

Distribución de *Eutypa lata* y *Lasiodiplodia theobromae* en las zonas vitícolas de Venezuela¹

Distribution of *Eutypa lata* and *Lasiodiplodia theobromae* in vineyard zones in Venezuela

E. Ramirez² y J. Pineda³

Resumen

La muerte regresiva o brazo muerto en la vid (*Vitis vinifera* L.), causada por *Eutypa lata* y el cáncer causado a su vez por *Lasiodiplodia theobromae*, son enfermedades de gran importancia a nivel mundial. En Venezuela, en el año 1983, se asoció a *L. theobromae* la sintomatología de muerte regresiva presentada en viñedos de los estados Lara (El Tocuyo) y Zulia. Para el año 1999, en muestras de tejidos colectadas en las zonas vitícolas del municipio Mara (estado Zulia), Carora, El Tocuyo y Siquisique (estado Lara), se aisló a *Eutypa lata* y a su anamorfo *Libertella blepharis* en Carora y Mara, respectivamente; también se aisló a *L. theobromae* de las muestras procedentes de El Tocuyo, Carora y Siquisique. Los resultados muestran una marcada distribución de los patógenos según las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa que predominan en las zonas donde están ubicados los viñedos venezolanos.

Palabras clave: Vid, *Vitis vinifera*, *Libertella blepharis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Eutypa lata*

Abstract

Dieback of grapevine caused by *Eutypa lata* Pers, Fr. and bot cancer caused by *Lasiodiplodia theobromae*, are important diseases worldwide. In Venezuela, *L. theobromae* was associated with dieback symptomatology observed in the vineyards of Zulia and Lara (El Tocuyo) States in 1983. In 1999, during a survey in Mara county (Zulia state), Carora, El Tocuyo and Siquisique (Lara state), *E. lata* and its anamorph *Libertella blepharis* were isolated from Carora and Mara samples, respectively; while *L. theobromae* was isolated from

Recibido el 5-2-2002 ● Aceptado el 6-9-2002

1 Trabajo de Investigación co-financiada por el CDCHT- Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" Barquisimeto estado Lara.

2 Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA). Decanato de Agronomía. Posgrado de Fitopatología. Apartado 400. Barquisimeto, Lara. E-mail: em_rapo@yahoo.es

3 UCLA. Decanato de Agronomía. Posgrado de Fitopatología. E-mail: jpineda@email.ucla.edu.ve, jbpinedaperez@yahoo.es UCLA.

Carora, El Tocuyo and Siquisique samples. The results showed a noticeable pathogens distribution, which was associated with the temperature and relative humidity of these locations

Key words: Grapes, *Vitis vinifera*, *Libertella blepharis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Eutypa lata*

Introducción

El cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.), fue introducido en Venezuela, a finales del siglo XV y principios del XVI, manteniéndose como "cultivo de patio" para la obtención de uvas frescas y elaboración de vinos en cantidades modestas (2). A partir de 1970 se fundaron los primeros viñedos exitosos en los dos polos previamente definidos en los estados Zulia y Lara, con condiciones agroecológicas propicias como zonas áridas y semiáridas con presencia de agua, temperaturas medias entre 23 y 26°C, precipitaciones inferiores a los 650 mm, baja humedad relativa (HR) y alturas menores a los 700 m.s.n.m (7).

Como consecuencia del traslado de la vid de zonas templadas hacia zonas tropicales se trasladaron muchas de las enfermedades propias del cultivo hacia los viñedos cultivados en zonas tropicales. Entre las enfermedades fungosas más importantes y comunes están el mildiú polvoriento (*Oidium tuckeri* Berk) y el mildiú lanoso (*Plasmopara viticola* Berk & Tori), que causan daños considerables en los viñedos; la podredumbre gris causada por *Botrytis cinerea* Pers. afecta todos los órganos de la planta (1). Otras enfermedades importantes son la muerte regresiva o brazo muerto causada por *Eutypa lata* Pers., Fr, conocida también como eutipiosis y el cáncer causado a su vez por

Botryodiplodia theobromae (6,10); en el caso de *Eutypa lata* puede ser observado un necrosamiento en forma de cuña en la madera del tallo, extendiéndose desde el punto de origen del cáncer (4), pero este necrosamiento se evidencia también cuando las plantas de vid son afectadas por *Lasiodiplodia theobromae* (sin. *Botryodiplodia theobromae*) (10)

Entre las características de *Eutypa lata* se destaca las condiciones para el desarrollo del estroma peritecial el cual está restringido a zonas que presentan una precipitación media anual de 350 mm (5). La liberación de las ascosporas puede ser favorecida por baja precipitación, temperatura mayor de 0°C y humedad relativa entre 90 y 96 % (5,12,13,17); igualmente se ha reportado que se requiere de 1,3 a 2,0 mm de precipitación para iniciar la descarga de las ascosporas (10,11, 14). las cuales germinan en 11-12 horas cuando la temperatura es óptima (20-25°C). La germinación de las ascosporas ocurre dentro de las vesículas, usualmente 1 a 2 mm de la superficie de la herida (4).

En viñedos de los estados Lara y Zulia se han observado síntomas de muerte regresiva en algunas plantas (16), pero hasta ahora solo se han asociado con el género *Botryodiplodia*. Leavitt (10) indica que la enfermedad producida por *Botryodiplodia*

theobromae es conocida como cáncer por *Botryodiplodia* cuyo síntoma característico es la necrosis interna en forma de cuña que se evidencia al realizar un corte transversal del tallo, el cual en campo no puede diferenciarse del causado por *E. lata*, como fue mencionado anteriormente; solo los aislamientos y observaciones a nivel de laboratorio permiten

determinar cuál es el patógeno que está presente.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la distribución geográfica de *Eutypa lata* y *Lasiodiplodia theobromae*, y su relación con las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa que prevalecen en los viñedos de los estados Lara y Zulia.

Materiales y métodos

Recolección de muestras

La recolección de muestras se realizó durante todo el año 1998, en los estados Lara y Zulia donde están ubicados los principales viñedos del país. En el estado Lara se muestrearon las localidades de El Tocuyo, Siquisique y Carora, y en el estado Zulia el municipio Mara. En cada una de las zonas se observó material de diversos cultivares de vid que presentaban los síntomas de muerte regresiva y se procedió a tomar ramas infectadas de forma aleatoria en las parcelas respectivas. Las plantas que presentaban la sintomatología se cortaron a nivel del tallo a diferentes distancias para evidenciar el síntoma en forma de cuña, característico de la enfermedad conocida como muerte regresiva o eutipiosis y el llamado cáncer por *Botryodiplodia* (figura 1). Las muestras se colocaron en bolsas plásticas y fueron enumeradas de acuerdo al orden de visita de la siguiente manera: El Tocuyo (01), Siquisique (02), Zulia (03) y Carora (04).

Aislamiento de patógenos

Las muestras de tallos colectadas se procesaron en el Laboratorio de Micología del Postgrado de

Fitopatología del Decanato de Agronomía de la Universidad Centro Occidental "Lisandro Alvarado" ubicado en Tarabana-Cabudare, estado Lara.

El tejido con la sintomatología característica de cuña se cortó y desinfectó con solución de cloro en su concentración comercial (5,25%) en cámara de flujo laminar, por 15 minutos, luego los trozos se lavaron en agua destilada estéril y se secaron en toallas de papel previamente esterilizado. Posteriormente se colocaron en cámara húmeda por un lapso de 48 horas y se procedió a sembrar en cajas de Petri contentivas de agar agua (AA) porciones de los trozos que presentaban la cuña característica. Una vez obtenido el crecimiento en las cajas de Petri, se cortaron discos de aproximadamente 5 mm de diámetro y se colocaron en cajas de Petri contentivas de Agar papa dextrosa (PDA), para observar el crecimiento. Parte del material colocado en cámara húmeda fue tomado para realizar secciones de tejido a mano alzada y estudiar el tipo de estructura presente, tamaño de la misma y de los conidios y/o esporas presentes; las

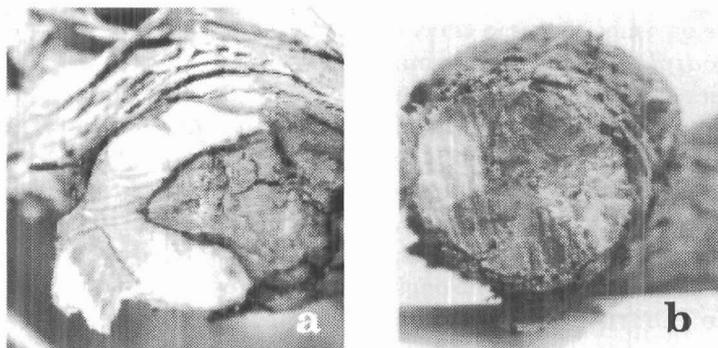


Figura 1. Necrosamiento en forma de cuña presentado en algunos cultivares vid. a. Cultivar Chenin blanc (Carora, estado Lara), donde se aisló *Eutypa lata* b. Cultivar Queen (El Tocuyo, estado Lara), donde se aisló *Lasiodiplodia theobromae*

secciones se montaron en portaobjeto y colorearon con azul de algodón en proporción 1:1 (lactofenol : azul de metileno) y fucsina ácida al 1%, se realizaron observaciones morfométricas tanto para las esporas como para las estructuras donde se encontraron.

Una vez obtenido el crecimiento en PDA se procedió a realizar montajes en láminas portaobjeto para observar el tipo de micelio y la ontogenia del conidio y así lograr la identificación de los hongos presentes.

Se realizó un cultivo monospórico de los hongos encontrados para lo cual se aislaron y desinfectaron peritecios y picnidios de los tallos afectados en solución de cloro comercial al 5,25% por un tiempo de 30 segundos, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril, todo esto previa observación en lupa estereoscópica, luego las estructuras periteciales y picnidiales se colocaron sobre portaobjeto para seccionar y aislar masas de esporas las cuales se

esparcieron en caja de Petri de 90 mm de diámetro contentivas de PDA ; se incubaron por 24 horas, al cabo de las cuales se procedió a observar la germinación de los conidios y esporas. Posteriormente se ubicaron las esporas que estuvieran aisladas o solas y se extrajeron con una aguja hipodérmica esterilizada para así evitar cualquier tipo de contaminación; ésto se realizó para corroborar si los hongos encontrados al realizar cortes al tejido eran los mismos aislados del tejido con la sintomatología de necrosamiento en forma de cuña .

El material aislado se transfirió a tubos de ensayo contentivos de PDA, para preservarlo puro.

Condiciones ambientales en las zonas muestreadas

Se recopilaron datos de temperatura y humedad relativa de los últimos 10 años (1991-2000) para las diferentes localidades muestreadas, Bodegas Pomar (Carora), Instituto de la Uva (El Tocuyo) y en el Ministerio

del Ambiente (M.A.R.N.R) para el municipio Mara y Siquisique; luego se procedió a realizar una comparación de estos datos relacionándolos con la presencia o ausencia de los patógenos

Eutypa lata y *Lasiodiplodia theobromae*, según las condiciones de temperatura y humedad relativa imperantes en las zonas muestreadas.

Resultados y discusión

Aislamiento de patógenos

En los aislamientos y el seccionamiento de tejidos realizados, se encontraron tres hongos diferenciados por sus características, las cuales se describen:

1. Micelio aéreo desarrollado en PDA, esponjoso, abundante, de coloración blanquecina al inicio del desarrollo y tornándose gris-verdoso a negro al transcurrir el tiempo, ramificado, septado, hialino en los primeros estadios de desarrollo, tornándose de coloración marrón al madurar. Al realizar secciones al tejido se observaron picnidios simples, o agrupados, estromáticos, ostiolados, frecuentemente setosos, inmersos y errumpentes al madurar, correspondientes a *Lasiodiplodia theobromae* Griff & Maubl., 1909 (sin. *Botryodiplodia theobromae* Pat. 1892) (15) (figura 2).

2. Micelio blanco, algodonoso, ramificado, septado, hialino, tornándose de coloración marrón al madurar. Peritecios en estroma de color negro (figura 2). Ascas cilíndricas, clavadas, bitunicadas, con invaginación y poro apica, basadas en pedicelo, contentivas de 8 esporas. Ascosporas solapadas, comenzando con coloración amarilla a marrón pálido, ameroide, alantoide, ligeramente curvas, de apariencia lisa y pared

delgada, descargadas del asca en octadas, correspondiendo a *Eutypa lata* Tul & C. Tul (sin. *Eutypa armeniaca*, Hansf & Carter) (anamorfo: *Libertella blepharis* A.L. Smith) (3, 8).

3. Cavidades picnidiales irregularmente convolucionadas, dehiscentes, estromáticas, conidióforo hialino, ramificado, cilíndrico. Conidios unicelulares, hialinos, filiformes a curvados, células conidiógenas simpodiales, correspondientes a *Libertella blepharis* Smith (sin. *Cytosporina* sp.) (9,11).

Condiciones ambientales en campo e incidencia de patógenos

Al realizar el análisis de los resultados obtenidos en las muestras de tallo colectadas en las diferentes localidades se encontró que *Lasiodiplodia theobromae* estaba presente en las localidades de El Tocuyo, Siquisique y Carora, mientras que *Eutypa lata* y su anamorfo *Libertella blepharis* estuvieron presentes en las localidades de Carora y municipio Mara respectivamente (cuadro 1).

Al observar los datos recolectados para temperatura y humedad relativa en las diferentes localidades estudiadas (cuadro 2), pudo evidenciarse que en la localidad de El Tocuyo (Instituto de la Uva) la temperatura promedio anual fue de 25°C y la humedad

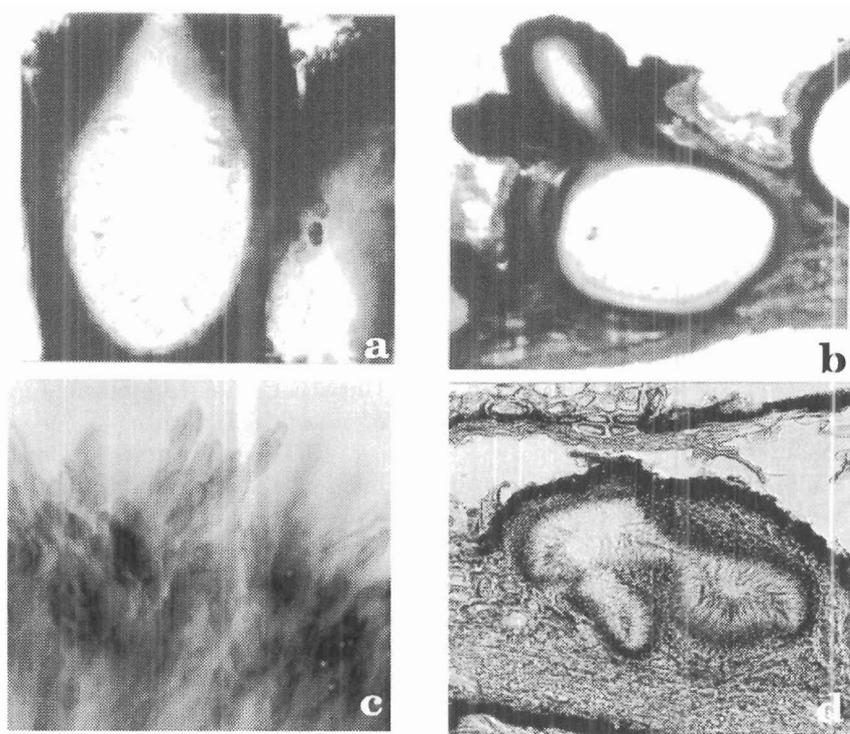


Figura 2. Seccionamiento de fructificaciones mostrando: a. Picnidio en estroma de *Lasiodiplodia theobromae* (100X), b. Peritecio en estroma de *Eutypa lata* (100x), c. Grupo de ascas de *E. lata* (1000X), d. Estructura del tipo picinidial de *Libertella blepharis* (anamorfo de *E.lata*) (100X)

relativa promedio anual fue de 59%. En Carora, (datos propios del viñedo Bodegas Pomar) se presentó una temperatura promedio de 27°C y una humedad relativa promedio de 72%; así mismo en la localidad del municipio Mara, estado Zulia, la temperatura promedio fue de 28°C y la humedad relativa fue de 75%, y para la localidad de Siquisique la temperatura promedio fue de 29°C y la humedad relativa, según datos de la zona, oscila entre 48 y 50%. De todos estos datos podemos decir que existen marcadas diferencias entre los diferentes % de humedad

relativa para cada una de las localidades estudiadas, siendo los promedios más altos en las zonas de Carora y Mara, con diferencias entre las zonas de hasta un 26% de humedad y en cuanto a los promedios anuales de temperatura la diferencia es muy pequeña entre localidades (4°C) lo cual pudiera afectar el desarrollo e incidencia de los patógenos estudiados en las diferentes localidades.

En Carora, estado Lara y municipio Mara, estado Zulia, se presentan condiciones de humedad relativa máxima entre 86 y 90% y

Cuadro 1. Presencia de los patógenos estudiados en las diferentes localidades muestreadas.

Patógeno	El Tocuyo			Carora			Siquisique			Mara
	Cv1	Cv2	Cv3	Cv1	Cv5	Cv6	Cv2	Cv3	Cv4	Cv7
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	x	x	x	—	x	—	x	x	x	—
<i>Eutypa lata</i>	—	—	—	x	—	—	—	—	—	—
<i>Libertella blepharis</i>	—	—	—	x	—	—	—	—	—	x

x = presencia del patógeno

— = ausencia del patógeno

Cv 1 = Chenin blanc Cv 2 = Queen Cv 3 = Tucupita Cv 4 = Criolla negra Cv 5 = Sauvignon Cv 6 = Tempranillo Cv 7 = Micheli palieri

mínima entre 53 y 63%, con rangos de temperatura máxima entre 31 y 34 °C y mínima entre los 20 y 26 °C, que según lo descrito por Munkvold y Marois (12) y Chapuis *et al.* (5) son las condiciones necesarias para la germinación de ascosporas y desarrollo de *Eutypa lata*.

En ambas localidades se dan condiciones de humedad relativa

propicias para el desarrollo del hongo, y aunque los rangos de temperatura diurna son elevados, en comparación con los requeridos por el hongo para su desarrollo (4), quizás éstas se compensan con la baja temperatura que se presenta en la noche, y alcanza rangos en el transcurso del día que oscilan entre los apropiados para el desarrollo del mismo.

Cuadro 2. Datos de temperatura (°C) y humedad relativa (%) en las diferentes localidades muestreadas.

Localidades estudiadas	Temperatura °C		% Humedad Relativa	
	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima
El Tocuyo	31	20	76	42
Carora	34	20	90	53
Siquisique	35	23	—	48-50*
Mcipio. Mara	31	26	86	63

Fuente: Siquisique: M.A.R.N.R (estación Siquisique), *Datos suministrados por Finca Bariquía municipio Mara : M.A.R.N.R (estación Santa Cruz- Lago Maracaibo) El Tocuyo: Inst. de la Uva (U.C.L.A) Carora:Viñedo Bodegas Pomar. Los datos son promedios para 10 años

En localidades donde los porcentajes de humedad relativa son muy bajos el patógeno no desarrolla, y según lo obtenido por Munkvold y Marois (12), tales condiciones reducen la infección, lo que indica que una alta humedad relativa es importante para el desarrollo y mantenimiento de *E. lata*, por lo que podría estimarse que este factor es indispensable y condicionante para su establecimiento. Esto explicaría en parte la ausencia de *E. lata* en El Tocuyo y Siquisique.

En cuanto a *Lasiodiplodia theobromae*, éste se aisló en las muestras

colectadas en las localidades de El Tocuyo, Siquisique y Carora, en las cuales los rangos de temperatura oscilan entre 20 y 35 °C, y la humedad relativa entre 42% y 90 %, lo que indica que este hongo puede sobrevivir y causar epidemias en tales condiciones; mientras que *E. lata* y su anamorfo *L. blepharis* se aislaron del material colectado en Carora y municipio Mara donde las temperaturas oscilan entre 20 y 34 °C y la humedad relativa entre 53 y 90%, existiendo diferencias con respecto a la mínima HR en comparación con la HR registrada en las localidades donde se identificó a *L. theobromae*

Conclusión

Eutypa lata (anamorfo *Libertella blepharis*), se encontró en los viñedos de Altagracia (Carora, estado Lara) y el municipio Mara (estado Zulia), donde se presentan condiciones de temperatura y humedad relativa requeridas para su desarrollo (20-34°C y 53-90% HR). *Lasiodiplodia theobromae* se ubicó en casi todas las

zonas muestreadas, lo que indica que este patógeno se adapta a un mayor rango de condiciones ambientales imperantes en las localidades donde se encuentran establecidos los viñedos del país. Ambos patógenos pueden ser causantes de la muerte regresiva en la vid (*Vitis vinifera* L) en Venezuela.

Agradecimiento

Al consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad Centroccidental

"Lisandro Alverado" (CDCHT-UCLA) por el confinanciamiento atorgado para la realización de esta investigación

Literatura citada

1. Avilan L, F. Leal, y D. Bautista. 1989. Manual de Fruticultura. Cultivo y Producción. Edit. América C.A. p. 1405-1475.
2. Bracho E. y F. Araujo. 1997. Reseña histórica de la Vitivinicultura en Venezuela. IV Seminario Internacional De Viticultura y Enología Tropical. Maracaibo, Venezuela.
3. Carter, M. V y P.H.B. Talbot. 1974. *Eutypa armeniaceae*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute (CMI). No. 436. Kew. England.
4. Carter, M. V. 1988. *Eutypa dieback*. En: p. 32-34 Compendium of Grape Disease. Perarns RC and A.C. Coheen (Eds) . APS. St. Paul, Minesota.

5. Chapuis L., L. Richard y B. Dubos . 1998. Variation in susceptibility of grapevine pruning wound to infection by *Eutypa lata* in south-western France. *Plant Pathology* 47: 463-472
6. Fisher D. 1998. Pathology seminars a success. *Wine Industry Newsletter*. <http://www.agric.wa.gov.au/programs/hort/viticulture/newsletter/Pathology.html>. 15-07-1999. http://www.ag.ohio-state.edu/~ohioline/b861/b861_58.html. 25-04-2000. 15-06-1999.
7. Gallet, P. 1982. *Maladies et les parasites de la vigne* . Tomo 1. Montpellier. France.
8. Glawe, D., M. Dilley. y W. Moller. 1983. Isolation and Identification of *Eutypa armeniaca* from *Malus domestica* in Washington state. *Mycotaxon* 18(2):315-318.
9. Glawe, D., M. Dilley. y J. Rogers. 1984. *Dyatripaceae* in the pacific North-west. *Mycotaxon* 20(2):401-460.
10. Leavitt, G. 1992. Canker disease of the grapevine in the Americas: is it *Eutypa lata* or *Botryodiplodia theobromae*. I Taller y III Seminario Internacional de Viticultura y Enología Tropical. Maracaibo, Venezuela.
11. Messner, K. y B.C. Sutton. 1982. *Libertella blepharis*, pathogenic on apple trees of the variety Mc.Intosh. *Mycotaxon* 14(1): 325-333.
12. Munvolkd, G.P. y J.J. Marois. 1995. Factors associated with variation in susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Eutypa lata*. *Phytopathology* 85(2):249-257.
13. Petzoldt, C. H., M. A. Sall y W. J. Moller. 1983. *Eutypa* dieback of grapevines: Ascospore dispersal in California. *Am. J. Enol. Vitic.* 34(4):265-270.
14. Petzoldt, C. H., M. A. Sall y W.J. Moller. 1983. Factors determining the relative number of ascospores released by *Eutypa armeniaca* in California. *Plant Disease* 67(8): 857-860.
15. Punithalingan, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae* .Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 519. Commonw.Mycol.Inst. Kew. England.
16. Renaud, J., M. Sierra de Pire., A. Carrasco, y H. Freitez, . de. 1933. Consideraciones sobre una muerte regresiva de la *Vitis vinifera* er. el estado Lara. VIII Seminario Nacional de Fitopatología.
17. Trese, A. T., D.C. Ramsdell, y C. L. Burton. 1982. Effects of winter and Spring and postinoculation cold weather on infection of grapevine by *Eutypa armeniaca*. *Phytopathology* 72(4):438-440.