).

A Cuba il materiale di propagazione degli agrumi viene prodotto in serra ed è garantito che il materiale utilizzato sia certificato e sano. Il controllo del vettore *D. citri* viene effettuato principalmente con insetticidi che hanno permesso di ridurre l'incidenza di questo insetto nei frutteti. Il problema principale nella gestione della malattia è stata l'eliminazione delle fonti di inoculo attraverso l'eradicazione delle piante sintomatiche. Questo perché influisce sugli interessi economici dei produttori e non vi sono provvedimenti legislativi a loro supporto. La gestione più efficiente è

quella impiegata dall'impresa Ceballos, nella provincia di Ciego de Ávila. In questa località, le fonti di inoculo sono state ridotte con l'eradicazione delle piante sintomatiche, raggiungendo la più bassa incidenza di HLB nel paese (4,2%) (López *et al.*, 2014, Batista *et al.*, 2017). Nel resto delle imprese agrumicole, la strategia di gestione è stata adattata alle condizioni economiche ed alla disponibilità di terreni per nuovi impianti.

Sono stati effettuati studi epidemiologici per determinare l'evoluzione temporale della malattia negli agrumeti di diverse aziende. Queste valutazioni sono state condotte in blocchi di 900 piante con frequenza bimestrale. I risultati hanno indicato che ci sono differenze nella diffusione di HLB che sono in rapporto alle diverse pratiche di gestione. È stato dimostrato che l'impianto di piante certificate lontano da agrumeti infetti e sintomatici, l'eliminazione delle fonti di inoculo ed il controllo preventivo del vettore sono aspetti fondamentali nella gestione della malattia (López *et al.*, 2014; Batista *et al.*, 2017).

### Impatto di HLB nell'agrumicoltura cubana

La presenza di HLB nell'industria degli agrumi cubana ha causato un forte impatto. Sono stati effettuati investimenti per la creazione di nuove posti di lavoro dedicati all'identificazione ed all'eliminazione delle piante sintomatiche. Le serre sono state costruite con reti anti-insetto per la produzione di materiale certificato. Risorse finanziarie sono state messe a disposizione per l'acquisto dei pesticidi utilizzati nel controllo del vettore, così come è stato necessario acquisire nuovi mezzi per la loro distribuzione. Di conseguenza, la tecnologia delle coltivazioni agrumicole è diventata più costosa dall'arrivo di HLB. Allo stesso tempo, le perdite sono aumentate a causa della diminuzione della produzione, del calibro commerciale e della caduta prematura dei frutti, della morte economica degli alberi, della riduzione delle aree destinate alla coltivazione, delle perdite causate dai cicloni, dalla siccità e della mancanza di stimoli per la produzione (Delgado, 2010; Luis *et al.*, 2013). Nel 2017 è stata ottenuta una produzione di 60.205,9 t su un'area totale di 14.000 ha di cui 6.000 in fase di sviluppo.

### BIBLIOGRAFIA

- Batista L, Porras D, Gutiérrez A, Peña I, Rodríguez J, Fernández del Amo O, Pérez R, Morera JL (1995) La Tristeza y el Toxoptera citricida en Cuba. Incidencia y estrategias de control. Proceedings of the III International Workshop Citrus Tristeza Virus and the Brown Citrus Aphid in the Caribbean Basin: Management Strategies, Lake Alfred, Florida, 197-199.
- Batista L, López D, Peña I, Luis M, Paredes C, Hernández L, Zamora V, González C, Hernández D, Rodríguez JL, Casin JC, Cueto JR (2017) Huanglongbing de los cítricos y su vector en Cuba: situación actual, manejo y principales investigaciones. IV SimpOSIO de Fruticultura Tropical y Subtropical. La Habana, Cuba.
- Collazo C, Luis M, Llauger R, López D, Peña I, Herrera N, Batista L (2010) Validación de la PCR dúplex para el diagnóstico de "huanglongbing" de los cítricos en Cuba. Resumen en Memorias del III Simposio Internacional de Fruticultura Tropical. La Habana, Cuba
- Collazo C, Núñez J, Luis M, Llauger R (2011) Optimización de una reacción en cadena de la polimerasa anidada para el diagnóstico de la enfermedad "huanglongbing" de los cítricos. Citrifrut 28(2):19-30.

- Cueto JR, Broche R, Martínez G, Correa A (2006) Los Cítricos en Cuba. Informe a la Reunión General de Coordinadores de la Red Interamericana de Cítricos (FAO). 6 pp.
- Delgado R (2010) Impactos del huanglongbing de los cítricos en el rendimiento y la calidad del fruto en los pomelos y naranjos de Jagüey Grande. Tesis Título de Master en Fruticultura Tropical. IIFT. 75 pp.
- González C, Hernández D, Rodríguez JL (2000) Primer informe de *Tamarixia radiata* Waterston como biorregulador de *Diaphorina citri* Kuw. en cítricos de Cuba. Citrifrut 18(1,2,3):38- 39.
- González C, Gómez M, Pérez L, Hernández D, Rodríguez JL, Fernández M, Vera A, Rodríguez O (2008) *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae), incidence and control in Cuban citriculture. Proc International Society of Citriculture. 11th International Citrus Congress. Wuhan, China. Volume II: 1236-1239.
- González C, Gómez M, Fernández M, Hernández D, Rodríguez JL, Batista L (2010) Behavior and natural enemies of *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae) in Cuban citriculture. Proc of 17th Conference International Organization Citrus Virologist:203- 205.
- Llauger R, Luís M, Collazo C, González C, Peña I, López D, Batista L, Cueto J (2008) Huanglongbing (ex greening) y su vector en la citricultura cubana. LARANJA (Citrus Research & Technology) 29(1-2): 17-22.
- López D, Batista L, Pérez D, Acosta I, Hernández L, Peña I (2014) Frecuencia de evaluación más adecuada para estudios epidemiológicos de la enfermedad HLB de los cítricos en dos áreas cítricas de Cuba. Citrifrut 31(2):20-25.
- Luis M, Collazo C, Llauger R, Peña I, López D, Blanco E, Casín JC, Batista L, Tanaka FAO, Salaroli RB, Martins EC, Teixeira DC, Kitajima E, Ayres J, Bové JM, Pérez JL, Cueto JR (2008) Huanglongbing in Cuban citriculture. Program and abstracts of the XIth International Citrus Congress. Wuhan, China: 50.
- Luis M, Collazo C, Llauger R, Blanco E, Peña I, López D, González C, Casín JC, Batista L, Kitajima E, Tanaka FAO, Salaroli RB, Teixeira DC, Martins EC, Bové JM (2009) Occurrence of citrus Huanglongbing in Cuba and association of the disease with 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. J Pl Pathol 91(3):709-712
- Luis M, Collazo C, Llauger R, Peña I, Batista L, Cueto JR, Casín. JC, Borroto. A, López D, Riaño R (2010) Situación actual del HLB en Cuba. IV Simposio Internacional Cítrícola, Colima, México.
- Luis M, Batista L, López D, Peña I, Hernández L, González C (2013) Experiencias con Huanglongbing de los cítricos en Cuba. Libro de resúmenes ampliados del Simposio Internacional sobre HLB en Cítricos Ácidos. México.
- Luis M (2014) Aplicación de la tinción con yodo para el diagnóstico indirecto de la enfermedad huanglongbing de los cítricos. Citrifrut 31(1):43-47.
- Paredes C, Luis M, Collazo C, Peña I, López D, Batista L, Hernandez L (2015) Diferentes manifestaciones de síntomas asociados a la enfermedad HLB en diferentes especies cítricas en Cuba. Citrifrut 32(2):36-41.