

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA



**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOLÓGICA Y
MOLECULAR DE *Pyricularia* sp. CAUSANTE DE MANCHAS
FOLIARES EN *Calathea* sp. EN HUÁNUCO”**

Presentada por:

OSCAR ESMAEL CABEZAS HUAYLLAS

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN FITOPATOLOGÍA**

Lima - Perú

2023

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Pyricularia* sp. CAUSANTE DE MANCHAS FOLIARES EN *Calathea* sp. EN HUÁNUCO

INFORME DE ORIGINALIDAD

12%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	1%
2	repositorio.unas.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
5	www.smf.org.mx Fuente de Internet	<1%
6	kupdf.net Fuente de Internet	<1%
7	www1.inecol.edu.mx Fuente de Internet	<1%
8	repositorio.udea.edu.co Fuente de Internet	<1%

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA**

**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA PATOLÓGICA Y
MOLECULAR DE *Pyricularia* sp. CAUSANTE DE MANCHAS
FOLIARES EN *Calathea* sp. EN HUÁNUCO”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

OSCAR ESMAEL CABEZAS HUAYLLAS

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Jorge Escobedo Álvarez
PRESIDENTE

Dra. Leonor Mattos Calderón
ASESOR

Ph.D. Walter Apaza Tapia
MIEMBRO

Mg.Sc. Carlos Cadenas Giraldo
MIEMBRO

DEDICATORIA

A mis padres, Cirila y Teodosio quienes en vida me profesaron su gran amor y ejemplo de superación.

A mis hijos Oscar Mateus y Rosario del Pilar, quienes desde sus miradas motivaron la culminación de este trabajo.

A mi esposa Victoria Esperanza, por su apoyo en la culminación de esta etapa académica.

A mis hermanos, por su apoyo moral y espiritual.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores: Enrique Fernández-Northcote, César Fribourg, Jaime Castillo, Manuel Canto, Leonor Mattos, Elsa Carbonel, Liliana Aragón, Walter Apaza, Carlos Cadenas y Tomas Melgarejo; de la Especialidad de Fitopatología de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Agraria La Molina por complementar de manera significativa mi formación como fitopatólogo. Al Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) por el incentivo económico, técnico y aprendizaje de la realidad de la selva peruana.

Al Ing. Enrique Arévalo Gardini, por haberme encaminado y formado en este fascinante mundo de la Fitopatología.

A la Dra. Leonor Mattos Calderón, en su calidad de profesora consejera y asesora, por su aliento académico y estímulo permanente para la culminación de este trabajo de investigación.

A los miembros del comité consejero y jurado de tesis: Dr. Jorge Escobedo Álvarez, Walter Apaza Tapia y Carlos Cadenas Giraldo por sus valiosos aportes en la mejora de este trabajo.

Al Sr. Michell Avendaño Rubio, técnico del Laboratorio de Fitopatología de la UNAS, por el apoyo y todas las facilidades prestadas antes y durante el desarrollo del trabajo; al Bach. Henry Panduro tesista en el laboratorio por su ayuda prestada.

A la Dra. Derlene Attili de Angelis, Dr. Oniel Aguirre Gil, Dr. Julio A. Chia Wong, por la orientación en la conclusión del trabajo

Al Sr. Ángel Ortega, propietario de la parcela de *Calathea* sp. “wira bijao”; por todas las facilidades prestadas para realizar el presente trabajo.

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por las facilidades prestadas en el logro de la especialización.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. EL GÉNERO <i>Pyricularia</i>	3
2.1.1. Taxonomía	6
2.1.2. Características morfológicas	6
2.1.3. Características culturales	8
2.1.4. Rango de hospedantes	9
2.1.5. Ciclo patogénico	10
2.1.6. Epidemiología	10
2.1.7. Ensayos de Patogenicidad	11
2.1.8. Caracterización molecular	11
2.2. EL GÉNERO <i>Calathea</i>	14
2.2.1. Taxonomía	14
2.2.2. Características de la planta	16
2.2.3. Distribución	16
2.2.4. Usos del género <i>Calathea</i>	17
2.2.5. Enfermedades en <i>Calathea</i>	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. UBICACIÓN	21

3.2. COLECCIÓN DE HOJAS DE BIJAO	21
3.3. COLECCIÓN DE HOJAS DE ARROZ.....	21
3.4. AISLAMIENTO DE <i>Pyricularia</i> sp. DE HOJAS DE BIJAO Y ARROZ.....	21
3.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS	23
3.6. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y CULTURAL DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Pyricularia</i> sp.....	23
3.6.1. Características morfológicas	23
3.6.2. Características culturales	24
3.7. PRUEBA DE PATOGENICIDAD.....	26
3.7.1. Producción de plántulas de arroz y bijao.....	26
3.7.2. Inoculación	27
3.7.3. Estandarización del método de inoculación	27
3.7.4. Inoculación cruzada de <i>Pyricularia</i> en plantas de bijao y arroz.....	28
3.8. CUANTIFICACIÓN DE ÁREA FOLIAR AFECTADA EN HOJAS COMERCIALES DE “WIRA BIJAO”	30
3.9. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	30
3.9.1. Muestras enviadas	31
3.9.2. Extracción de ADN	31
3.9.3. Amplificación del gen 28S y la región ITS:	31
3.9.4. Secuenciación	32
3.9.5. Análisis de distancia genética.....	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y CULTURAL DE <i>Pyricularia</i> sp.....	33
4.1.1. Morfología.....	33
4.1.2. Características culturales	35
4.2. ENSAYOS DE PATOGENICIDAD	44

4.2.1. Estandarización de un método de inoculación	44
4.2.2. Inoculación cruzada del aislamiento <i>Pyricularia</i> -bijao en plantas de “wira bijao” y arroz	44
4.2.3. Inoculación cruzada del aislamiento <i>Pyricularia</i> -arroz en plantas de “wira bijao” y arroz	48
4.2.4. Rango de hospedantes del aislamiento <i>Pyricularia</i> -bijao	48
4.2.5. Porcentaje de área foliar dañada en hojas al estado cosecha	50
4.3. Análisis molecular	52
V. CONCLUSIONES	56
VI. RECOMENDACIONES	57
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
VIII. ANEXOS	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Géneros, número de especies y rango de hospedantes de la Familia Pyriculariaceae.....	3
Cuadro 2: Especies de <i>Pyricularia</i> , hospedantes y países donde se ha reportado su presencia.	4
Cuadro 3: Dimensiones de conídias y conidióforos de <i>P. grisea</i> y <i>P. oryzae</i> descritos por Ellis (1971).	7
Cuadro 4: Plantas relacionadas a <i>Calathea</i> sp. wira bijao producidas en vivero.....	26
Cuadro 5: Tratamientos realizados en la inoculación cruzada de los aislamientos de <i>Pyricularia</i> en plantas de “wira bijao” en vivero.	29
Cuadro 6: Tratamientos realizados en la inoculación cruzada de los aislamientos de <i>Pyricularia</i> en plantas de arroz en vivero.....	29
Cuadro 7: Dimensiones de las conídias y conidióforos de <i>Pyricularia</i> sp. obtenidas de tejido infectado de bijao y arroz y dos medios de cultivo (PDA y SNA).....	34
Cuadro 8: Comparativo de las dimensiones de las conídias y conidióforos de los aislamientos de <i>Pyricularia</i> sp. evaluados con otros reportes de investigación.....	34
Cuadro 9: Efecto de medios de cultivo sobre el ritmo de crecimiento micelial (RCM) y Tasa de incremento micelial por día en el aislamiento de <i>Pyricularia</i> de arroz.....	36
Cuadro 10: Efecto de medios de cultivo sobre el ritmo de crecimiento micelial (RCM) y Tasa de incremento micelial por día en el aislamiento de <i>Pyricularia</i> de bijao.....	36
Cuadro 11: Características del micelio, producción de melanina y forma de las conídias de <i>Pyricularia</i> sp. aislados de hojas de bijao y arroz.	40
Cuadro 12: Efecto de la condición de luz sobre el ritmo de crecimiento micelial (RCM) y Tasa de incremento micelial (cm/día) de los aislamientos de <i>Pyricularia</i> de bijao y arroz.....	41
Cuadro 13: Efecto del pH sobre el ritmo de crecimiento micelial (RCM) y Tasa de incremento micelial (cm/día) en los aislamientos de <i>Pyricularia</i> de bijao y arroz.	42
Cuadro 14: Métodos de inoculación de estructuras infectivas de <i>Pyricularia</i> -bijao y <i>Pyricularia</i> -arroz sobre hojas y plantas de “wira bijao” y arroz.	45

Cuadro 15: Hospedantes sobre los que se ha observado expresión de síntomas por la inoculación de suspensión de conídias de *Pyricularia-bijao*..... 49

Cuadro 16: Resultados de la identificación molecular del agente causal del quemado de hojas en *Calathea* sp. “wira bijao” y “bijao blanco”..... 53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morfología de <i>Pyricularia grisea</i> (A) y <i>Pyricularia oryzae</i> (B).....	7
Figura 2: Variaciones morfológicas de las conídias de <i>P. oryzae</i>	8
Figura 3: Características de desarrollo de colonias de <i>Pyricularia oryzae</i> . A. Naturaleza del crecimiento, B. Estructura, C. Relieve de la superficie.	8
Figura 4: Variación en la forma de crecimiento micelial y producción de melanina de <i>pyricularia oryzae</i>	9
Figura 5: Ciclo patogénico de <i>Pyricularia oryzae</i>	11
Figura 6: Filogenia de la familia Pyriculariaceae.....	13
Figura 7: Rizograma del Orden de los Zingiberales.	14
Figura 8: Tipos de bijao comercializados para la preparación de platos típicos de la selva peruana.....	16
Figura 9: <i>Barretomyces calathea</i> (CBS 129274). A. Mancha foliar sobre <i>Calathea longifolia</i> en Brazil. B–G. Conidióforos sosteniendo conídias. H. Conidia.....	19
Figura 10: Síntomas causados sobre <i>Calathea</i> spp. por <i>Pyricularia</i> sp.	20
Figura 11: Protocolo seguido para obtener aislamientos monospóricos de <i>Pyricularia</i> a partir de hojas enfermas de bijao y arroz.....	23
Figura 12: Intensidad de daño de <i>Pyricularia</i> en hojas maduras de <i>Calathea</i> sp. “wira bijao” vistos del envés y haz. Existe una mayor intensidad de daño en el lado derecho del foliolo visto por el haz.....	30
Figura 13: Crecimiento micelial de <i>Pyricularia</i> -bijao y <i>Pyricularia</i> -arroz sobre diferentes medios de cultivo.....	37
Figura 14: Tasa incremento micelial de los aislamientos <i>Pyricularia</i> -bijao y <i>Pyricularia</i> -Arroz (A) y número de veces más de la tasa de incremento micelial de <i>Pyricularia</i> -arroz respecto a <i>Pyricularia</i> -bijao (B).....	38
Figura 15: Forma de las conídias de <i>Pyricularia</i> -bijao (a, b y c) y <i>Pyricularia</i> -arroz (d) en medio de cultivo PDA + 50 g de harina de arroz.	39

Figura 16: Forma y color del crecimiento micelial de <i>Pyricularia</i> -Bijao (a) y <i>Pyricularia</i> -Arroz (b) en medio PDA+50g de harina de arroz.	40
Figura 17: Efecto de las condiciones oscuridad, luz continua y luz alterna en el crecimiento micelial de <i>Pyricularia</i> -bijao y <i>Pyricularia</i> -arroz en medio PDA. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 18: Efecto del pH en la tasa de crecimiento micelial de los aislamientos de <i>Pyricularia</i> -bijao (a) y <i>Pyricularia</i> -arroz (b) en medio PDA.	43
Figura 19: Efecto del pH en crecimiento micelial de los aislamientos de <i>Pyricularia</i> -bijao (a) y <i>Pyricularia</i> -arroz (b) a los 19 días después de incubación en medio PDA.	43
Figura 20: Síntomas desarrollados por <i>Pyricularia</i> -bijao en el envés (a, b y c) y el haz (d, e, f y g) de las hojas inoculadas al estado cartucho en plantas de “wira bijao”.	46
Figura 21: Síntomas desarrollados por infección natural en campo en hojas de “wira bijao”.	47
Figura 22: Síntomas desarrollados por el aislamiento <i>Pyricularia</i> -arroz en hojas de “wira bijao” por el depósito de 2 ml de inóculo (1×10^4 conídias/ml) en estado de hoja cartucho (a y b). Aislamiento de <i>Pyricularia</i> -bijao con mayor severidad en la expresión de síntomas (c).	48
Figura 23: Síntomas desarrollados por <i>Pyricularia</i> -bijao en tres especies diferentes de <i>Calathea</i> por inoculación en el estado de hoja cartucho.	50
Figura 24: Porcentaje de área foliar afectada según el lado derecho o izquierdo de hoja al estado de cosecha, visto desde el haz.	51
Figura 25: Presencia de fenoles en las hojas cartucho de “wira bijao” y cantidad de Fenoles totales en cada lado correlacionados con la intensidad de daño por <i>Pyricularia oryzae</i>	52
Figura 26: Dendrograma basado en distancias genéticas con el método Neighbor-joining usando las secuencias D1/D2 del gen 28S, mostrando el agrupamiento de <i>Pyricularia oryzae</i> con las muestras CPQBA 2629-22 DRM 01 y DRM 02, aislados de “wira bijao” y “bijao blanco”, respectivamente.	55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Mediciones de conidia y conidióforo en micras de Pyricularia-bijao directamente de hoja infectada.	66
Anexo 2: Mediciones de conidia y conidióforo en micras (μm) de Pyricularia-arroz directamente de hoja infectada.	68
Anexo 3: Mediciones de conidia y conidióforo en micras (μm) de Pyricularia-bijao y Pyricularia-arroz en medio PDA.	70
Anexo 4: Análisis de variancia para el efecto del pH en el ritmo de crecimiento micelial del aislamiento de Pyricularia-arroz. Tukey 5%.	72
Anexo 5: Análisis de variancia para el efecto de la luz continua, luz alterna y oscuridad en el ritmo de crecimiento micelial del aislamiento de Pyricularia-arroz. Tukey 5%.	72
Anexo 6: Análisis de variancia para el efecto del pH en el ritmo de crecimiento micelial del aislamiento de Pyricularia-bijao. Tukey 5%.	72
Anexo 7: Análisis de variancia para el efecto de la luz continua, luz alterna y oscuridad en el ritmo de crecimiento micelial del aislamiento de Pyricularia-bijao. Tukey 5%.	72
Anexo 8: Análisis de variancia para el efecto de los medios de cultivo en el ritmo de crecimiento radial del aislamiento de Pyricularia-bijao. Tukey 5%.	73
Anexo 9: Análisis de variancia para el efecto de los medios de cultivo en el ritmo de crecimiento radial del aislamiento de Pyricularia-arroz. Tukey 5%.	73
Anexo 10: Medios de cultivo para determinar las características culturales de los aislamientos Pyricularia-bijao y arroz.	73
Anexo 11: Resolución de autorización de SERFOR para colecta de muestras de hojas de Calathea sp.	76
Anexo 12: Resultados del servicio de análisis molecular de los dos aislamientos del agente causal de manchas foliares en Calathea sp.	77

RESUMEN

Una especie no reportada de *Pyricularia* está causando serios daños en la producción de hojas de *Calathea* sp. “wira bijao”; que son empleadas en la envoltura de variados platos típicos en la selva peruana. En este estudio se caracterizó cultural, morfológica, patológica y molecularmente a este agente causal comparativamente con *Pyricularia oryzae* aislado de arroz. Para la caracterización morfológica, se realizaron mediciones de sus conídias y conidióforos, obtenidos directamente de material enfermo y de aislamientos monospóricos en medio PDA. Las características culturales fueron evaluadas mediante el ritmo de crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo, niveles de pH y condiciones de luz; mientras que, las características patogénicas se evaluaron mediante la inoculación cruzada de los aislamientos de *Pyricularia* de bijao y arroz sobre plántones de *Calathea* sp. y *Oryza sativa* producidas en vivero. La identificación molecular se basó en la secuenciación y análisis de distancia genética basado en fragmentos del gen 28S (región D1/D2) y el gen espaciador ribosomal (ITS). Los resultados morfológicos y culturales fueron similares a las características descritas para el género *Pyricularia*. Las dimensiones de las conídias ($27.60 \pm 1.51 \times 10.7 \pm 0.84 \mu\text{m}$) del aislamiento *Pyricularia* - bijao son 33 por ciento más en su longitud y 15.1 menos en la longitud de sus conidióforos ($102.89 \pm 15.28 \times 4.11 \pm 0.39 \mu\text{m}$); su ritmo de crecimiento en PDA fue 0.282 cm/día y es 2.3 veces menos en relación al aislamiento *Pyricularia* - arroz. Las inoculaciones cruzadas indican que *Pyricularia* que infecta al arroz puede causar lesiones leves en bijao; mientras que, *Pyricularia* que infecta al bijao no causa ninguna lesión visible en el arroz, pero sí en otras cuatro especies de *Calathea*. Los resultados del análisis molecular concluyen que el agente causal de quemado de las hojas de *Calathea* sp. “wira bijao” es *Pyricularia oryzae* Cavara 1882, siendo este el primer reporte de infección en un hospedante diferente a las especies pertenecientes a la familia Poaceae.

Palabras claves: *Pyricularia oryzae*, *Calathea*, Pyriculariaceae, filogenia.

ABSTRACT

An unreported *Pyricularia* specie had been causing serious damages in the production of *Calathea sp.*, also known as wira bijao, which are employed in the elaboration of many typical dishes in the Peruvian Amazonia region. In this study, this causal agent was characterized was culturally, morphologically, pathologically, and molecularly characterized in comparison with *Pyricularia oryzae* isolated from rice. The morphological characterization was made by measuring its conidia and conidiophores, which were obtain directly from an infected sample and monosporic isolated on PDA. The culture characterization was made by comparing the rate of growth of mycelial, by varying types of cultivation, levels of pH and lighting conditions. Meanwhile, the pathological characteristics were evaluated by cross-inoculation of isolated *Pyricularia* - bijao and isolated *Pyricularia* – rice, on *Calathea sp.* and *Oryza sativa*'s seedling produced in plant nursery. And the molecular identification was made by the sequencing and analysis of the genetic length of 28S gen's fragments (D1/D2 region) and internal transcribed spacer (ITS). The morphologic and culture results of this unreported specie show a highly level of similarity to the *Pyricularia* genre's characteristics. The dimensions of the isolated *Pyricularia* – bijao's conidia ($27.60 \pm 1.51 \times 10.7 \pm 0.84 \mu\text{m}$) are 33.0 percentage larger, while its conidiophores dimensions ($102.89 \pm 15.28 \times 4.11 \pm 0.39 \mu\text{m}$) are 15.1 percentage shorter, both in comparison to the *Pyricularia oryzae* isolated from rice. In other hand, its rate of growth on PDA, 0.282 cm/day, is 2.3-fold slower than the isolated *Pycularia* - rice. The cross-inoculation results show that the *Pyricularia* that infects rice may cause minor damages on bijao, while the *Pyricularia* that infects bijao does not cause any visible damage on rice, but it does in other four species of *Calathea*. The results of molecular analysis concluded that the causal agent of leaf scorch on *Calathea sp.* is the *Pyricularia oryzae* Cavara 1882, which is the first report of an infection in a host that does not belong to any species of the *Poaceae* family.

Key words: *Pyricularia oryzae*, *Calathea*, Pyriculariaceae, phylogeny.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Pyricularia* (Cooke) Sacc. fue caracterizado por Saccardo (1880), con la especie tipo *P. grisea* (Cooke) Sacc.; actualmente, se considera dentro de la familia Pyriculariaceae que, además, incluye a otros ocho géneros que afectan a un amplio rango de hospedantes de la familia de las Poaceae. Las especies *P. oryzae* y *P. grisea* son de importancia fitopatogénica; entre otros en el cultivo de *Oryza sativa* L., cuyas pérdidas en rendimiento alcanzan el rango del 17 al 52 por ciento (Prabhu *et al.* 2003).

El género *Calathea*, es una planta herbácea de la familia Marantaceae que se distribuye en toda América tropical desde México hasta Argentina, a altitudes que oscilan entre el nivel del mar hasta los 1500 msnm, aunque algunas especies se les puede encontrar hasta los 2000 msnm en regiones andinas de Colombia y Ecuador (Kennedy *et al.* 1988). Se han descrito alrededor de 300 especies (Braga 2005), de las cuales muchas son comercializadas en todo el mundo, como plantas ornamentales por su gran tamaño, particular textura y atractivos follajes de vistosos matices en colores verde, morado, rojo y blanco (Lascurain 1995).

En el Perú, existe una amplia distribución de este género; sin embargo, no se ha logrado encontrar información científica sobre el número de especies y su distribución geográfica. En la provincia de Leoncio Prado, región Huánuco, son cultivados por pequeños productores tres especies de *Calathea* sp. denominadas como “bijao”; las especies no identificadas en orden de importancia económica son denominadas como “wira bijao”, “bijao blanco” y “bijao lanudo”, este último por sus características morfológicas correspondería a *Calathea lutea* (Aubl.) E. Mey. ex Schult. Las hojas constituyen un insumo importante para la cocción de variados platos típicos como el “juane de gallina”, “juane de yuca”, “ninajuane”, “patarashca” entre otros que son preparados por la mayoría de los habitantes de la selva alta y baja. Su comercio y precio se incrementan sustancialmente durante las fiestas de San Juan, que se celebra cada 24 de junio.

En el Perú, no existen reportes científicos sobre la presencia de hongos fitopatógenos en las hojas de “bijao”; aunque, una especie no reportada de *Pyricularia* está causando serios daños en la producción de hojas del “wira bijao” que justifica realizar estudios de caracterización cultural, morfológica, patogenicidad e identificación mediante técnicas moleculares con la finalidad de establecer plenamente su identidad con fines de implantación de estrategias de prevención y control. En ese contexto, se planteó el objetivo siguiente:

1. Caracterizar cultural, morfológica, patológica y molecularmente el agente causal del quemado de hoja en *Calathea* sp. cultivar “wira bijao”

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. EL GÉNERO *Pyricularia*

El género *Pyricularia* (Cooke) Sacc., fue establecido por Saccardo (1880) con la especie tipo, *P. grisea* (Cooke) Sacc., descrito originalmente en *Digitaria sanguinalis* L. Según la revisión de Klaubauf *et al.* (2014), determinaron que el género *Pyricularia* forma un clado monofilético que incluye a *P. oryzae* y *P. grisea* dentro de la familia Pyriculariaceae. El número de géneros, especies y rango de hospedantes de la Familia Pyriculariaceae son mostrados en el Cuadro 1 y han sido elaborados a partir del Árbol de la Vida (ToL) o Lifemap-NCBI (Vienne 2016; Klaubauf *et al.* 2014 y Ellis 1971). Según Lifemap-NCBI (2021), la familia Pyriculariaceae consta de 9 géneros, donde el género *Pyricularia* presenta 42 posibles especies; de ellos 18 están identificados mediante técnicas moleculares hasta la categoría de especie (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 1: Géneros, número de especies y rango de hospedantes de la Familia Pyriculariaceae

Géneros ¹	Nº especies ¹	Rango de hospedantes	Fuente
1. <i>Pseudopyricularia</i>	9	<i>Cyperus</i> sp. y <i>Bothriochloa</i> sp.	Klaubauf et al. (2014)
2. <i>Proxipyricularia</i>	1	<i>Zingiber mioga</i> y <i>Zingiber officinale</i>	Klaubauf et al. (2014)
3. <i>Neopyricularia</i>	2	<i>Commelina communis</i>	Klaubauf et al. (2014)
4. <i>Deightoniella</i>	1	<i>Musa</i> sp.	Ellis (1971)
5. <i>Barretomyces</i>	1	<i>Calathea longifolia</i>	Klaubauf et al. (2014)
6. <i>Bambusicularia</i>	1	<i>Sasa</i> sp. y <i>Phyllostachys</i> sp.	Klaubauf et al. (2014)
7. <i>Xenopyricularia</i>	1	<i>Zizania latifolia</i>	Klaubauf et al. (2014)
8. <i>Macgarvieomyces</i>	3	<i>Juncus effusus</i>	Klaubauf et al. (2014)
			Ellis (1971), Hashioka (1971), Duarte (1971), Subramanian and Vittal (1974), de Albuquerque and Matsushima (1993, 1996), Klaubauf et al. (2014),
9. <i>Pyricularia</i>	18 (identificados)	<i>Poaceae</i> , <i>Cyperaceae</i> , <i>Zingiberaceae</i> , <i>Cannaceae</i> , <i>Marantaceae</i> , <i>Musaceae</i> , <i>Solanaceae</i> , <i>Sapindáceas</i> , <i>Lauraceae</i> , <i>Malvaceae</i> y <i>Moraceae</i>	NCBI (2021)
	24 (No identificados)	S/i ²	

¹ = Además de Klaubauf et al. (2014) fueron complementados de NCBI (National Center for Biotechnology Informa

² = Sin iformación

Cuadro 2: Especies de *Pyricularia*, hospedantes y países donde se ha reportado su presencia

Especies¹	Hospedante	Familia	País reportado	Fuente
<i>Pyricularia</i> No clasificados (24)	s/i	s/i	s/i	NCBI (2021)
1. <i>Pyricularia caricis</i>	s/i	s/i	s/i	s/i
2. <i>Pyricularia penniseti</i>	<i>Pennisetum</i> sp.	Poaceae	China	Klaubauf et al. (2014)
3. <i>Pyricularia occidentalis</i>	s/i	s/i	s/i	s/i
4. <i>Pyricularia urashimae</i>	s/i	s/i	s/i	s/i
5. <i>Pyricularia graminis-tritici</i>	<i>Triticum</i> sp.	Poaceae	Brasil	Castroagudín et al. (2016)
6. <i>Pyricularia fuispora</i>	Suelo		China	Ren-Heng et al. (1997)
7. <i>Pyricularia ctenantheicola</i>	<i>Ctenanthe oppenheimiana</i>	Marantacea	Grecia	Klaubauf et al. (2014)
8. <i>Pyricularia zingibericola</i>	<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Isla Reunion	Klaubauf et al. (2014)
9. <i>Pyricularia pennisetigena</i>	<i>Echinochloa colona</i>	Poaceae	Brasil	Klaubauf et al. (2014)
	<i>Cenchrus ciliaris</i> y <i>C. echinatus</i>	Poaceae	Japon, Filipina y Brasil	Klaubauf et al. (2014)
	<i>Pennisetum</i> sp. y <i>P. glaucum</i>	Poaceae	Mali y USA	Klaubauf et al. (2014)
10. <i>Pyricularia penniseticola</i>	<i>Pennisetum</i> sp. <i>P. typhoides</i>	Poaceae	Burkina, Cote d'Ivoire y Mali	Klaubauf et al. (2014)
	<i>Digitaria exilis</i>	Poaceae	Cote d'Ivoire y Mali	Klaubauf et al. (2014)
11. <i>Pyricularia tsao-ko</i>	<i>Amomum tsao-ko</i>	Zingiberaceae	China	YiMing et al. (2014)
12. <i>Pyricularia cortaderiae</i>	<i>Cortaderia selloana</i>	Poaceae	New Zealand	McKenzie et al (2010)
13. <i>Pyricularia variabilis</i>	<i>Amomum siamense</i>	Zingiberaceae	Tailandia	Klaubauf et al. (2014)
14. <i>Pyricularia parasitica</i>	<i>Phyllachora graminis</i>	Hiperparásito	USA	Klaubauf et al. (2014)
15. <i>Pyricularia costina</i>	<i>Amomum siamense</i> , <i>Alpinia malaccensis</i>	Zingiberaceae	Tailandia	Bussaban et al. (2003)
16. <i>Pyricularia angulata</i>	<i>Musa</i> sp.	Musae	India	Sangeetha et al. (2017)
17. <i>Pyricularia oryzae</i>	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	Poaceae	Japon	Klaubauf et al. (2014)
	2 <i>Brachiaria mutica</i>	Poaceae	Filipinas	Klaubauf et al. (2014)
	3 <i>Cynodon dactylon</i>	Poaceae	Filipinas	Klaubauf et al. (2014)
	4 <i>Echinochloa crus-galli</i> y <i>E.colona</i>	Poaceae	Israel y Filipinas	Klaubauf et al. (2014)
	5 <i>Eleusine indica</i> , <i>E. coracana</i> y <i>E. indica</i>	Poaceae	Japon, Ruanda y Cote d'Ivoire	Klaubauf et al. (2014)

Continuación

	6	<i>Eragrostis curvula</i>	Poaceae	Japon	Klaubauf et al. (2014)
	7	<i>Eriochloa villosa</i>	Poaceae	Japon	Klaubauf et al. (2014)
	8	<i>Festuca elalior</i>	Poaceae	Korea	Klaubauf et al. (2014)
	9	<i>Leersia hexandra</i>	Poaceae	C ^o te d'Ivoire, Vietnam	Klaubauf et al. (2014)
	10	<i>Leptochloa chimensis</i>	Poaceae	Philipinas	Klaubauf et al. (2014)
	11	<i>Lolium hybridum</i>	Poaceae	Korea	Klaubauf et al. (2014)
	12	<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	Amplio	Klaubauf et al. (2014)
	13	<i>Panicum miliaceum</i> y <i>P. repens</i>	Poaceae	Korea y Philipinas	Klaubauf et al. (2014)
	14	<i>Paspalum</i> sp. y <i>P. distichum</i>	Poaceae	Burkina y Philipinas	Klaubauf et al. (2014)
	15	<i>Phalaris arundinacea</i>	Poaceae	Japon	Klaubauf et al. (2014)
	16	<i>Phleum pratense</i>	Poaceae	Korea	Klaubauf et al. (2014)
	17	<i>Rottboellia exalta</i>	Poaceae	Philipinas	Klaubauf et al. (2014)
	18	<i>Setaria</i> sp. y <i>Setaria viridis</i>	Poaceae	India y USA	Klaubauf et al. (2014)
	19	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	Poaceae	Portugal	Klaubauf et al. (2014)
	20	<i>Triticum</i> sp.	Poaceae	Brasil	Klaubauf et al. (2014)
	21	<i>Zea mays</i>	Poaceae	Gabon	Klaubauf et al. (2014)
18. <i>Pyricularia grisea</i> W98-20 <i>Pyricularia grisea</i> W97-11		<i>Digitaria</i> sp. <i>D. sanguinalis</i> , <i>D. horizontalis</i> , <i>D. smutsii</i> , <i>D. silaris</i> .	Poaceae	Brasil, Japon, Philipinas, USA.	Klaubauf et al. (2014) y Ellis (1971)
		<i>Echinochloa crus-galli</i>	Poaceae	Korea	Klaubauf et al. (2014)
		<i>Lolium perenne</i>	Poaceae	Korea	Klaubauf et al. (2014)
		<i>Bambusa</i> , <i>Brachiaria</i> , <i>Cynodon</i> , <i>Eleusine</i> , <i>Eragrostis</i> , <i>Panicum</i> , <i>Secale</i> , <i>Setaria</i> , <i>Sorghum</i> y <i>Zea mays</i>	Poaceae	Apliamente distribuído	Ellis (1971)
		<i>Commelina</i>	Commelinaceae	s/i	Ellis (1971)
		<i>Nicotiana</i>	Solanaceae	s/i	Ellis (1971)
	Total de posibles especies = 24 (No identificados) + 18 (Identificados) = 42				

¹ = Klaubauf et al. (2014) y NCBI (National Center for Biotechnology Information)

² = s/i = Sin información

2.1.1. Taxonomía

Según el esquema de representación de las relaciones evolutivas entre todas las especies de la tierra planteado por Lifemap-INCBI o Árbol de la Vida (ToL) y los reportes de Klaubauf *et al.* (2014) y Maharachchikumbura *et al.* (2015), se determina que el género *Pyricularia* pertenece a la familia Pyriculariaceae, Orden Magnoporthales, Clase Sordariomycetes, División Ascomycota y Reino Fungi. El número probable de especies de este género asciende a 42 de los cuales 18 están plenamente identificados mediante análisis molecular (Cuadros 1 y 2). Gladiux *et al.* (2018), al analizar el genoma de 76 cepas de *Magnaporthe oryzae* proveniente de 12 géneros de hospedantes diferentes, determinaron que pertenece a una sola especie; subdividida en múltiples linajes, asociados a algunos géneros de las poaceae; además, describen a *Pyricularia oryzae* como sinónimo de *Magnaporthe oryzae*.

2.1.2. Características morfológicas

El nombre *Pyricularia*, fue atribuido a la forma piriforme de sus conídias, siendo Saccardo en 1880, quien la describió empleando como especie tipo a *Pyricularia grisea* Sacc.; mientras que, Cavara en 1892, describió a *Pyricularia oryzae* Cav (Ellis 1971). Aun cuando, la falta de diferencias morfológicas relevantes de estas dos especies (Cuadro 3) se mantuvieron como especies separadas (Bussaban *et al.* 2005). Rossman *et al.* (1990) argumentaron que *P. oryzae* podría sinonimizarse con *P. grisea* y agrupó a estos dos anamorfos bajo el teleomorfo de *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. Sin embargo, los estudios filogenéticos de Klaubauf *et al.* (2014) establecieron que ambas especies se agrupan en dos clados relacionados.

De acuerdo con la descripción de Ellis (1971), *Pyricularia* posee conidióforos macronematosus, mononematosus, delgado que usualmente emergen solitarios o en pequeños grupos a través de las estomas. Las células conidiógenas son poliblasticas, integradas en los conidióforos, simpodiales, cilíndricas, geniculados y denticuladas. Las conídias son solitarias, secas, acropleurógenas, simples, de formas variadas y de hialinas a marrón pálido (Figura 1). En el Cuadro 3, se muestra las dimensiones establecidas para las conídias y conidióforos de las especies *P. grisea* (anamorfo de *Magnaporthe grisea*) y *P. oryzae* (anamorfo de *Magnaporthe oryzae*).

Cuadro 3: Dimensiones de conídias y conidióforos de *P. grisea* y *P. oryzae* descritos por Ellis (1971)

Especies	Conídias (μm)	Conidióforos (μm)
<i>Pyricularia grisea</i>	20.9 (17- 28) x 7.6 (6 - 8)	> 150 x 2.5 - 4.5
<i>Pyricularia oryzae</i>	21.2 (17- 23) x 9.6 (8 - 11)	> 130 x 3.0 - 4.0

Fuente: Elaborado a partir de Ellis (1971)

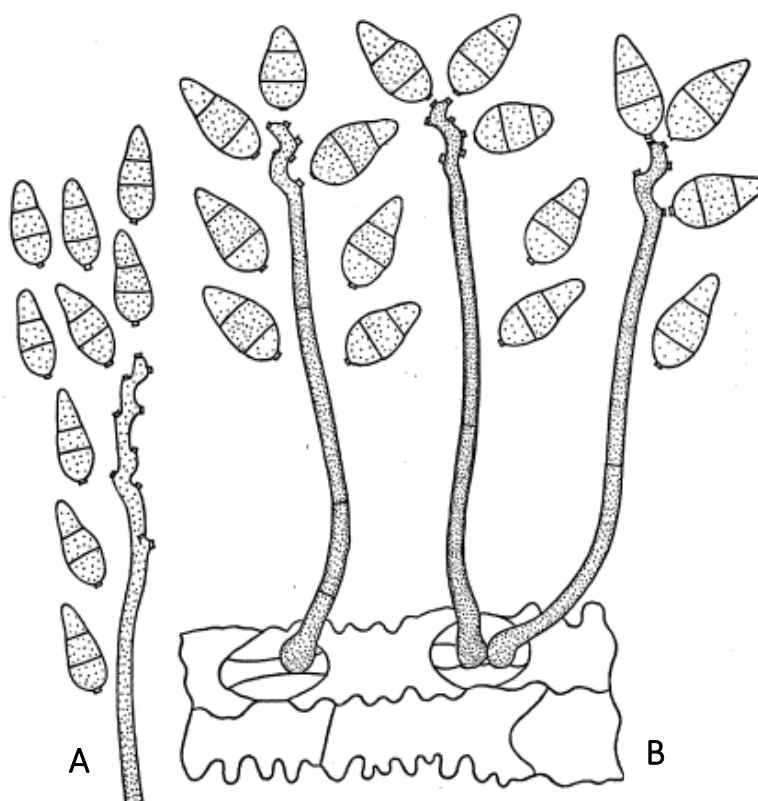


Figura 1: Morfología de *Pyricularia grisea* (A) y *Pyricularia oryzae* (B)

Fuente: Ellis (1971)

Longya *et al.* (2020) describieron cuatro variaciones morfológicas en la forma de las conídias al evaluar 59 cepas de *P. oryzae* obtenidas en Tailandia y cultivadas en medio Agar Harina de Arroz (Figura 2). La mayoría de los conidios (77.97 por ciento) fueron de forma piriforme, el 6.78 por ciento tenían conídias piriformes pequeños, el 13,60 por ciento poseían conídias piriformes largos; mientras que, el 1.69 por ciento producía conídias de forma ovalada.

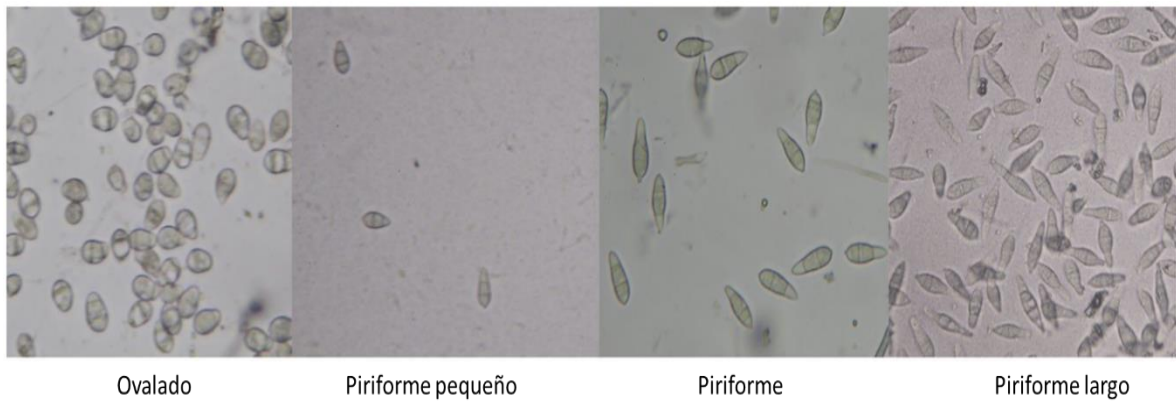


Figura 2: Variaciones morfológicas de las conídias de *P. oryzae*

Fuente: Longya *et al.* (2020)

2.1.3. Características culturales

Nartymov *et al.* (2021), identificaron en el crecimiento de las colonias de cepas de *P. oryzae*, seis rasgos característicos en la forma del crecimiento, aspecto estructural del micelio y el perfil de la colonia desarrollada (Figura 3). Además, determinaron el color del micelio aéreo y el color del medio de cultivo.

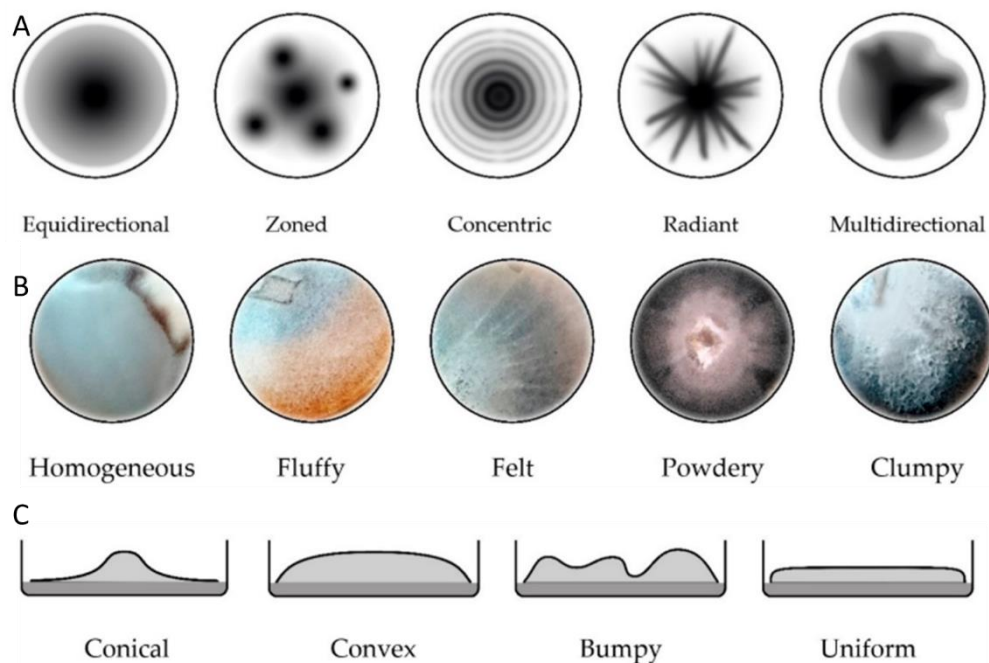


Figura 3: Características de desarrollo de colonias de *Pyricularia oryzae*. A. Naturaleza del crecimiento, B. Estructura, C. Relieve de la superficie

Fuente: Nartymov *et al.* (2021)

Longya *et al.* (2020), establecieron una escala de descripción del color del micelio, forma de crecimiento (plano o esponjoso) y densidad; asimismo, establecieron una escala de cuantificación para la producción de melanina en medio agar-harina-arroz a partir del centro de crecimiento de 59 cepas *P. oryzae* obtenidas de Tailandia (Figura 4), determinando una amplia variación entre ellas.

2.1.4. Rango de hospedantes

Las especies de *Pyricularia oryzae* Cavara. y *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. son las que han sido descritas y estudiadas por ser responsables de enfermedades en muchas especies de gramíneas. Ellis (1971) describe que *P. oryzae* causa el quemado en *Oryza* y ocasionalmente en otras gramíneas, en cambio *P. grisea* posee un amplio rango de hospedantes que incluye dentro de la familia Poaceae a *Bambusa*, *Brachiara*, *Cynodon*, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Eleusine*, *Eragrostis*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Secale*, *Setaria*, *Sorghum* y *Zea*, en la familia Commelinaceae a *Commelina sp.* y en la familia Solanaceae a *Nicotiana sp.* (Cuadro 2).

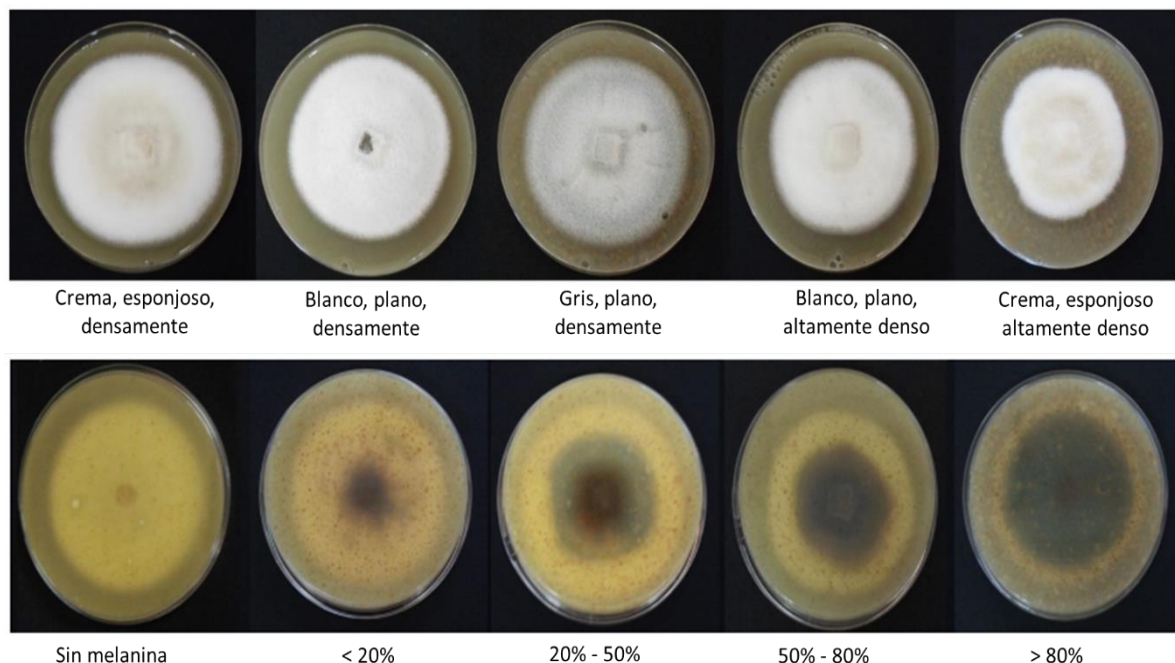


Figura 4: Variación en la forma de crecimiento micelial y producción de melanina de *pyricularia oryzae*.

Fuente: Longya *et al.* (2020).

Pyricularia oryzae (anamorfo de *Magnaporthe oryzae*) es responsable de causar manchas foliares en 21 géneros de plantas no cultivadas y cultivadas, todas pertenecientes a la familia Poaceae; entre ellas destacan el arroz, trigo, maíz y sorgo; mientras que, *P. grisea* (anamorfo de *Magnaporthe grisea*) es responsable de manchas foliares en diferentes especies de las familias Poacea, Conmelinaceae y Solanaceae (Cuadro 2).

2.1.5. Ciclo patogénico

El ciclo patogénico de *P. oryzae* comprende una serie de etapas (Figura 5), que se inicia con el depósito de las conídias sobre el tejido por agentes de dispersión como el viento, luego sigue la *adhesión*, la *germinación* y desarrollo del *tubo germinativo* sobre al tejido del hospedante, desarrollándose todos estos procesos en aproximadamente dos horas. El tubo germinativo se hincha durante las próximas 6 a 10 horas y se diferencia en un *apresorio* que genera turgencia celular, ejerciendo fuerzas mecánicas que rompen la cutícula de la hoja, permitiendo la *penetración* que ocurre dentro de las 10 a 14 horas posteriores a la producción del apresorio. La *colonización* se realiza a través del crecimiento de las hifas que invaden las células sin causar síntomas en los primeros 4 a 5 días después de la penetración. Luego aparecen lesiones necróticas, a partir de las cuales se producen conidióforos y conídias dando continuidad al ciclo patógeno (Kankanala *et al.* 2007 y Galhano y Talbot 2011).

2.1.6. Epidemiología

En condiciones favorables de humedad y temperatura nocturnas entre 12 a 32 °C, potencialmente se pueden producir 20 a 60 mil conídias en cada lesión (Kato 2001).

Las conídias generalmente se diseminan por corrientes de aire. Hay dos tipos de dispersión: (i) dispersión local de aproximadamente 1 a 5 m y (ii) dispersión a largas distancias mediante semillas infestadas o en la ropa de viajeros. La diseminación por el viento es el más importante, pero también pueden propagarse por semillas, paja y en el agua de riego (Tharreau *et al.* 2009).

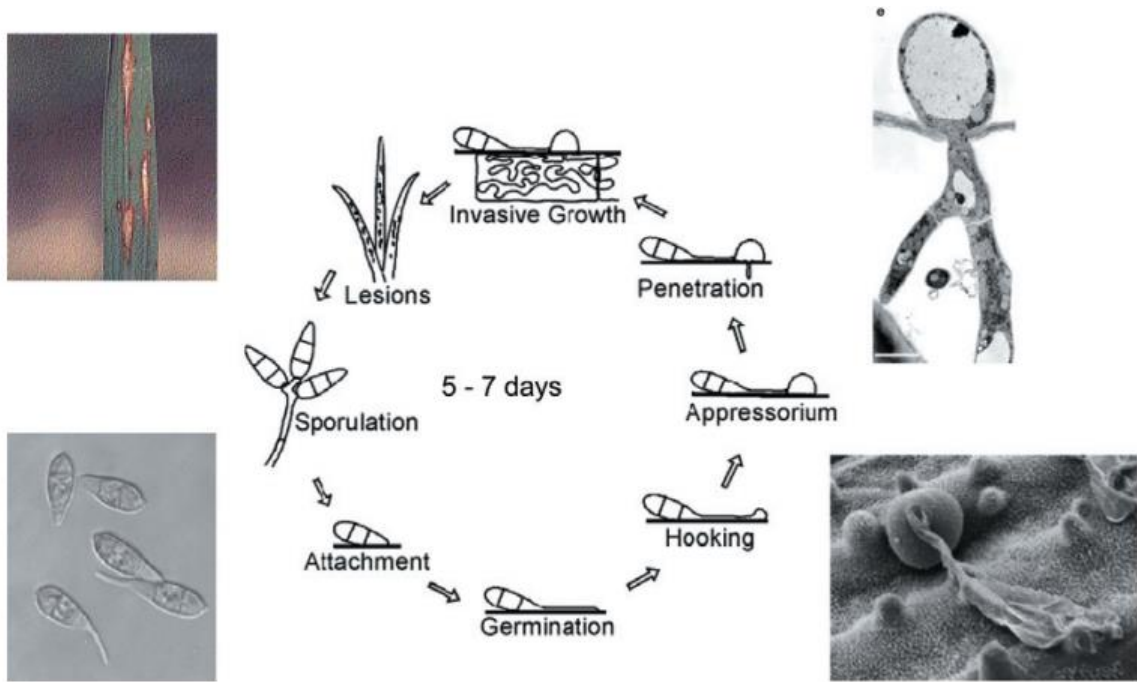


Figura 5: Ciclo patogénico de *Pyricularia oryzae*

Fuente: Dean *et al.* (2012)

2.1.7. Ensayos de patogenicidad

Para ensayos de patogenicidad de *P. oryzae* sobre plántulas de trigo, Aucique-Pérez *et al.* (2020), obtuvieron conídias de medio avena-agar de 10 días de incubación con la ayuda de un pincel en agua de gelatina (1 por ciento p/v). La suspensión conídial se calibró a una concentración de $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$. La suspensión se asperjó sobre la superficie de las hojas adaxiales de las plantas 35 días después de la emergencia. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron en cámara húmeda en oscuridad a 25°C y una humedad relativa de 90 ± 5 por ciento durante 24 h, logrando el ciento por ciento de infección.

2.1.8. Caracterización molecular

Existen varias técnicas moleculares empleadas como herramientas auxiliares en la caracterización taxonómica de hongos. Dentro de ellas, desatacan las técnicas basadas en la amplificación de ADN; por la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Sobre esta técnica se han desarrollado diferentes modificaciones, entre ellas, la PCR múltiple, PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphisms), RT (Reverse transcriptase)-PCR, PCR-TR (Real time) o qPCR. Como trabajos aplicados con esta tecnología se puede mencionar a

Dubina *et al.* (2020) aplicaron la técnica de PCR múltiple para identificar genes de avirulencia en 57 aislamientos de *P. oryzae* provenientes de la zona sur de Rusia.

Los marcadores moleculares difieren en costo, velocidad, complicación, mano de obra, grado de polimorfismo y repetibilidad. Las técnicas de marcadores ISSR y SRAP son rápidas y de bajo costo; no requieren información de secuencia, tienen una alta repetibilidad y usan sólo PCR de un paso. Proporcionan información altamente discriminatoria con buena reproducibilidad y son relativamente abundantes, mientras que AFLP y RAPD son más laboriosos y consumen más tiempo (Robarts y Wolfe 2014). Empleando esta técnica Longya *et al.* (2020) evaluaron la diversidad genética de 59 cepas de *P. oryzae* obtenidas de Tailandia. Los resultados mostraron variaciones tanto morfológicas como genéticas.

La detección e identificación rápida de una enfermedad es clave porque permite controlar y limitar su propagación en todo el mundo, tal como como sucedió con la diseminación del linaje de *Pyricularia oryzae*, causante del quemado del trigo del Brasil a Asia; a través de la exportación de semillas infectadas (Thierry *et al.* 2020); asimismo, estos autores desarrollaron una prueba de PCR en tiempo real, con una alta sensibilidad para detectar aislamientos pertenecientes a 81 linaje de *P. oryzae* patogénicos a trigo.

Klaubauf *et al.* (2014), para dilucidar las relaciones taxonómicas entre especies que se asemejan a *Pyricularia* en su morfología, analizaron las relaciones filogenéticas mediante el uso de secuencias parciales de ADN de múltiples genes como LSU, ITS, RPB1, actina y calmodulina. Las especies de *Pyricularia* pertenecen a un clado monofilético formando la familia Pyriculariaceae que agrupa además a los géneros: *Barretomyces*, *Bambusicularia*, *Deightoniella*, *Macgarvieomyces*, *Pseudopyricularia*, *Neopyricularia*, *Proxipyricularia* y *Xenopyricularia*. Las especies de *P. oryzae* y *P. grisea* se agrupan en dos clados relacionados. Para mejorar la resolución de los clados dentro de Pyriculariaceae combinaron las secuencias ACT/ITS/RPB1 (Figura 6).

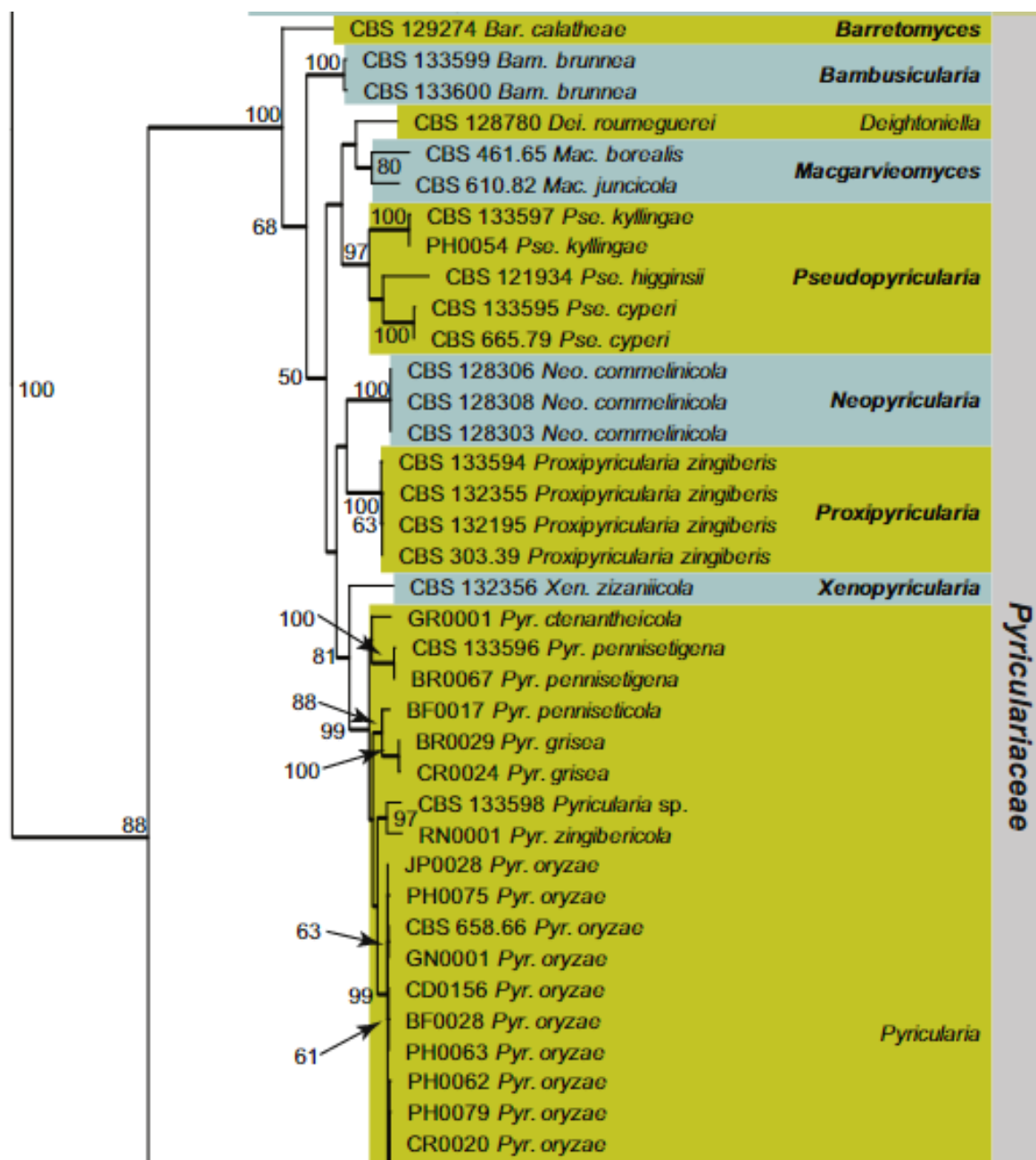


Figura 6: Filogenia de la familia Pyriculariaceae

Fuente: Klaubauf *et al.* (2014)

2.2. EL GÉNERO *Calathea*

2.2.1. Taxonomía

Reino	:	Plantae
Filo	:	Magnoliophyta
Clase	:	Liliopsida (Monocotiledónea)
Orden	:	Zingiberales
Familia	:	Marantaceae
Nombre científico	:	<i>Calathea</i> sp.
Nombres comunes	:	Bijao, Bijagua, hoja blanca, platanilla, varía según el país o región.

El rizograma del Orden de los Zingiberales se muestra en la Figura 7, donde se incluye a la Familia Marantaceae, como una de las ocho familias que forman parte de los Zingiberales (The Heliconia Society International 2014).



Figura 7: Rizograma del Orden de los Zingiberales

Fuente: The Heliconia Society International: <http://www.heliconia.org/the-plants>

La familia Marantaceae está conformada por plantas herbáceas de distribución pantropical. Está compuesta por 31 géneros y cerca de 530 especies (Andersson y Chase 2001), de las cuales catorce géneros y aproximadamente 450 especies están en el neotrópico. El género con mayor número de especies en la familia es *Calathea*, con alrededor de 300 especies (Braga 2005). Según Lascurain (1995), los miembros de esta familia (*Ctenanthe*, *Stromanthe*, *Maranta* y *Calathea*), son apreciadas en todo el mundo como plantas ornamentales por su gran tamaño, particular textura y atractivos follajes de vistosos matices de colores verde, morado, rojo y blanco.

Los análisis filogenéticos al interior de Marantaceae han identificado cinco clados: *Calathea*, *Donax*, *Maranta*, *Sarcophrynium* y *Stachyphrynium*. Dentro del clado *Calathea* se encuentran las especies de los géneros *Calathea*, *Ischnosiphon* y *Monotagma* y se reconocen al interior de este clado dos grupos, el primero, denominado *Calathea I* el cual agrupa la mayoría de las especies del género *Calathea* y el segundo grupo denominado *Calathea II* en el cual se encuentran especies de los géneros *Ischnosiphon*, *Monotagma* y *Calathea* (Andersson y Chase 2001; Prince y Kress 2006).

En el Perú se desconoce el número de especies presentes, aun cuando existe una amplia distribución en toda la selva. En la provincia de Leoncio Prado, región Huánuco, son cultivados por pequeños productores tres especies de *Calathea* sp. denominados como “Bijao”; las tres especies en orden de importancia económica son localmente denominados como “wira bijao”, “bijao blanco” y “bijao lanudo”. En la Figura 8, se presenta las tres especies de *Calathea* cuyas hojas son comercializadas en los mercados locales de las regiones Huánuco, San Martín, Ucayali y Loreto. Las hojas de “bijao lanudo” y “Bijao blanco” son de mayor tamaño que el “wira bijao”; sin embargo, esta última, tiene un mayor contenido de aceites y un aroma característico que brinda a las comidas preparadas un sabor y aroma especial; por ello, tiene mayor valor comercial. Un atado de 6 hojas puede variar de 1.5 soles en los meses alejados de la fiesta de San Juan; mientras que, en los días próximos a ella, el precio se cuadruplica por su alta demanda.

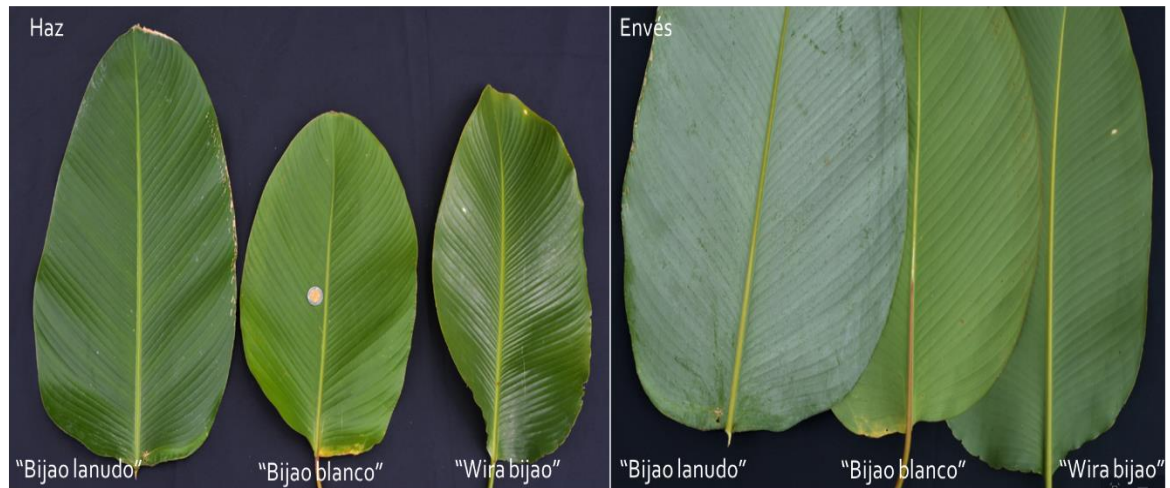


Figura 8: Tipos de bijao comercializados para la preparación de platos típicos de la selva peruana

2.2.2. Características de la planta

Calathea sp. es una planta herbácea tipo musácea. Se caracteriza por presentar en el envés de las hojas el color blanco-ceroso; la inflorescencia es erecta, cilíndrica, brácteas de color bronce a café rojizo, pétalos amarillos; fruto anaranjado y semillas verdosas. Es una planta herbácea de rápido crecimiento, de estatura media llegando a 1.8 a 3 m de altura, es perenne, robusta y posee múltiples tallos que nacen desde su base (cepa) y pueden articularse para formar nuevos tallos y así aumentar en altura el tamaño de la planta. Las hojas miden entre 50 a 100 cm de largo y 25 a 60 cm de ancho, el envés es de color blanco y posee cera, su pecíolo es más largo que la hoja, su nerviación es poco marcada, son finas, juntas y paralelas, de borde entero, su ápice tiene forma redonda y termina en una pequeña punta y su base es redondeada (EcoBiosis 2013).

2.2.3. Distribución

La familia Marantaceae se distribuye sobre todo en zonas tropicales y subtropicales, con una clara concentración Neotropical (Dahlgren *et al.* 2012). El género *Calathea* se encuentra en América tropical, desde México hasta Argentina; a altitudes que oscilan entre el nivel del mar hasta los 1500 msnm, aunque a algunas especies se les puede encontrar hasta los 2000 msnm en regiones andinas de Colombia y Ecuador (Kennedy *et al.* 1988).

Aun cuando en el Perú existe una amplia distribución del género *Calathea*, no se ha logrado encontrar información científica del número de especies presentes y su distribución geográfica.

2.2.4. Usos del género *Calathea*

Díaz-Piedrahita (2013), describe que, dentro de las marantáceas, el género *Calathea* es el de mayor utilización. Este género es conocido con diferentes nombres como: biao, bijao, bijado, bihao, viaho, vihao, vijao, visao y viao. A estas hay que agregar los nombres alpayaca y payaca (usados en Cundinamarca), hoja blanca (empleado en la costa del pacífico), cauassú (utilizado en la región amazónica) y platanillo. Además de los anteriores, existen otros de menor difusión, y combinaciones del nombre bijao con adjetivos, tales como: negro, blanco, de fardo, etc., el principal uso dado a la hoja de *Calathea lutea* es como envoltura de diversas golosinas, harinas, tamales o envueltos. Otros usos son, como envoltura de pescado, carne, quesos, sal, panela, chontaduro y café.

En México, las grandes hojas de algunas especies son frecuentemente utilizadas para envolver alimentos o como abono. Así también, algunas especies son comestibles como los casos de *Calathea macrosepala* var. *macrosepala* y *Maranta arundinacea*. En otras partes del mundo varias especies de *Calathea* son usadas para la construcción de techos, paredes y canastas (Lascurain 1995).

En el Perú, su uso más intensivo es en la preparación de un plato típico denominado “Juane” que, es consumido en la fiesta de San Juan que representa la cabeza de Juan Bautista, quién, según la Biblia, fue decapitado. El juane se prepara con arroz, huevos y presas de gallina envuelta en hoja de bijao. La fiesta de San Juan es una festividad cristiana que se celebra de manera especial en la Amazonía peruana. El día central es el 24 de junio y coincide con una antigua festividad de origen prehispánico vinculada al solsticio de invierno, como ocurre con otras fiestas católicas. Misioneros que llegaron a la selva designaron a San Juan Bautista como Santo Patrono de la Amazonía peruana y su relación con el agua hizo que alcanzara un gran carácter simbólico en la selva debido a la importancia de este elemento (El Comercio 2017).

2.2.5. Enfermedades en *Calathea*

Si se mantiene demasiado húmedo el suelo, las especies de *Calathea* pueden ser infectados por *Pythium* y *Fusarium*. Los síntomas de manchas foliares pueden ser causadas por *Helminthosporium* cuando el follaje permanece húmedo durante períodos prolongados; mientras que, los períodos más fríos son condiciones favorables para la infección de *Botrytis* (Oglesby Plants International 2011). Chern *et al.* (2011), reportan por primera vez en Taiwán a *Exserohilum rostratum* causando manchas foliares en *Calathea picturata*.

Según Farr *et al.* (1989) citados por Leahy (1991), las enfermedades foliares de *Calathea* spp., generalmente se limitan a unos pocos patógenos; tales como, los hongos de los géneros *Cercospora*, *Bipolaris* o *Botrytis*. Leahy (1991), reporta la existencia en varios viveros del estado de Florida (USA), una enfermedad foliar nueva en *Calathea ornata*, que, en base a pruebas bioquímicas, se identificó inicialmente como una especie de *Pseudomonas* no fluorescente, sin embargo, su identidad sigue siendo desconocida.

Chase (1982), reporta a *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler como causante de una mancha foliar de 1 mm de diámetro de color marrón-rojizo con un halo amarillo en *Calathea* spp. Además, precisa que esta enfermedad no es económicamente importante como sí lo representa la mancha foliar causada por *Dreschlera* sp. Simone & Brunk (1983), reportan a *Dreschlera setariae* como el agente causal de una nueva mancha foliar en *Calathea* y *Maranta* spp. Las manchas en *Maranta* spp. son circulares o ligeramente irregulares, son de 2 – 12 mm de diámetro, con un halo clorótico de 2-3 mm. La mancha foliar en *Calathea* spp. es elongada a irregular de 1-16 mm de diámetro, usualmente sin un halo clorótico y frecuentemente delimitado por las nervaduras. *D. setariae* también resultó ser patogénico a *Ctenanthe* y *Stromanthea* que, son otros géneros; de la familia Marantaceae.

En Grecia, Pappas y Paplomatas (1998), identificaron mediante morfológica, patogénica y análisis isoenzimas a *Pyricularia oryzae* como el agente causal de manchas foliares en plantas jóvenes de *Ctenanthe oppenheimiana* y *C. setosa* cv. Greystar (Maranthaceae) originalmente importadas de Brasil a través de Holanda; posteriormente Klaubauf *et al.* (2014), lo renombraron empleando técnicas moleculares a *Pyricularia ctenantheicola* Klaubauf, Lebrun & Crous.

Soares *et al.* (2011), describieron a *Pyriculariopsis calathea*, como una nueva especie causando manchas en las hojas de *Calathea longifolia* (Marantaceae); sin embargo, fue renombrado como *Barretomyces calathea* por Klaubauf *et al.* (2014). En la Figura 9 se muestra el síntoma y las características morfológicas de *B. calathea*.



Figura 9: *Barretomyces calathea* (CBS 129274). A. Mancha foliar sobre *Calathea longifolia* en Brazil. B–G. Conidióforos sosteniendo conídias. H. Conidia

Fuente: Klaubauf *et al.* (2014)

Cabezas y Mattos (2018), describen sobre *Calathea* sp. (wira bijao) la presencia de manchas foliares de forma ovoide de bordes irregulares, alcanzando un diámetro de 0.5 cm; en estado avanzado, desarrollan una mancha de forma romboide que alcanzan un diámetro de 1.83 ± 0.23 , largo de 4.35 ± 0.73 y un área de 5.48 ± 1.01 cm² rodeado de un halo clorótico (Figura 10). Análisis morfológicos y culturales determinan que se trata de *Pyricularia grisea*; sin embargo, no se ha realizado una identificación molecular, inoculación cruzada y determinación del rango de hospedantes.

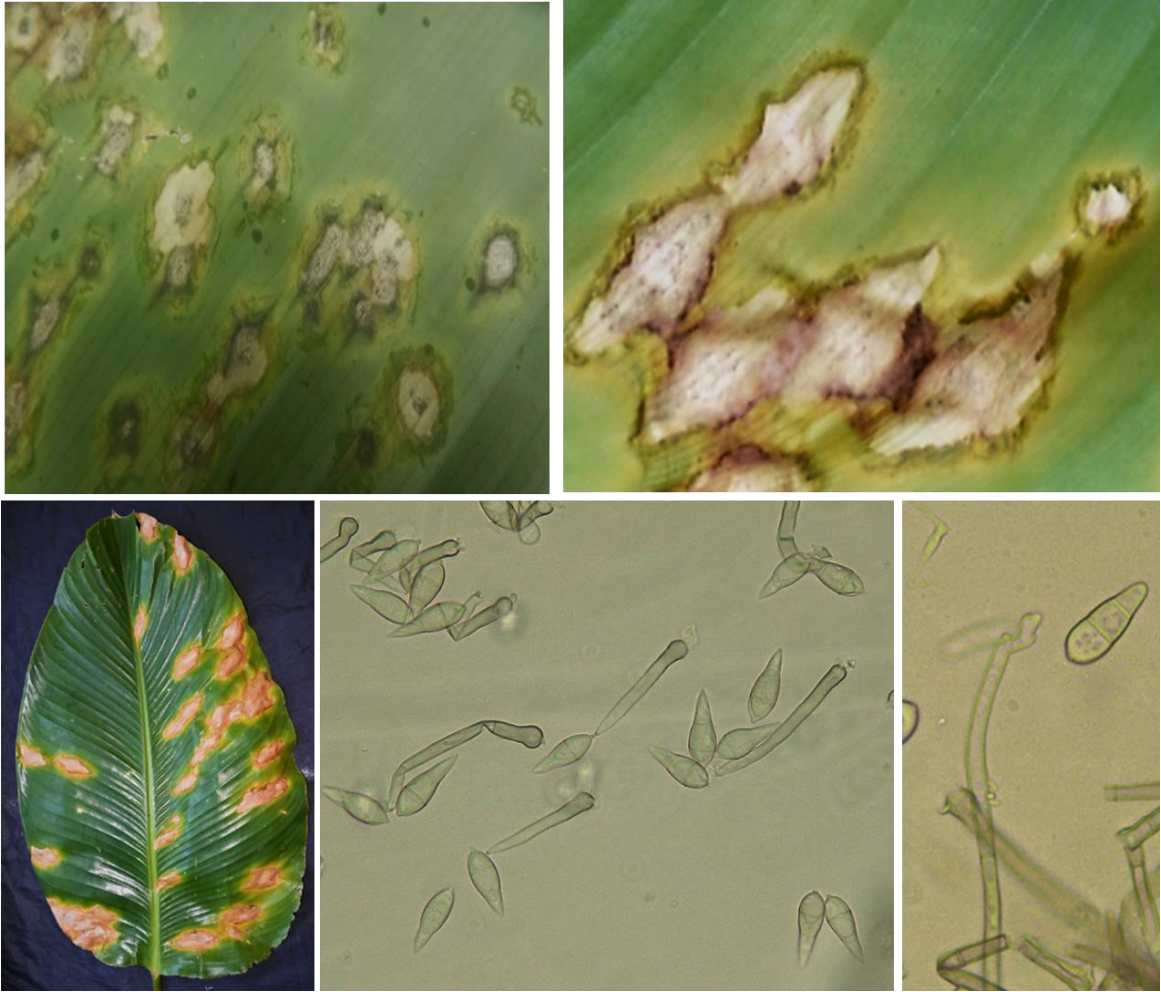


Figura 10: Síntomas causados sobre *Calathea* spp. por *Pyricularia* sp.

Fuente: Cabezas y Mattos (2018)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

La investigación se realizó en el Laboratorio y vivero de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS) – Tingo María, ubicada en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco; en las coordenadas UTM: 388849.9145 E 897338.523 N 18 L, altitud 664 msnm.

3.2. COLECCIÓN DE HOJAS DE BIJAO

En diciembre del 2020, se colectaron hojas con los síntomas típicos de la “mancha foliar” de una plantación comercial ubicada en el sector “El Mirador” situado a 1.1 km de la carretera Tingo María – Monzón, distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco, cuyas coordenadas UTM son: 388849.985 E 897338.552 N 18 L y una altitud de 744 msnm. Las muestras obtenidas fueron transportadas debidamente embaladas y etiquetadas al Laboratorio de Fitopatología de la UNAS, siguiendo los protocolos de colección y envío de muestras fitopatológicas descritas por French y Torres (1980).

3.3. COLECCIÓN DE HOJAS DE ARROZ

Se colectaron hojas de arroz con los síntomas típicos del “quemado”, causado por *Pyricularia oryzae* de un campo comercial ubicado en la provincia de Leoncio Prado, región Huánuco; durante el mes de noviembre del 2020. Las muestras obtenidas, tuvieron el mismo tratamiento que se realizó para las hojas de bijao.

3.4. AISLAMIENTO DE *Pyricularia* sp. DE HOJAS DE BIJAO Y ARROZ

En el Laboratorio de Fitopatología de la UNAS, de las muestras de hojas colectadas de bijao, se seleccionaron sectores de manchas foliares, de los cuales se realizaron montajes microscópicos a través de la técnica de la cinta adhesiva para determinar la presencia de estructuras típicas de *Pyricularia*. Los sectores de manchas foliares seleccionadas se desinfectaron mediante la inmersión en hipoclorito de sodio al 1.5 por ciento durante un

minuto; posteriormente, se enjuagó por tres veces con agua destilada estéril, y en cámara de flujo laminar, se transfirió porciones del tejido enfermo cercano a la zona de avance a placas de petri, conteniendo medio de cultivo papa dextrosa agar con oxitetraciclina (PDAO). Los cultivos, se incubaron a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 7 a 10 días. Debido a la coexistencia de estructuras contaminantes en todos los cultivos realizados en distintos momentos, se optó por aplicar con algunas variantes la técnica de cultivo monospórico planteado por Fei *et al.* (2019) que consistió en los siguientes procesos:

a. Preparación del medio Agar-Agua (AA)

Se disolvió 18 g de agar en polvo en 1 000 ml de agua destilada y luego se esterilizó en autoclave; cuando el AA se enfrió a 45-50 °C, se agregaron los antibióticos cloranfenicol ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) y oxitetraciclina ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), mezclándolos homogéneamente. En cámara de siembra se vertieron aproximadamente 15 ml en placas de Petri de 9 cm de diámetro.

b. Preparación del medio Agar-Papa-Dextrosa (PDA)

Se cortó en trozos 200 g de papa blanca sin cáscara y se hizo hervir en 500 ml de agua. Aparte, se disolvió 18 g agar-agar en agua destilada. Se filtró el caldo de papa con una tela de gasa; se mezcló ambas preparaciones, y se adicionó 20 g de dextrosa. Toda la mezcla se enrazó a 1000 ml y se ajustó el pH a 6.0. El proceso de esterilizado, adición de antibióticos y plaqueo; se realizó de la misma manera que para el medio Agar-Agua, ya descrito.

c. Colección de muestras y obtención de cultivo monospórico

Las muestras colectadas de campo fueron lavadas varias veces con motas de algodón embebidas con agua destilada (AD) y luego secadas con papel toalla. Mediante pegado de cinta adhesiva de 5 cm de ancho sobre el haz y envés de la hoja, se removió toda estructura presente, garantizando de esta manera esporulaciones puras después de 24 a 48 horas de incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente (aproximadamente 22 a 26 °C). En la Figura 10, se muestra el protocolo seguido para el aislamiento monospórico de *Pyricularia-bijao* y *Pyricularia-arroz*.

3.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

Los aislamientos monospóricos fueron identificados en base a sus características morfológicas y culturales del género *Pyricularia* descritos en las claves de identificación de Ellis (1971) y Barnett & Hunter (1992).



Figura 11: Protocolo seguido para obtener aislamientos monospóricos de *Pyricularia* a partir de hojas enfermas de bijao y arroz

3.6. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y CULTURAL DE LOS AISLAMIENTOS DE *Pyricularia* sp.

A partir de aislamientos monospóricos de *Pyricularia* obtenidos de bijao (*Pyricularia*-bijao) y arroz (*Pyricularia*-arroz), se realizaron diferentes evaluaciones para determinar: las características morfológicas y culturales.

3.6.1. Características morfológicas

Como características morfológicas se evaluaron:

a. Determinación de la forma y color de la conidia: a partir de tejido esporulado en cámara húmeda, se realizaron montajes temporales mediante la técnica de la cinta adhesiva, la cual

consistió en colocar una gota de agua (medio de montaje que permite observar fidedignamente el color y la forma de una estructura) en el centro de un portaobjetos. Mediante un trozo de cinta adhesiva 1 x 5 cm tomada por sus extremos entre los dedos pulgar e índice, se aproximó suavemente la parte adhesiva sobre la superficie esporulada y fue extendida sobre la gota de agua del portaobjeto. Los montajes fueron observados en un microscopio óptico Leica DM500. La forma de la conidia fue tipificada según la diagramática propuesta por Longya *et al.* (2020), mostrada en la Figura 1.

b. Medición del diámetro y largo de las conidias y conidióforos: a partir del tejido esporulado y de cultivos monospóricos, se realizaron montajes temporales o permanentes empleando como medios de montaje Agua, Lactofenol o Lactofenol más Azul de Metileno mediante la técnica de la cinta adhesiva o raspado por estilete cubierto con láminas cubre objeto. Estos fueron observados en un microscopio óptico Leica DM500 equipado con una cámara digital ICC50 W conectado a una laptop a través del software Leica, software que además de tomar microfotografías calibradas permitió realizar las mediciones del diámetro y largo de las conidias y conidióforos de ambos aislamientos de *Pyricularia*. Para la evaluación de cada parámetro, se realizaron no menos de 50 mediciones. Las mediciones de estructuras en cultivos monospóricos se realizaron a los 20 días de incubación a temperatura ambiente y alternancia de luz (12 h de luz y 12 h de oscuridad) en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) y Agar Sintético Nutritivo (NSA) ajustados a pH 6.0.

3.6.2. Características culturales

En este aspecto se evaluaron:

a. Efecto de medios de cultivo en el crecimiento micelial: a partir de los cultivos monospóricos de los aislamientos obtenidos de hojas de bijao y arroz se obtuvieron discos de micelio de 5 mm de diámetro y se sembraron separadamente en el centro de placas conteniendo medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar + 50 g harina de arroz (PDA+50HA), Jugo V8 Casero (JV8-Cac), Bijao-Dextrosa-Agar (BjDA), Papa-Dextrosa-Agar + 50 g hoja de Bijao (PDA+Bj), Agar Avena (OMA), Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Agar-Agua (AA) y Agar Nutriente Sintético (SNA). Los ingredientes y modo de preparación son descritos en el Anexo 1. Todos los medios fueron ajustados a pH 6.0. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con 5 repeticiones y los aislamientos se incubaron a temperatura

ambiente 26 ± 2 °C y luz alterna (12 h a luz y 12 h a oscuridad continua). Cada 24 horas, se registró el diámetro de crecimiento micelial; hasta que el micelio cubra toda la superficie del medio, y con estos datos; se determinó el ritmo de crecimiento micelial (RCM) y la tasa de incremento micelial. El RCM se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{RCM} = \text{IC}/\text{TT}$$

Donde:

RCM	:	Ritmo de crecimiento micelial
IC	:	Incremento total (cm)
TT	:	Tiempo total (días)

b. Forma de crecimiento de las colonias: la evaluación de esta característica se realizó en medio PDA y PDA+50HA mediante el empleo de las escalas diagramáticas desarrollados por Nartymov *et al.* (2021), presentadas en la Figura 2.

c. Variación en la forma de crecimiento micelial y producción de melanina: se evaluó en los medios PDA y PDA+50HA mediante el empleo de las escalas diagramáticas propuestos por Longya *et al.* (2020), presentados en la Figura 3.

d. Efecto de las condiciones luz en el crecimiento micelial: a partir de los cultivos monospóricos de los dos aislamientos de *Pyricularia* (bijao y arroz) se obtuvieron discos de micelio de 5 mm de diámetro y se sembraron separadamente en el centro de placas conteniendo medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar, ajustado a pH 6.0. Diez placas de cada aislamiento se sometieron a las siguientes condiciones de luz: (i) Luz continua, (ii) oscuridad total y (iii) luz alterna (12 h de luz y 12 h oscuridad). Se evaluó el ritmo de crecimiento (RC) y tasa de crecimiento micelial.

e. Efecto del pH en el crecimiento micelial: en 100 ml de medio PDA se ajustaron niveles de pH de 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0. Los pH de 3.0, 3.5 y 4.0 no solidificaron por desnaturalización del agar. Al centro de cada placa en cada nivel de pH se colocaron discos de micelio de 5 mm de diámetro de cada aislamiento de *Pyricularia*. Se emplearon cinco placas por cada nivel de pH, la incubación se realizó a temperatura ambiente y alternancia de luz y oscuridad cada 12 horas. Se evaluó el ritmo de crecimiento (RC) y tasa de crecimiento micelial.

3.7. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

3.7.1. Producción de plántulas de arroz y bijao

Las plántulas de arroz fueron obtenidas empleando semillas garantizadas de la variedad Feron, las semillas pregerminadas fueron sembradas en macetas y mantenidas en un invernadero hasta el momento de inoculación. Las plántulas de “wira bijao” fueron obtenidas a partir de hijuelos de plantas madre sanas de una plantación comercial de la zona “El Mirador” ubicado a 1.2 km de la carretera Tingo María – Monzón; los hijuelos fueron sembrado en maceteros. Además, de las plantas de “wira bijao” que tiene el mayor valor comercial en la selva, se colectaron durante el desarrollo de la investigación otras especies de *Calathea* sp. y plantas relacionadas a la filogenia de la familia Marantaceae, a fin de determinar su posible rango de hospedantes. En el Cuadro 4 se presenta la lista de plantas cultivadas en el vivero.

Cuadro 4: Plantas relacionadas a *Calathea* sp. wira bijao producidas en vivero

Hospedantes relacionadas a "Wira bijao"	Familia	Observaciones
1 <i>Calathea</i> spp. 1 “Wira bijao” o Bijao verdadero	Marantaceae	Cultivado, primero en importancia económica
2 <i>Calathea lateralis</i> - Bijao blanco	Marantaceae	Cultivado, segundo en importancia económica
3 <i>Calathea lutea</i> - Bijao lanudo	Marantaceae	Cultivado, tercero en importancia económica
4 <i>Calathea ornata</i> – 1 - ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
5 <i>Calathea ornata</i> – 2 - ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
6 <i>Calathea zebrina</i> - ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
7 <i>Calathea rufibarba</i> - ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
8 <i>Calathea roseoptica</i> - ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
9 <i>Calathea makoyana</i> – ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
10 <i>Calathea lancifolia</i> – ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
11 <i>Calathea warszewiczii</i> – ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
12 <i>Calathea</i> spp. – 1 ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
13 <i>Calathea</i> spp. – 2 ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
14 <i>Calathea</i> spp. – 3 ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
15 <i>Calathea</i> spp. – 4 ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
16 <i>Calathea</i> spp. – 5 ornamental	Marantaceae	No cultivado, Ornamental
17 <i>Zingiber officinale</i> - Kion	Zingiberaceae	Ampliamente cultivado
18 <i>Curcuma longa</i> - Azafrán	Zingiberaceae	Ampliamente cultivado
19 <i>Heliconia</i> sp. 1	Heliconiaceae	No cultivado, Ornamental
20 <i>Heliconia</i> sp. 2	Heliconiaceae	No cultivado, Ornamental

3.7.2. Inoculación

Debido a la poca cantidad de conídias formadas en los medios de cultivo, el inóculo (suspensión conídial) se obtuvo a partir de la esporulación directa de tejido enfermo, el proceso de obtención ha sido descrito en el literal c del numeral 4.4. El inóculo fue estandarizado a una concentración de 1×10^4 conídias/ml mediante conteo en cámara de Neubauer, según el procedimiento descrito por French y Torres (1980).

3.7.3. Estandarización del método de inoculación

Con la finalidad de estandarizar un método de inoculación de los dos aislamientos de *Pyricularia* sobre hojas de *Calathea* sp. (wira bijao) y arroz, se realizaron los siguientes ensayos:

a. Inoculación de discos de micelio y conídias: discos de cultivos monospóricos en medio PDA de ambos aislamientos fueron puestos sobre el haz y envés de hojas de bijao y arroz en dos estados: (i) hojas destacadas (hojas extraídas y mantenidas en cámara húmeda) obtenidas de campo y vivero y (ii) sobre las hojas (haz y envés) de plantas producidas en vivero. Las hojas destacadas, fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1 por ciento durante 3 minutos, luego se enjuagaron por tres veces con agua destilada estéril durante 2 minutos y se secaron con papel toalla para luego ser acondicionadas en cámaras húmedas. Las plantas inoculadas directamente sobre sus hojas fueron cubiertas con bolsas de polietileno de color negro por 12 horas después de la inoculación. Se evaluó en cada tratamiento el desarrollo de síntomas en los sitios de inoculación. Se empleó 5 hojas por cada tratamiento. Al tratamiento testigo, se le colocó un disco de Agar-Agua.

b. Inoculación por aspersión de conídial en hojas: se asperjó una suspensión conídial a una concentración de 1×10^4 conídias/ml de ambos aislamientos sobre hojas destacadas y directamente sobre hojas en plantas de ambas especies en macetero. Los tratamientos fueron: (i) aspersión sobre el haz hojas destacadas, (ii) sobre el envés de hojas destacadas, (iii) aspersión sobre todas las hojas de plantas en maceteros. Las hojas inoculadas fueron acondicionadas de la misma forma que en el literal “a”.

c. Gotas de suspensión conídial: Sólo se aplicó sobre el haz y envés de hojas destacadas de bijao. Se colocó 6 gotas de 500 μL de una suspensión conídial de 1×10^4 conídias/ml de *Pyricularia*-bijao en cada hoja. Las hojas inoculadas fueron colocadas en cámaras húmedas por cada tratamiento.

d. Colocación de una suspensión conídial en banda: Sólo se aplicó sobre el haz y envés de las hojas destacadas de bijao. Se colocó en la parte central de cada hoja un chorro continuo una suspensión conídial de 1×10^4 conídias/ml de *Pyricularia*-bijao. Las hojas inoculadas fueron colocadas en cámaras húmedas.

e. Inoculación en hoja cartucho de wira bijao: Las hojas de bijao se desarrollan a partir de una hoja cartucho semejante al plátano o banano (Figura 24-a). Sobre las hojas cartucho de plantas producidas en vivero se depositó en la parte interna empleando una micropipeta un volumen 2 ml de una suspensión conídial de 1×10^4 conídias/ml en el que se agregó 0.2 por ciento agar-agar, según metodología descrita por Qi *et al.* (2019). Las plantas inoculadas fueron cubiertas con bolsas de polietileno de color negro por 24 horas. Se evaluó el desarrollo de síntomas en toda la lámina foliar.

3.7.4. Inoculación cruzada de *Pyricularia* en plantas de bijao y arroz

De los ensayos de estandarización de inoculación el más eficiente en la infección fue *Pyricularia* en plantas de “wira bijao” fue la aspersión y el depósito de la suspensión conídial en las hojas cartucho; para las plantas de arroz, los métodos más eficientes fueron la aspersión a toda la planta o aspersión en hojas destacadas.

a. Inoculación cruzada de *Pyricularia* en plantas de “wira bijao”: el inóculo de *Pyricularia*-bijao y *Pyricularia*-arroz fue obtenido mediante lavado de sectores de hojas infectadas como fue descrito en el numeral 3.7.2. En el Cuadro 5, se presenta los tratamientos evaluados.

b. Inoculación cruzada de *Pyricularia* en plantas de arroz: el inóculo de *Pyricularia*-arroz fue obtenido mediante lavado de sectores de hojas infectadas como fue descrito en el numeral 3.7.2. En el Cuadro 6, se presenta los tratamientos evaluados.

Cuadro 5: Tratamientos realizados en la inoculación cruzada de los aislamientos de *Pyricularia* en plantas de “wira bijao” en vivero

Tratamiento	Descripción	Inóculo	Sitio de inoculación	Repeticiones
T1	Plantas totalmente podadas que sólo se dejó la hoja cartucho	Suspensión conidial 1×10^4 conidias/ml de <i>Pyricularia -bijao</i>	Depósito en hoja cartucho de 2 ml de la suspensión conidial	10 plantas
T2	Plantas no podadas	Suspensión conidial 1×10^4 conidias/ml de <i>Pyricularia -bijao</i>	Depósito en hoja cartucho de 2 ml de la suspensión conidial	10 plantas
T3	Plantas no podadas	Suspensión conidial 1×10^4 conidias/ml de <i>Pyricularia -bijao</i>	Aspersión a toda la planta incluyendo hoja cartucho	10 plantas
T4	Plantas totalmente podadas que sólo se dejó la hoja cartucho	Suspensión conidial 1×10^4 conidias/ml de <i>Pyricularia -arroz</i>	Depósito en hoja cartucho de 2 ml de la suspensión conidial	10 plantas
T5	Plantas no podadas	Suspensión conidial 1×10^4 conidias/ml de <i>Pyricularia -arroz</i>	Depósito en hoja cartucho de 2 ml de la suspensión conidial	10 plantas
T6	Plantas no podadas	Suspensión conidial 1×10^4 conidias/ml de <i>Pyricularia -arroz</i>	Aspersión a toda la planta incluyendo hoja cartucho	10 plantas
T7	Plantas totalmente podadas que sólo se dejó la hoja cartucho	Sin inóculo	Depósito en hoja cartucho de 2 ml agua destilada estéril	10 plantas
T8	Plantas no podadas	Sin inóculo	Depósito en hoja cartucho de 2 ml agua destilada estéril	10 plantas
T9	Plantas no podadas	Sin inóculo	Aspersión de agua destilada estéril a toda la planta incluyendo hoja cartucho	10 plantas

Cuadro 6: Tratamientos realizados en la inoculación cruzada de los aislamientos de *Pyricularia* en plantas de arroz en vivero

Tratamiento	Descripción	Inoculo	Sitio de inoculación	Repeticiones
T1	Plantas de arroz var. Feron.	Suspensión conidial 1×10^4 conidias/ml de <i>Pyricularia -bijao</i>	Aspersión a toda la planta	10 plantas
T2	Plantas de arroz var. Feron.	Suspensión conidial 1×10^4 conidias/ml de <i>Pyricularia -arroz</i>	Aspersión a toda la planta	10 plantas
T3	Plantas de arroz var. Feron.	Sin inóculo	Aspersión de agua destilada estéril a toda la planta	10 plantas

3.8. CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA FOLIAR AFECTADA EN HOJAS COMERCIALES DE “WIRA BIJAO”

Las evaluaciones de la enfermedad en campo e invernadero permitieron observar la existencia de una mayor severidad en el lado derecho de la lámina foliar, vista desde la base del haz (Figura 12); para corroborar estas observaciones, se evaluó el área foliar afectada de 270 hojas cosechadas con valor comercial para lo cual, se tomaron fotografías digitales de cada hoja con una medida conocida y se calculó el área foliar afectada por cada lado mediante el software libre Imagen J.

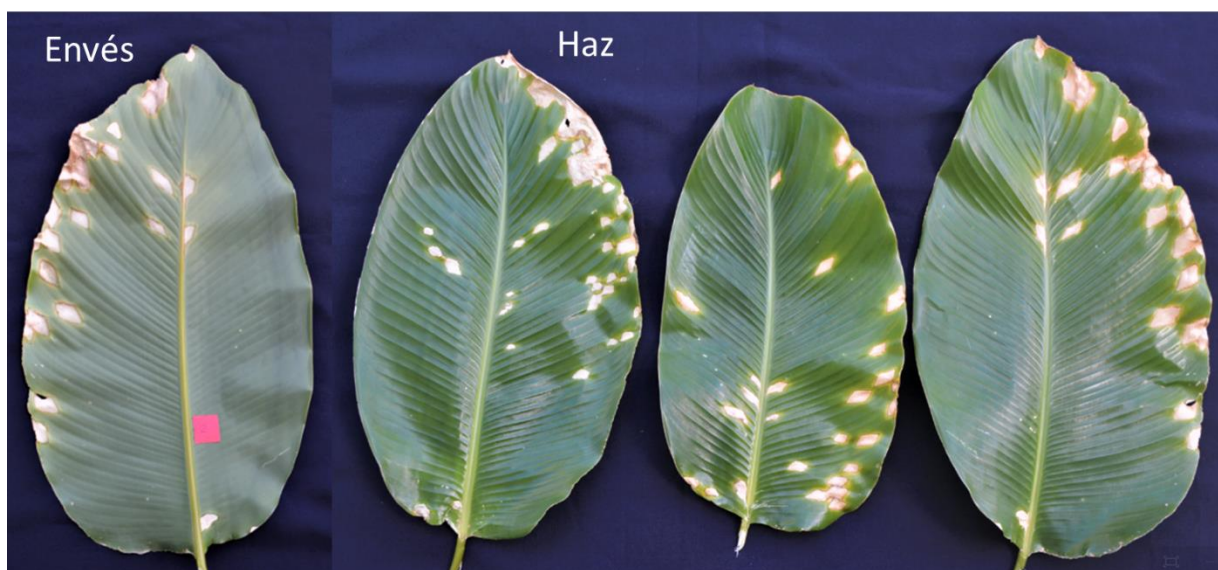


Figura 12: Intensidad de daño de *Pyricularia* en hojas maduras de *Calathea* sp. “wira bijao” vistos del envés y haz. Existe una mayor intensidad de daño en el lado derecho del foliolo visto por el haz

3.9. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Para la identificación molecular, se enviaron además del aislamiento *Pyricularia*-bijao, una muestra de un aislamiento con las mismas características morfológicas, obtenido de otra especie de *Calathea* sp. 2 “Bijao blanco”; la identificación de estos aislamientos, mediante secuenciación y análisis de distancia genética basado en fragmentos del gen 28S (región D1/D2) y el gen espaciador ribosomal (ITS) se realizó en el Laboratorio Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria - CBMAI/DRM del Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), de la Universidad Estadual de Campinas. Sao Paulo, Brasil, bajo la modalidad de servicio.

Los permisos de exportación de las muestras fueron otorgados por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR), mediante Resolución Dirección: RDG N° 000283-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS, con fecha 21 mayo 2021 (Anexo 11).

3.9.1. Muestras enviadas

Identificación de Origen (Perú)	Clave de identificación en Brasil
<p>Género: <i>Pyricularia</i> Hospedante: <i>Calathea</i> sp. 1 “wira bijao” Colector: Oscar Cabezas H. Fecha de siembra: 18/12/21 Procedencia: Leoncio Prado - Huánuco</p>	CPQBA 2629-22 DRM 01
<p>Género: <i>Pyricularia</i> Hospedante: <i>Calathea</i> sp. 2 “Bijao blanco” Colector: Oscar Cabezas H. Fecha de siembra: 18/12/21 Procedencia: Leoncio Prado - Huánuco</p>	CPQBA 2629-22 DRM 02

3.9.2. Extracción de ADN

Las muestras se subcultivaron en un medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a 28 °C. El ADN genómico de los cultivos se purificó, utilizando el protocolo de extracción de ADN con fenol (Aamir *et al.* 2015).

3.9.3. Amplificación del gen 28S:

La secuenciación de la región LSU (nuclear large subunit) también conocida como el dominio D1/D2 del extremo 5' del gen 28S del ADNr, es una de las secuencias más utilizadas en la caracterización molecular de hongos con fines de identificación, niveles taxonómicos y el análisis filogenético de poblaciones por su nivel bajo de polimorfismo en la unidad de transcripción de ADNr (O'Donnell *et al.*, 1998). Aunque la región ITS (Internal Transcribed Spacer) se ha establecido como una de las regiones estándares para la identificación de

hongos muchos otros investigadores consideran que el gen 28S; especialmente los dominios D1 y D2, son relativamente conservadas en la mayoría de los hongos y son ampliamente preferidos para los estudios de filogenia (Raja *et al.* 2017).

La amplificación de los marcadores se realizó por metodología PCR, utilizando el ADN genómico extraído como plantilla. Los cebadores (oligonucleótidos sintéticos) utilizados para la reacción de PCR fueron: NL1/NL4, complementario a la región 28S D1/D2, para las muestras CPQBA 2629-22 DRM 01 y CPQBA 2629-22 DRM 02.

3.9.4. Secuenciación

El producto de amplificación se purificó en columna (GFX PCR DNA y Gel Band purification Kit, GE Healthcare) y se sometió directamente a la secuenciación utilizando el secuenciador automático ABI 3500XL series (Applied Biosystems). Los cebadores utilizados para la secuenciación fueron NL1/NL4 e ITS1/ITS4.

3.9.5. Análisis de distancia genética

Las secuencias parciales de los genes obtenidos se ensamblaron en un consenso (secuencia de consenso única que combina los diferentes fragmentos obtenidos) y comparado con secuencias de organismos representados en bases de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y CBS (<http://www.westerdijknstitute.nl/>). Luego fueron seleccionados secuencias de microorganismos relacionados con muestra desconocida para la construcción del dendograma. Las secuencias de ADN se alinearon usando el programa CLUSTAL X (Thompson *et al.* 1997) dentro de BioEdit 7.2.6 (Hall 1999) y se realizaron análisis de distancia genética utilizando el programa MEGA versión 6.0 (Tamura *et al.* 2013). La matriz de distancia se calculó con el modelo de Kimura (1980) y la construcción del dendograma a partir de las distancias genéticas fue realizada por el Método Neighbor-Joining (Saitou y Nei 1987), con valores de arranque calculados a partir de 1000 remuestreos, utilizando el software incluido en el programa MEGA 6.0.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y CULTURAL DE *Pyricularia* sp.

4.1.1. Morfología

Observaciones microscópicas de las conídias partir de hojas de “wira bijao” y arroz presentaron color verde olivo, forma piriforme con dos septas y apéndice basal visible; mientras que, los conidióforos fueron solitarios, simples, tabicados de color pardo claro. Todas estas características corresponden a las descritas para el género *Pyricularia* por Barnett y Hunter (1972) y Ellis (1971), confirmándose la identidad del género *Pyricularia* reportado por Cabezas y Mattos (2018). Según las cuatro variaciones morfológicas de las conídias descritas en la Figura 1 por Longya *et al.* (2020), las conídias de ambos aislamientos evaluados corresponden al tipo piriforme a piriforme largo (Cuadro 11).

Las dimensiones de las conídias y conidióforos presentaron variaciones de acuerdo con la fuente de sustrato (montaje directo de tejido o medio de cultivo) de donde se obtuvieron las estructuras. En el Cuadro 7, se muestra las medidas en promedio, máximos y mínimos y la desviación estándar (DS) de las conídias y conidióforos de ambos aislamientos obtenidos directamente de tejido enfermo y de cultivos monospóricos en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y Agar-Nutritivo-Sintético (SNA). Las dimensiones de las conidias de *Pyricularia* obtenidas directamente de las hojas de “wira bijao” (27.6 μm) son en promedio 33 por ciento más grandes que las obtenidas en las hojas de arroz (20.75 μm), esa misma tendencia se observa en las dimensiones en los medios de cultivo PDA y SNA. En cambio, en las dimensiones de los conidióforos formados en “wira bijao” son 15.1 por ciento menos respecto a los formados en arroz. A juzgar por estas diferencias, podríamos afirmar que la especie asociada a “wira bijao” es diferente a la especie asociada a arroz; sin embargo, las diferencias y dimensiones morfológicas por sí solas no son concluyentes para tipificar especies nuevas o especies diferentes. Además, estas características son fuertemente afectadas por las condiciones ambientales y por el sustrato donde crecen en un determinado tiempo y espacio. El Cuadro 8, muestra el comparativo de las dimensiones de las conídias

y conidióforos de los aislamientos de *Pyricularia* sp. evaluados respecto a otros reportes de investigación realizados por Ellis (1970), Kotani y Kutara (1992) y Qi *et al.* (2019).

Cuadro 7: Dimensiones de las conídias y conidióforos de *Pyricularia* sp. obtenidas de tejido infectado de bijao y arroz y dos medios de cultivo (PDA y SNA)

		Conídias (µm)							
Aislamiento	Tejido o medio	Largo (x̄)	Mínimo	Máximo	DS	Diámetro (x̄)	Mínimo	Máximo	DS
<i>Pyricularia</i> sp. Bijao	Hoja infectada	27.60	22.23	31.12	1.51	10.74	7.95	13.27	0.84
	Medio PDA	29.21	19.53	36.41	3.72	9.74	6.13	12.97	1.28
	Medio SNA	31.94	25.64	37.22	2.70	10.33	8.48	12.26	1.02
<i>Pyricularia</i> sp. Arroz	Hoja infectada	20.75	17.61	27.03	1.95	7.98	6.46	27.03	0.61
	Medio PDA	23.84	18.36	29.19	1.99	7.96	6.13	29.19	0.75
	Medio SNA	25.40	22.87	27.81	2.02	8.48	7.43	9.40	0.81
		Conidióforos (µm)							
<i>Pyricularia</i> sp. Bijao	Hoja infectada	102.89	77.07	137.76	15.28	5.02	4.11	5.96	0.39
	Medio PDA	104.52	48.36	199.32	43.40	4.25	3.56	5.11	0.50
	Medio SNA	256.99	151.56	289.45	56.40	6.46	4.12	2.19	0.85
<i>Pyricularia</i> sp. Arroz	Hoja infectada	121.39	105.02	148.88	12.68	4.54	3.57	5.17	0.54
	Medio PDA	280.43	185.10	510.78	155.22	4.25	3.57	4.71	0.52
	Medio SNA	154.52	120.80	188.23	47.68	3.16	3.14	3.18	0.03

x̄ = Promedio SNA = Agar Sintetico Nutritivo PDA = Papa-Dextrosa-Agar DS = Desviación estándar

Cuadro 8: Comparativo de las dimensiones de las conídias y conidióforos de los aislamientos de *Pyricularia* sp. evaluados con otros reportes de investigación

Aislamiento	Tejido o medio	Conídias (µm)	Conidióforos (µm)	Fuente de información
<i>Pyricularia</i> sp. - Bijao	Hoja infectada	27.6 ± 1.51 x 10.74 ± 0.84	102.9 ± 15.28 x 5.02 ± 0.39	Evaluado
	Medio PDA	29.2 ± 3.72 x 9.74 ± 1.28	104.5 ± 43.40 x 4.25 ± 0.50	
	Medio SNA	31.9 ± 2.70 x 10.3 ± 1.02	256.9 ± 56.40 x 6.46 ± 0.85	
<i>Pyricularia</i> sp.- Arroz	Hoja infectada	20.7 ± 1.95 x 7.98 ± 0.61	121.4 ± 12.68 x 4.54 ± 0.54	Evaluado
	Medio PDA	23.8 ± 1.99 x 7.96 ± 0.75	280.4 ± 155.22 x 3.16 ± 0.03	
	Medio SNA	25.4 ± 2.02 x 8.48 ± 0.81	154.5 ± 47.64 x 3.16 ± 0.03	
<i>P. grisea</i>	No precisa	20.9 (17-28) x 7.6 (6-8)	> 150 x 2.5 - 4.5	Ellis (1970)
<i>P. oryzae</i>		21.2 (17-23) x 9.6 (8-11)	> 130 x 3 - 4	
<i>P. grisea</i>	No precisa	29.06 ± 1.20 x 8.49 ± 0.31	s/i	Qi et al. (2019)
<i>P. oryzae</i>		23.57 ± 0.78 x 8.77 ± 0.27	s/i	
<i>Pseudolaria calatheae</i>	No precisa	18-36 x 5-7.0	36-170 x 4-5.5	Soares et al. (2011)
<i>Barretomyces calatheae</i> (= <i>Pseudopyricularia calatheae</i>)	Medio SNA	28-32 (19-35) x 6-7 (5.5-8)	70-160 x 4-6 µm	Klaubauf et al. (2014)
<i>Pyricularia</i> sp.	Potato Carrot Agar (PCA)	18.2 (12.9-22.8) x 7.2 (5.7-8.0)	s/i	Kotani y Kutara (1992)
<i>P. zingiberi</i> (SZZO)		17.5 (14.3-22.2) x 7.0 (4.9-8.6)	s/i	
<i>P. zingiberi</i> (FOZIM)		20.2 (15.4-30.7) x 6.8 (5.1-7.7)	s/i	

PDA = Papa-Dextrosa-Agar

SNA = Agar Nutritivo Sintetico

s/i = Sin información

Por las dimensiones de las conídias reportadas por Ellis (1970), el género *Pyricularia* que infecta a “wira bijao” no podría ser asociado a las especies de *P. grisea* y *P. oryzae*; sin embargo, según el reporte de Qi *et al.* (2019), se trataría de *P. grisea*. Dutta *et al.* (2019) al caracterizar a *Pyricularia grisea* como agente causal del quemado del arroz, encontraron que

las conídias formadas en las hojas tenían mayor tamaño en relación a las formadas en los granos. Las medidas reportadas en las hojas ($17.96 - 26.64 \times 7.36 - 9.22 \mu\text{m}$; promedio $22.42 \times 8.59 \mu\text{m}$) son similares a los encontrados en las hojas para *Pyricularia*-arroz (Cuadros 7 y 8).

Especies de *Pyricularia* o géneros con características morfológicas semejantes a ella han sido reportados en diferentes especies de la familia Marantaceae. Pappas y Paplomatas (1998), describieron a *P. oryzae* como agente causal de manchas foliares en *Calathea amabilis* y *C. ornata*, mientras que Soares *et al.* (2011) describieron a *Pyriculariopsis calathae* como nueva especie (sp. nov.) en *Calathea longifolia*. Esta nueva especie fue renombrada por Klaubauf *et al.* (2014) a *Barretomyces calathae* por formar un clado diferente a *Pyricularia*. Las características y dimensiones morfológicas de *B. calathae* (= *Pyriculariopsis calathae*), mostradas en el Cuadro 8, en medio SNA son diferentes a los encontrados para el supuesto género de *Pyricularia* aislado de Bijao (Cuadros 7 y 8).

El aislamiento *Pyricularia* – bijao respecto a *Pyricularia grisea* y *P. oryzae* podría considerarse como una especie críptica, que según Struck *et al.* (2018), se define como a taxones que no pueden diferenciarse morfológicamente; sin embargo, ellas se diferencian genéticamente y se encuentran en diferentes etapas evolutivas. Jörger *et al.* (2013), sugieren que para describir especies crípticas debe considerarse como la columna vertebral de la descripción el análisis filogenético mediante el uso de técnicas moleculares.

4.1.2. Características culturales

a. Efecto de los medios de cultivo en el RCM y tasa micelial por día

Los medios de cultivo influyen de manera significativa en el ritmo de crecimiento micelial (RCM) y tasa de crecimiento micelial por día en los dos aislamientos de *Pyricularia* evaluados. En los Cuadros 9 y 10, se muestran los valores de la media y su significancia por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), los valores máximos y mínimos del ritmo de crecimiento diario, la desviación estándar (DS) y la tasa de incremento micelial centímetros por día. Longya *et al.* (2020), reportaron que el promedio de ritmo de crecimiento micelial de 59 aislamientos de *P. oryzae* fue de 0.538 cm/día en medio de cultivo RFA (de sus siglas en inglés Agar harina de arroz); mientras que Priya *et al.* (2013), mencionan un RMC de 0.625 en medio PDA y 0.5 cm/día en Agar arroz. Estos valores están dentro del rango de RCM

obtenido para *Pyricularia*-arroz (Cuadro 9) y son al menos 1.7 veces más al valor de RCM obtenidos para *Pyricularia*-bijao en medios semejantes a RFA (Cuadro 10).

Cuadro 9: Efecto de medios de cultivo sobre el ritmo de crecimiento micelial (RCM) y tasa de incremento micelial por día en el aislamiento de *Pyricularia* de arroz

Medios de cultivo a pH 6.0	RCM Aislamiento de <i>Pyricularia</i> sp. de Arroz/día					
	Media (cm)	Tukey ($\alpha=0.05$)	Mínimo (cm)	Máximo (cm)	DS	Tasa
PDA+50HA (Papa-Dextrosa-Agar + 50 g harina de arroz)	0.685	a	0.634	0.694	0.031	0.725
JV8-Cac (Jugo V8 Casero)	0.661	a	0.631	0.691	0.011	0.692
BjDA (Bijao-Dextrosa-Agar)	0.685	a	0.655	0.714	0.012	0.758
PDA (Papa-Dextrosa-Agar)	0.660	a	0.630	0.689	0.026	0.734
OMA (Agar Avena)	0.583	b	0.554	0.613	0.009	0.669
PDA+Bj (Papa-Dextrosa-Agar + 50 g hoja de Bijao)	0.579	b	0.550	0.609	0.075	0.662
A. Agua (Agar-Agua)	0.342	c	0.312	0.371	0.014	0.406
SNA (Agar Nutriente Sintetico)	0.268	d	0.238	0.298	0.050	0.324

RCM = Ritmo de crecimiento micelial. Tukey: Letras en el mismo orden no difieren estadísticamente. DS = Desviación estandar

Cuadro 10: Efecto de medios de cultivo sobre el ritmo de crecimiento micelial (RCM) y tasa de incremento micelial por día en el aislamiento de *Pyricularia* de bijao.

Medios de cultivo a pH 6.0	RCM Aislamiento de <i>Pyricularia</i> sp. de Bijao/día					
	Media (cm)	Tukey ($\alpha=0.05$)	Mínimo (cm)	Máximo (cm)	DS	Tasa
PDA+50HA (Papa-Dextrosa-Agar + 50 g harina de arroz)	0.386	a	0.374	0.398	0.016	0.451
JV8-Cac (Jugo V8 Casero)	0.385	a	0.372	0.397	0.011	0.439
BjDA (Bijao-Dextrosa-Agar)	0.379	a	0.367	0.391	0.119	0.431
PDA+Bj (Papa-Dextrosa-Agar + 50 g hoja de Bijao)	0.361	a	0.349	0.373	0.014	0.427
OMA (Agar Avena)	0.324	b	0.311	0.336	0.012	0.381
PDA (Papa-Dextrosa-Agar)	0.282	c	0.270	0.294	0.014	0.315
AA(Agar Agua)	0.107	d	0.095	0.119	0.021	0.119
SNA (Agar Nutriente Sintetico)	0.061	e	0.049	0.073	0.010	0.068

RCM = Ritmo de crecimiento micelial. Tukey: Letras en el mismo orden no difieren estadísticamente. DS = Desviación estandar

Dutta *et al.* (2019), determinaron que el crecimiento micelial de *Pyricularia grisea* en medio PDA, OMA y Agar arroz seis días después de la incubación el RMC fue de 1.18, 1.19 y 0.99 cm/día respectivamente. Estos valores son mayores a los obtenidos para los dos aislamientos evaluados en este trabajo. Los medios pobres en nutrientes como Agar agua y SNA (de sus siglas en ingles Agar pobre en nutrientes) retardan significativamente su RCM y tasa de incremento micelial en centímetros por día (Cuadros 9 y 10). Las Figuras 13 y 14, muestran el crecimiento y tasa de incremento micelial de *Pyricularia*-bijao y *Pyricularia*-arroz sobre diferentes medios de cultivo, determinándose que el aislamiento de *Pyricularia*-arroz tiene

una tasa de 1.5 a 4.6 veces respecto a *Pyricularia*-bijao, lo que sugeriría la presencia de dos especies o razas diferentes.

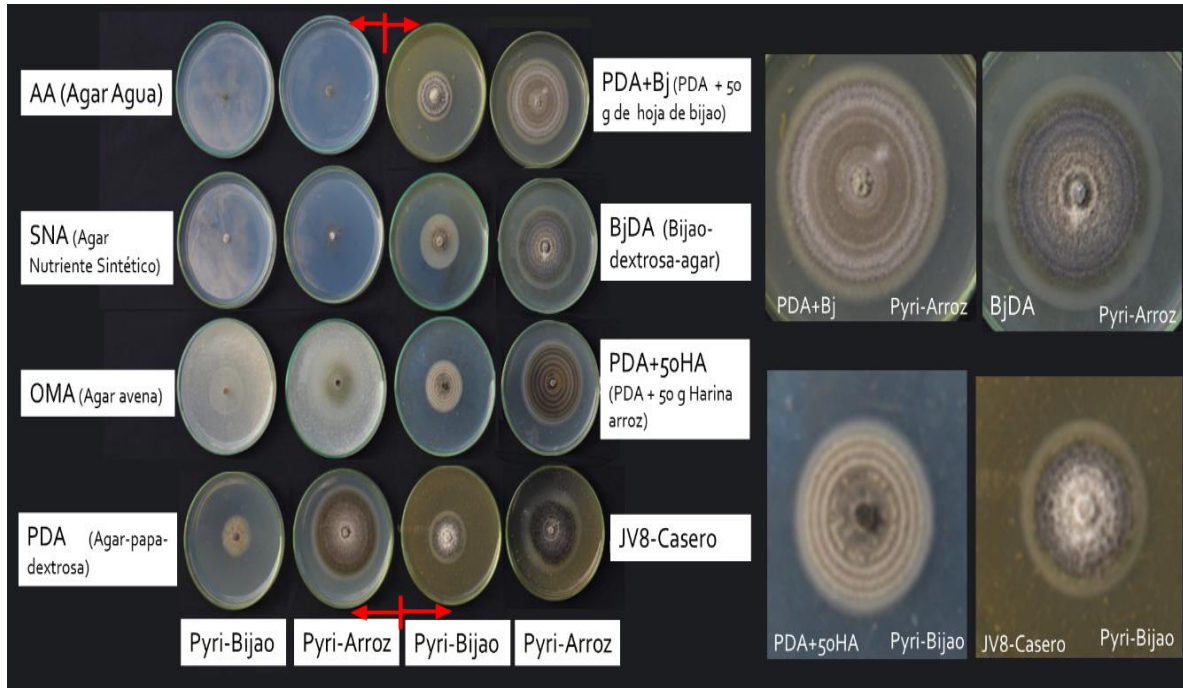


Figura 13: Crecimiento micelial de *Pyricularia*-bijao y *Pyricularia*-arroz sobre diferentes medios de cultivo

Hussin *et al.* (2019) reportaron que la tasa de incremento micelial de 12 aislamientos de *Pyricularia oryzae* en dos medios de cultivo (OMA y PDA) osciló entre 0.32 a 0.44 cm/día, valores que son mayores a los obtenidos para el aislamiento *Pyricularia*-bijao (Figura 14 A); mientras que, el aislamiento *Pyricularia*-arroz alcanza valores de 2.3 y 1.8 veces más en los medios OMA y PDA respectivamente (Figura 14 B).

Considerando los valores de RCM de los aislamientos de *P. oryzae* reportados por Longya *et al.* (2020) en Tailandia correspondería al aislamiento de *Pyricularia*-arroz; mientras que, respecto a la tasa reportada por Hussin *et al.* (2019) evaluados en Malasia, correspondería al aislamiento de *Pyricularia*-bijao; estas diferencias podrían atribuirse a la procedencia geográfica, rango de hospedantes y la existencia de muchas razas. Ou (1980) determinó la ocurrencia de hasta 250 razas en Filipinas y Correa-Victoria y Zeigler (1993) 45 razas de *P. grisea* en Colombia.

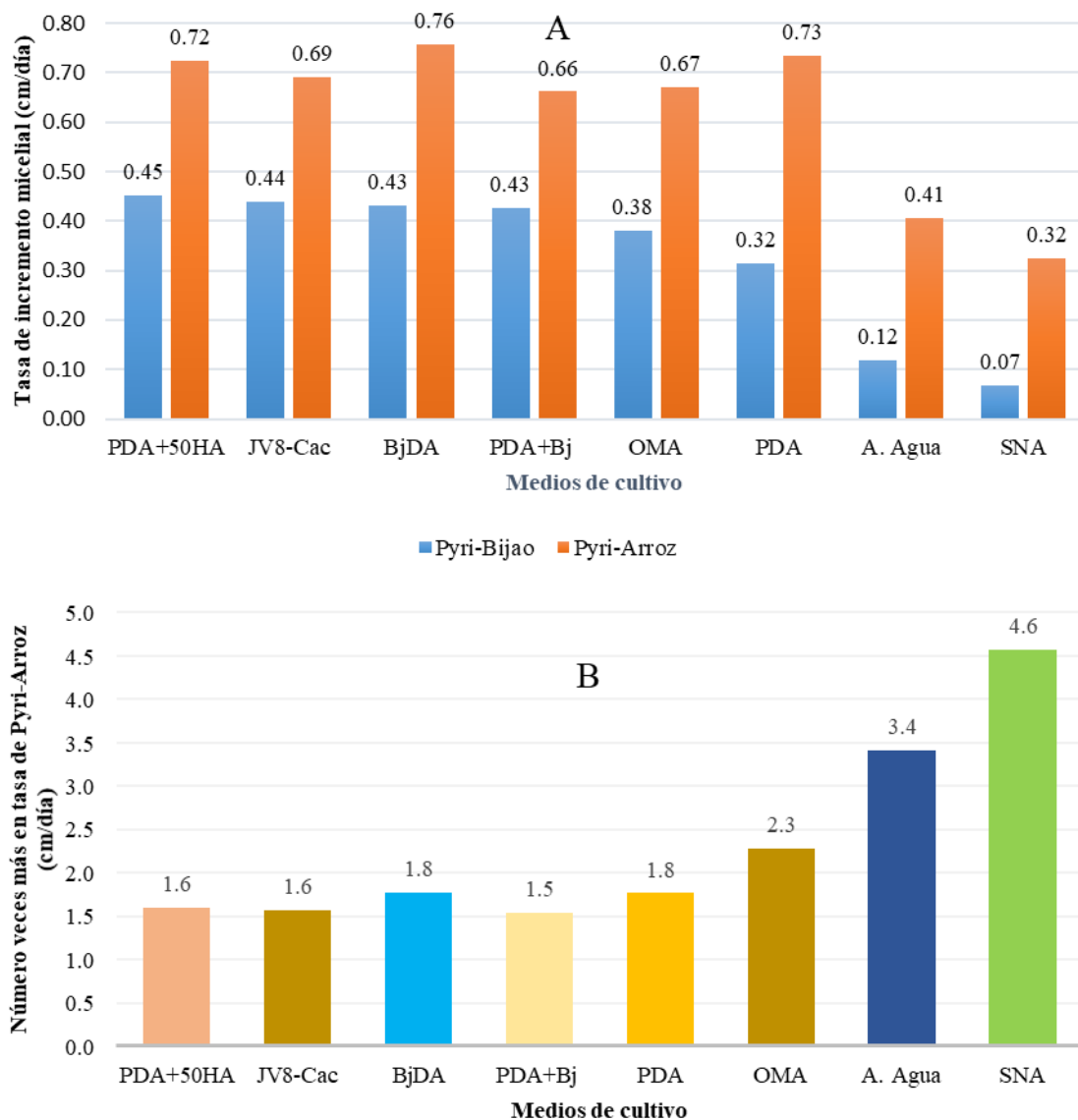


Figura 14: Tasa incremento micelial de los aislamientos *Pyricularia*-bijao y *Pyricularia*-Arroz (A) y número de veces más de la tasa de incremento micelial de *Pyricularia*-arroz respecto a *Pyricularia*-bijao (B)

b. Morfología de las conídias

La forma de las conídias de los dos aislamientos observadas bajo el microscopio (Figura 15) coinciden con la forma piriforme alargado de los cuatro patrones descritos (Figura 2) por Longya *et al.* (2020); asimismo, refieren que de los 59 aislamientos de *P. oryzae* el 77.9 por ciento poseía conídias de forma piriforme, el 6.8 por ciento conídias piriformes cortos, 13.6

por ciento conídias piriformes largos y sólo 1.7 por ciento produjo conídias de forma ovalada.

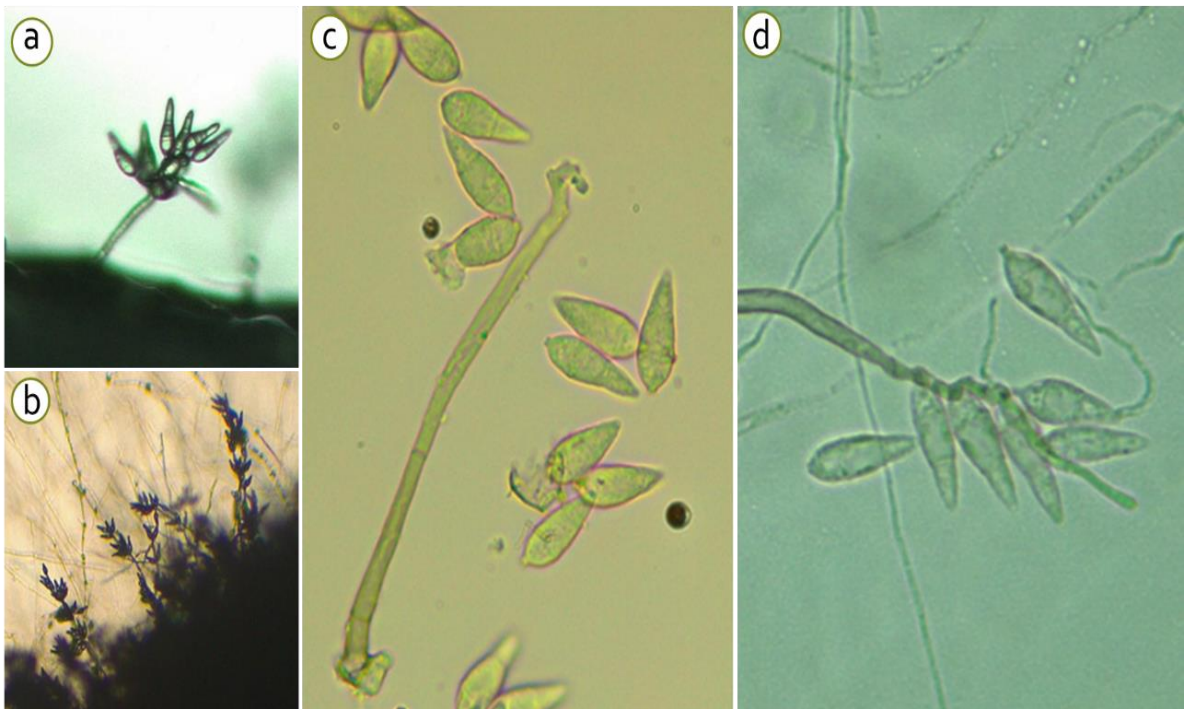


Figura 15: Forma de las conídias de *Pyricularia-bijao* (a, b y c) y *Pyricularia-arroz* (d) en medio de cultivo PDA + 50 g de harina de arroz

c. Forma de crecimiento de las colonias

Las características del desarrollo de la colonia micelial a partir del disco de siembra, intensidad de producción de melanina en el medio de cultivo y la forma de las conídias de los dos aislamientos, son descritos en el Cuadro 10. Para el cual se emplearon las escalas descriptivas (Figuras 3 y 4) desarrolladas por Nartimov *et al.* (2021) y Longya *et al.* (2020). Estas características tuvieron ligeras variaciones influenciadas por el tipo de medio de cultivo (Figuras 13 y 16), condición de luz (Figura 17) y pH (Figura 19); sin embargo, la característica de mayor prevalencia para ambos aislamientos fue la naturaleza de crecimiento de la colonia en forma concéntrica formando anillos abultados de diámetro uniforme (Figuras 13, 16, 17 y 19) descritas por Nartimov *et al.* (2021). El color del micelio (Figura 4) descritos por Longya *et al.* (2020), tienen marcadas diferencias con los dos aislamientos evaluados. El color en *Pyricularia-bijao* varía de un gris-negro a crema rojizo, mientras que *Pyricularia-arroz* varió de gris-negro a marrón rojizo (Figura 15), ambos evaluados en medio

PDA+50g de harina de arroz; estas características coinciden a algunos de los nueve morfotipos descritos por Dubina *et al.* (2020) para 57 aislamientos evaluados en el sur de Rusia. La intensidad en la producción de melanina de ambos aislamientos fue mucho más del 80 por ciento de lo reportado por Longya *et al.* (2020) (Cuadro 11). Howard y Ferrari (1989), manifiestan que *P. oryzae* produce abundante melanina el cual es esencial para la infección por medio del apresorio en el arroz. La melanina es un metabolito secundario y no es una toxina.

Cuadro 11: Características del micelio, producción de melanina y forma de las conidias de *Pyricularia* sp. aislados de hojas de bijao y arroz

Aislamiento	Forma del Micelio en la colonia	Producción de Melanina en medio ³	Forma de la conidia ¹
<i>Pyricularia</i> - bijao	<u>Color¹: gris, negro a crema rojizo</u>	Mayor al 80%	Piriforme a piriforme largo
	<u>Crecimiento¹: plano</u>		
	<u>Naturaleza²: generalmente concéntrico</u>		
	<u>Estructura²: esponjoso, fieltro, polvoriento y grumoso</u>		
	<u>Relieve²: abultado en anillos</u>		
<i>Pyricularia</i> - arroz	<u>Color¹: gris, negro a marrón rojizo</u>	Mayor al 50%	Piriforme a piriforme largo
	<u>Crecimiento¹: plano</u>		
	<u>Naturaleza²: predominantemente concéntrico</u>		
	<u>Estructura²: esponjoso y polvoriento escaso</u>		
	<u>Relieve²: abultado en anillos</u>		

¹ Longya et al.(2020).

² Nartymov et al. (2021).

³ Medio PDA y PDA+50g de harina de arroz

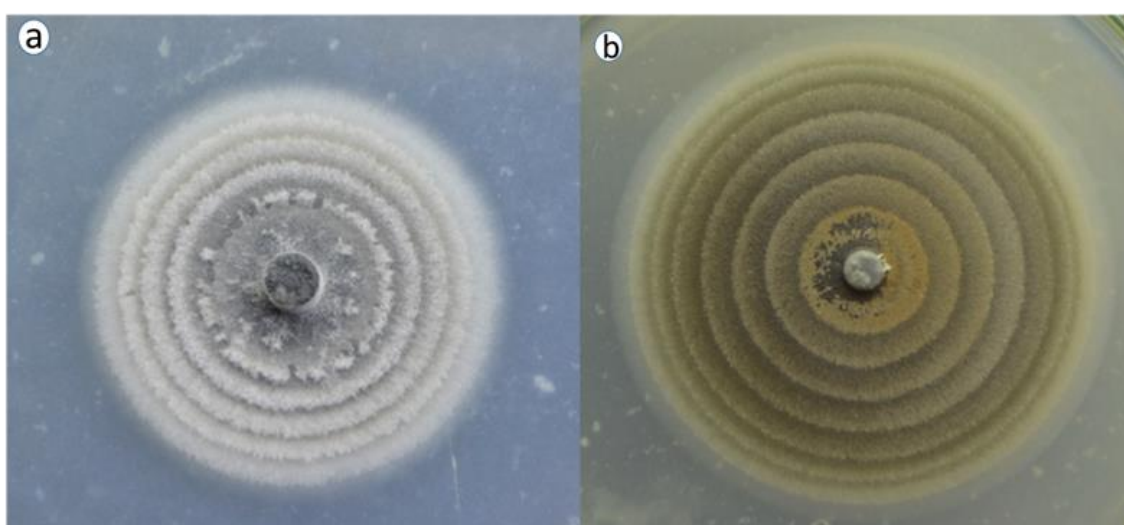


Figura 16: Forma y color del crecimiento micelial de *Pyricularia*-Bijao (a) y *Pyricularia*-Arroz (b) en medio PDA+50g de harina de arroz

d. Efecto de las condiciones luz en el RCM y Tasa de incremento micelial

Las condiciones de luz influyen de manera diferenciada y significativa en el ritmo de crecimiento micelial (RCM) y tasa de incremento de ambos aislamientos. Para el aislamiento *Pyricularia*-bijao, la luz alterna afecta significativamente estos dos factores, mientras que, para el aislamiento *Pyricularia*-arroz, la luz continua es la que afecta a ambos parámetros evaluados (Cuadro 12 y Figura 17). Da Cruz (2009), determinó que el régimen de luz continúa, duplicó la producción de conidias en *P. grisea*. Esto, podría estar relacionado al estrés causado por la constante intensidad lumínica, que provocaría un mayor resecamiento del medio de cultivo, induciendo al hongo a generar un número una mayor esporulación.

Cuadro 12: Efecto de la condición de luz sobre el ritmo de crecimiento micelial (RCM) y tasa de incremento micelial (cm/día) de los aislamientos de *Pyricularia* de bijao y arroz

Condición	Aislamiento de <i>Pyricularia sp.</i> de Bijao						Aislamiento de <i>Pyricularia sp.</i> de Arroz					
	Media (cm) ¹	Tukey ($\alpha=0.05$) ¹	Mínimo (cm) ¹	Máximo (cm) ¹	DS ¹	Tasa	Media (cm) ¹	Tukey ($\alpha=0.05$) ¹	Mínimo (cm) ¹	Máximo (cm) ¹	DS ¹	Tasa
Luz continua	0.370	a	0.346	0.394	0.0170	0.4255	0.610	b	0.588	0.633	0.0512	0.6540
Oscuridad	0.359	a	0.335	0.383	0.1920	0.4205	0.658	a	0.635	0.681	0.0148	0.7254
Luz alterna	0.306	b	0.282	0.330	0.0597	0.3565	0.625	ab	0.602	0.647	0.0279	0.6939

¹ = Valores de ritmo de crecimiento (RC) micelial Tukey: Letras en el mismo orden no difieren estadísticamente. DS = D. estandar

e. Efecto del pH en el RCM y tasa de incremento micelial

Los diferentes niveles de pH influyen de manera significativa solo para el aislamiento *Pyricularia*-bijao; en cambio, para el aislamiento *Pyricularia*-arroz, no hay diferencias en el ritmo de crecimiento micelial (RCM) y tasa de incremento micelial en medio PDA (Cuadro 13 y Figura 18). Finalmente, el efecto del pH en el RCM y tasa evaluada en *Pyricularia*-bijao es casi dos veces menor respecto al registrado en *Pyricularia*-arroz.

Dutta *et al.* (2019) mencionan que una condición ligeramente ácida a neutra (pH 6 - pH 7) es ideal para el crecimiento micelial de *Pyricularia grisea* aislado de arroz en Bengala, India. El RCM calculado de 1.06, 1.21 y 0.82 cm/día a niveles de pH 5, 6 y 10 respectivamente; estos valores duplican y cuadruplican a los valores encontrados para los aislamientos *Pyricularia*-bijao y arroz (Cuadro 13 y Figuras 18 y 19).

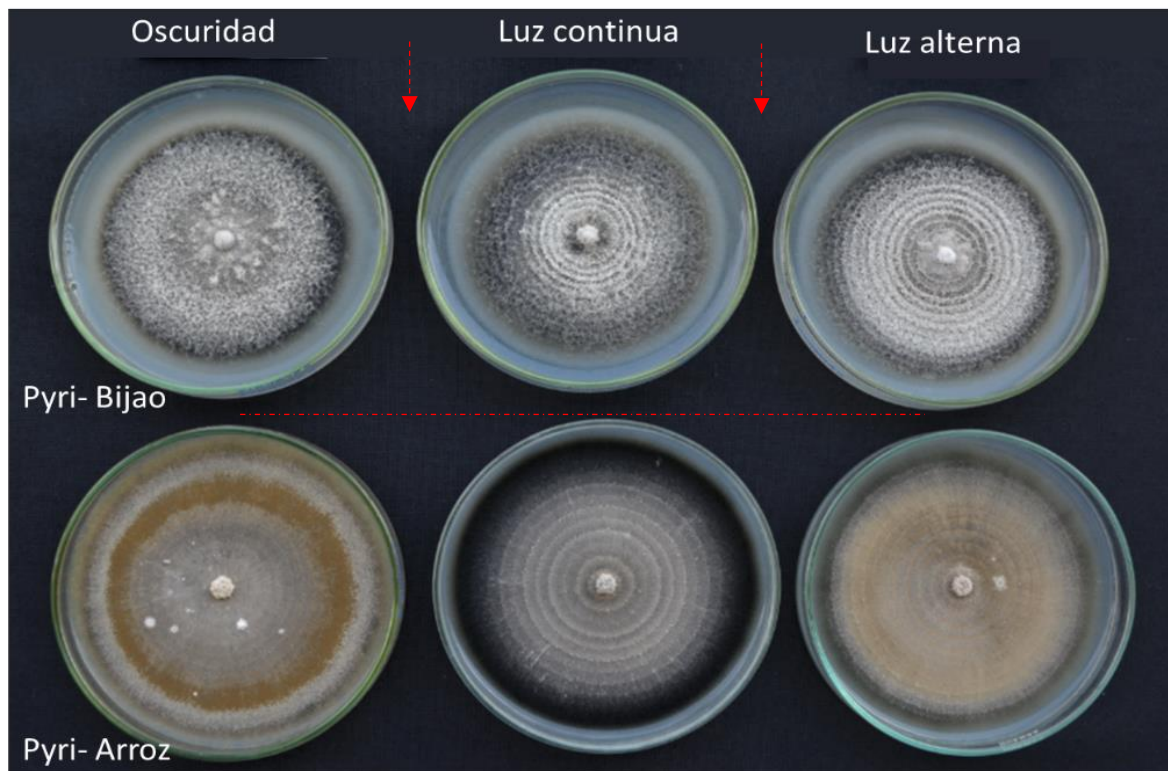


Figura 17: Efecto de las condiciones oscuridad, luz continua y luz alterna en el crecimiento micelial de *Pyricularia-bijao* y *Pyricularia-arroz* en medio PDA

Cuadro 13: Efecto del pH sobre el ritmo de crecimiento micelial (RCM) y tasa de incremento micelial en los aislamientos de *Pyricularia* de bijao y arroz

Niveles de pH	RCM Aislamiento de <i>Pyricularia sp.</i> de Bijao (cm/día)						RCM Aislamiento de <i>Pyricularia sp.</i> de Arroz (cm/día)					
	Media (cm)	Tukey ($\alpha=0.05$)	Mínimo (cm)	Máximo (cm)	DS	Tasa	Media (cm)	Tukey ($\alpha=0.05$)	Mínimo (cm)	Máximo (cm)	DS	Tasa
pH 6.0	0.323	a	0.314	0.332	0.0027	0.3443	0.620	a	0.593	0.593	0.0341	0.6796
pH 5.5	0.320	ab	0.311	0.329	0.0061	0.3482	0.663	a	0.636	0.691	0.0216	0.7216
pH 6.5	0.316	abc	0.307	0.325	0.3160	0.3486	0.675	a	0.648	0.702	0.0176	0.7552
pH 9.0	0.311	abc	0.302	0.320	0.0082	0.3472	0.630	a	0.603	0.657	0.0063	0.7167
pH 4.5	0.304	abc	0.295	0.313	0.0201	0.3243	0.633	a	0.606	0.661	0.0484	0.6776
pH 7.5	0.301	abc	0.292	0.310	0.0139	0.3298	0.650	a	0.623	0.677	0.0276	0.7380
pH 7.0	0.299	bc	0.290	0.308	0.0096	0.3223	0.672	a	0.644	0.699	0.0402	0.7380
pH 8.0	0.299	bc	0.290	0.308	0.0065	0.3259	0.657	a	0.629	0.684	0.0258	0.7336
pH 5.0	0.295	c	0.286	0.304	0.0061	0.3289	0.655	a	0.636	0.691	0.0509	0.7364
pH 8.5	0.295	c	0.286	0.304	0.0079	0.3182	0.655	a	0.628	0.682	0.0327	0.7382
pH 4.0	0.171	d	0.162	0.180	0.0143	0.1740	No fue posible evaluar					

RCM = Ritmo de crecimiento micelial. Tukey: Letras en el mismo orden no difieren estadísticamente. DS = D. estandar

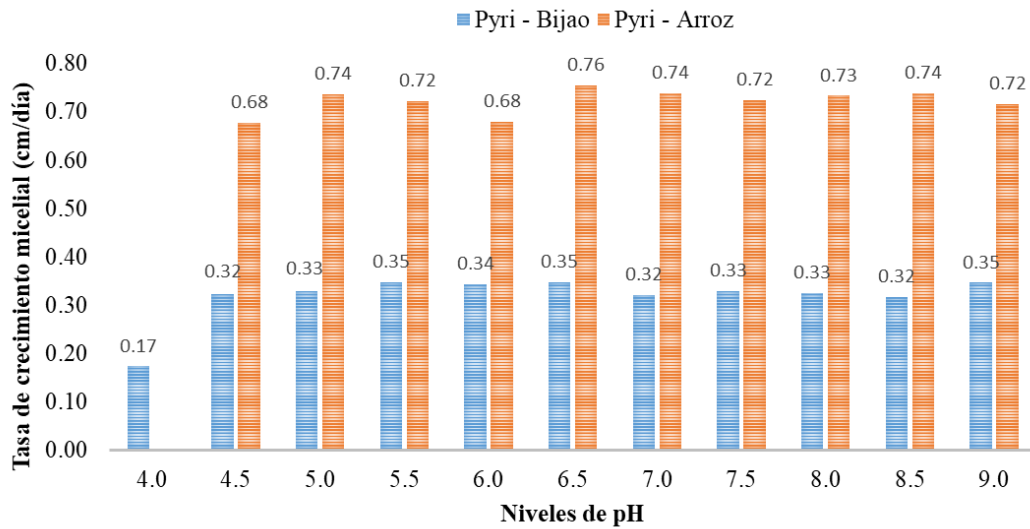


Figura 18: Efecto del pH en la tasa de crecimiento micelial de los aislamientos de *Pyricularia-bijao* (a) y *Pyricularia-arroz* (b) en medio PDA

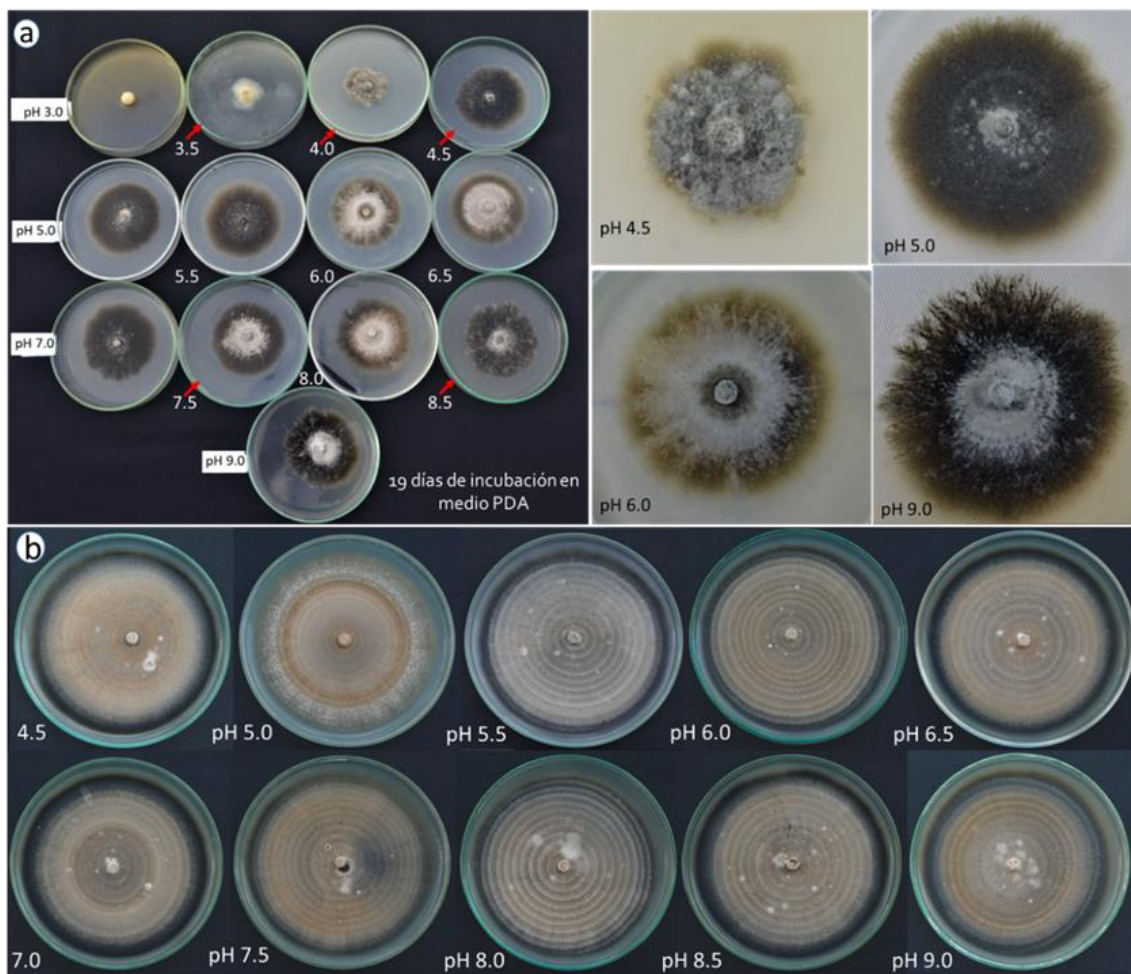


Figura 19: Efecto del pH en crecimiento micelial de los aislamientos de *Pyricularia-bijao* (a) y *Pyricularia-arroz* (b) a los 19 días después de incubación en medio PDA

Las escasas diferencias morfológicas y la fuerte influencia de los niveles de pH, condiciones de luz y diferentes medios de cultivo en el ritmo de crecimiento micelial, tasa, producción de melanina en el medio, color del micelio de *Pyricularia* aislado de “wira bijao” respecto al aislado de arroz indicarían la expresión de genes específicos que son empleados para la construcción de árboles filogenéticos (Klaubauf et al. 2014 y Kemmuk, 2016)

4.2. ENSAYOS DE PATOGENICIDAD

4.2.1. Estandarización de un método de inoculación

De los 14 métodos de inoculación del aislamiento de *Pyricularia*-bijao sobre hojas extraídas o presentes en sus respectivas plantas (Cuadro 14), dieron positivo a infección solo cuando se realiza la aspersion o depósito de la suspensión conídial en la parte externa o interna de la hoja cartucho en *Calathea* sp. “wira bijao”; en cambio, *Pyricularia*-arroz causó infección tanto sobre hojas destacadas como en hojas presentes en plantas, para el caso del arroz similares resultados han sido obtenidos por Pappas and Vloutoglou (1996), Pappas y Paplomatas, (1998) y Dubina *et al.* (2020). En lo sucesivo, para todos los ensayos de patogenicidad con el aislamiento de *Pyricularia*-bijao, se realizaron mediante el depósito de 1 a 2 ml de una suspensión concentrada de 1×10^4 conídias/ml en las hojas cartucho formadas en las plantas. El tiempo que requiere una hoja cartucho desde que es visible hasta que esté completamente extendida es de 10 a 12 días y es el periodo de máxima susceptibilidad para esta enfermedad.

4.2.2. Inoculación cruzada del aislamiento *Pyricularia*-bijao en plantas de “wira bijao” y arroz

Una vez determinado que el método de inoculación más eficiente para “wira bijao” es mediante el depósito de la suspensión conídial sobre las hojas cartucho (Cuadro 14, método 13), se realizaron todas las inoculaciones bajo esta modalidad.

Los síntomas desarrollados por el aislamiento *Pyricularia*-bijao en el envés y haz de las hojas inoculadas, pueden ser descritos de la manera siguiente: inicialmente en el envés de las hojas se aprecian puntos húmedos o aceitosos a los 3 a 4 días después de la inoculación

Cuadro 14: Métodos de inoculación de estructuras infectivas de *Pyricularia*-bijao y *Pyricularia*-arroz sobre hojas y plantas de “wira bijao” y arroz

N°	Métodos de inoculación	Hoja destacada en cámara húmeda		Hoja presente en planta (Vivero)	
		Wira Bijao	Arroz	Wira Bijao	Arroz
1	Inoculación de discos de micelio y conidias <i>Pyricularia</i> -bijao sobre el haz de la hoja	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Inoculación de discos de micelio y conidias <i>Pyricularia</i> -bijao sobre el envés de la hoja	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Inoculación de discos de micelio y conidias <i>Pyricularia</i> -arroz sobre el haz de la hoja	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
4	Inoculación de discos de micelio y conidias <i>Pyricularia</i> -arroz sobre el envés de la hoja	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
5	Inoculación por aspersión conidial de <i>Pyricularia</i> -bijao sobre el haz de la hoja	Negativo	Negativo	No realizado	No realizado
6	Inoculación por aspersión conidial de <i>Pyricularia</i> -bijao sobre el envés de la hoja	Negativo	Negativo	No realizado	No realizado
7	Inoculación por aspersión conidial de <i>Pyricularia</i> -arroz sobre el haz de la hoja	Negativo	Positivo	No realizado	No realizado
8	Inoculación por aspersión conidial de <i>Pyricularia</i> -arroz sobre el envés de la hoja	Negativo	Positivo	No realizado	No realizado
9	Gotas de suspensión conidial de <i>Pyricularia</i> -bijao sobre el envés de la hoja	Negativo	No realizado	No realizado	No realizado
10	Gotas de suspensión conidial de <i>Pyricularia</i> -bijao sobre el haz de la hoja	Negativo	No realizado	No realizado	No realizado
11	Colocación de una suspensión conidial de <i>Pyricularia</i> -bijao en banda	Negativo	No realizado	No realizado	No realizado
12	Colocación de una suspensión conidial de <i>Pyricularia</i> -bijao en banda	Negativo	No realizado	No realizado	No realizado
13	Inoculación de una suspensión conidial de <i>Pyricularia</i> -bijao en la hoja cartucho de wira bijao	No aplicable	No aplicable	Positivo	No aplicable
14	Inoculación de una suspensión conidial de <i>Pyricularia</i> -arroz en la hoja cartucho de wira bijao	No aplicable	No aplicable	Positivo	No aplicable

Negativo = Sin infección. Positivo = Infección. No realizado = Método de inoculación no aplicado.

No aplicable = La hoja no sobrevive o no se forma en la planta

Hoja destacada = Hoja extraída de la planta y acondicionada en cámara húmeda.

(Figuras 20 a y b); a medida que aumenta en diámetro (1 a 2 mm) aparecen en el centro puntos necróticos que son visibles tanto en el envés como en el haz (Figuras 20 c, d y e). Las manchas necróticas de 2 a 3 mm de diámetro se unen y forman grandes áreas necróticas que causan la muerte total de la hoja (Figuras 20 f y g).

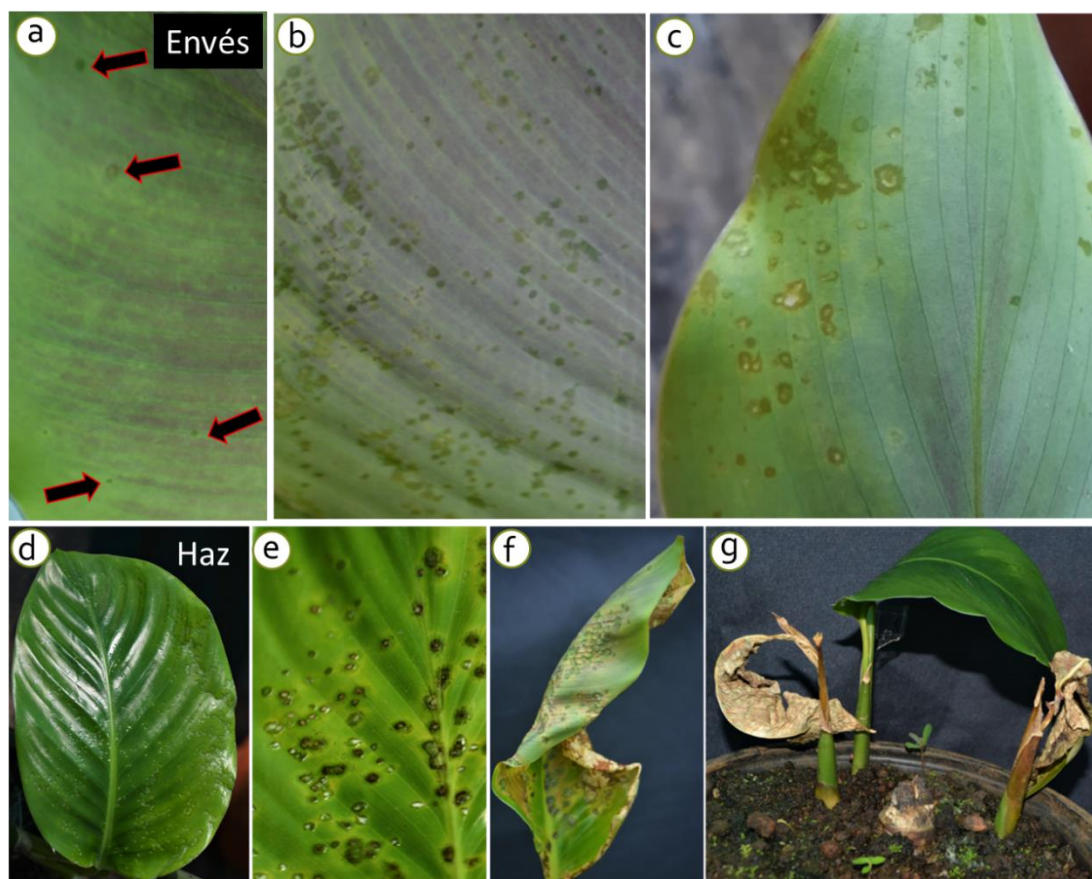


Figura 20: Síntomas desarrollados por *Pyricularia-bijao* en el envés (a, b y c) y el haz (d, e, f y g) de las hojas inoculadas al estado cartucho en plantas de “wira bijao”

En cambio, los síntomas desarrollados en campo o invernadero por infección o inoculación natural son notablemente diferentes; en este caso, los síntomas se inician con puntos húmedos en el envés, que van alcanzando diámetros variables de 0.5 a 1 cm, en el centro de las manchas aceitosas, se inicia el proceso de necrosamiento que a medida se desarrolla va adoptando formas romboides. Las manchas necróticas siempre están rodeadas de un halo húmedo y esta a su vez de un halo clorótico (Figuras 21 a y b). El crecimiento de la mancha necrótica se produce en anillos (Figura 21 c) cuyas dimensiones en estado avanzado varían de 1.2 a 3.2 cm de diámetro. Es una constante que el mayor número de manchas foliares se

presenta en el lado derecho de las hojas cuando son vistas desde la base en el haz (Figuras 12, 21-d y 25).

El necrosamiento total de una hoja, no ocurre bajo condiciones de inóculo natural; tanto en invernadero o campo puesto que el número de sitios de infección se restringen de 1 a 20 manchas necróticas por hoja (Figura 21 d), que pueden mantenerse aisladamente o coalescer para formar manchas necróticas extensas que abarcan hasta el 50 por ciento de la lámina foliar. Fujita *et al.* (1994), demostraron que las toxinas que se liberan durante la germinación de las conídias, son los responsables de tales síntomas.

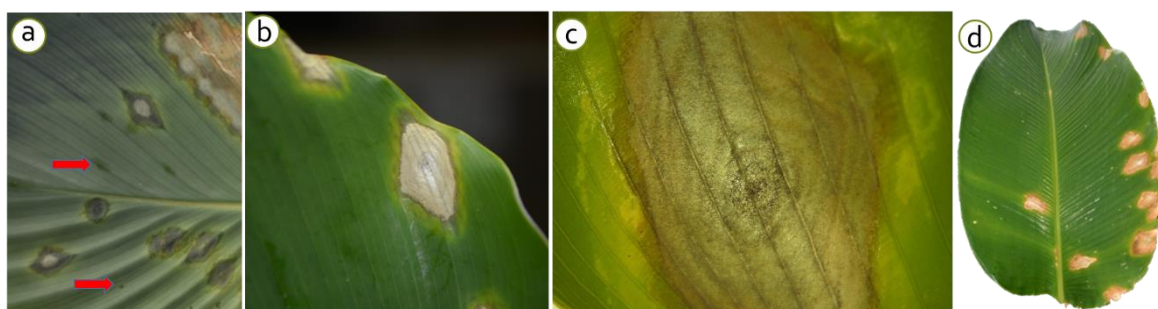


Figura 21: Síntomas desarrollados por infección natural en campo en hojas de “wira bijao”

En los ensayos de inoculación cruzada del asilamiento *Pyricularia*-bijao a las plantas de arroz, solo se realizó el método de inoculación por aspersión a toda la planta, mientras que, a las plantas de “wira bijao” se aplicaron bajo dos métodos: (i) depósito en la hoja cartucho (Figuras 22 a y c) y (ii) aspersión en toda la planta con presencia de hoja cartucho (Figura 22 d). El depósito de la suspensión conídial en la hoja cartucho se realizó en dos tipos de plantas: (a) planta en el que se podó todas las hojas y solo se dejó la hoja cartucho (Figura 22 b) y (b) planta no podada (Figura 22 c). Todas las hojas cartucho inoculadas por depósito o por aspersión desarrollaron síntomas de la enfermedad; sin embargo, la intensidad de la enfermedad fue mucho mayor en las hojas cartucho inoculadas por el método de depósito (Figuras 22 b y c). La intensidad de la enfermedad es menor cuando se realiza la aspersión en las hojas cartucho (Figura 22 d); asimismo, la infección es mínima o inexistente en hojas completamente extendidas (Figura 22 d), estos resultados corroboran los obtenidos en los ensayos de inoculación en hojas destacadas (Cuadro 14). Las plantas de arroz no mostraron ningún síntoma visible (Figura 22 a), lo cual indicaría que el aislamiento *Pyricularia*-bijao no tiene capacidad de infección en arroz.

4.2.3. Inoculación cruzada del aislamiento *Pyricularia*-arroz en plantas de “wira bijao” y arroz

Como se vio en el Cuadro 14, las inoculaciones cruzadas con el aislamiento *Pyricularia*-arroz tuvo capacidad de infección en todos los métodos de inoculación en las hojas de arroz (destacadas o en planta). Asimismo, se observó desarrollo de síntomas en al menos el 20 por ciento de las plantas de “wira bijao” inoculadas, los síntomas desarrollados fueron leves produciéndose de 1 a 4 lesiones en los bordes del lado derecho de la hoja. En la Figura 23, se presenta en forma comparativa la severidad causada por el aislamiento *Pyricularia*-arroz y *Pyricularia*-bijao en hojas cartucho de “wira bijao”. Estos resultados no concuerdan con el reporte de Pappas y Paplomatas (1998), que mencionan que ninguna especie de Marantaceae mostró susceptibilidad a la inoculación de 5×10^4 conidias/ml de un aislamiento de *Pyricularia* obtenido de arroz.

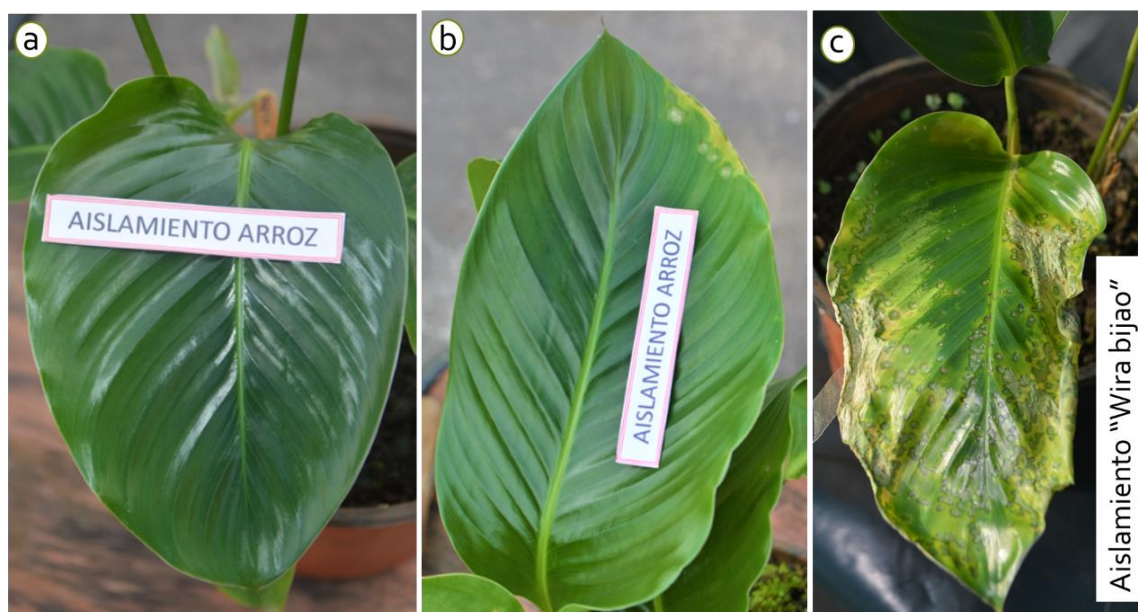


Figura 22: Síntomas desarrollados por el aislamiento *Pyricularia*-arroz en hojas de “wira bijao” por el depósito de 2 ml de inóculo (1×10^4 conidias/ml) en estado de hoja cartucho (a y b). Aislamiento de *Pyricularia*-bijao con mayor severidad en la expresión de síntomas (c)

4.2.4. Rango de hospedantes del aislamiento *Pyricularia*-bijao

De las especies de las familias Marantaceae, Zingiberaceae, Heliconaceae y Poaceae inoculados con el asilado de *Pyricularia*-bijao, sólo resultaron con alguna intensidad de daño

otras cuatro especies de la familia Marantaceae de las 15 que se inocularon (Cuadro 15). Pappas y Paplomatas (1998), reportaron a *Pyricularia oryzae* causando manchas foliares en 09 especies de la familia Marantaceae y en *Musa sapientum* (musaceae) y este agente causal fue renombrado a *Pyricularia ctenantheicola* Klaubauf, Lebrun & Crous, como especie nueva en el 2014. De las 14 especies de Marantaceae inoculadas sólo se obtuvieron desarrollo de síntomas en *Calathea amabilis*, *C. ornata*, *C. insignis*, *C. rufibarba*, *Ctenanthe oppenheimiana*, *C. pilosa*, *C. setosa*, *Maranta leuconeura* y *Stromanthe sanguinea*; además, obtuvieron infección en *Musa sapientum* (musaceae); de estas especies sólo *Calathea ornata* resultó ser susceptible al aislamiento de *Pyricularia*-bijao (Figura 24).

Cuadro 15: Hospedantes sobre los que se ha observado expresión de síntomas por la inoculación de suspensión de conídias de *Pyricularia*-bijao

	Hospedantes	Método de inoculación	Resultado
1	<i>Calathea</i> spp. 1 "Wira bijao" o Bijao verdadero (1 ^o en importancia comercial)	Inoculación a hoja cartucho	Positivo
2	<i>Calathea lateralis</i> Bijao blanco (2 ^{do} en importancia comercial)	Inoculación a hoja cartucho	Positivo
3	<i>Calathea lutea</i> Bijao lanudo (3 ^o en importancia comercial)	Inoculación a hoja cartucho	Positivo
3	<i>Calathea ornata</i> – 1 - ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Positivo
4	<i>Calathea ornata</i> – 2 - ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Positivo
5	<i>Calathea zebrina</i> - ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
6	<i>Calathea rufibarba</i> - ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
7	<i>Calathea roseoptica</i> - ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
8	<i>Calathea makoyana</i> – ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
9	<i>Calathea lancifolia</i> – ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
10	<i>Calathea warscewiczii</i> – ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
11	<i>Calathea</i> spp. – 1 ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
12	<i>Calathea</i> spp. – 2 ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
13	<i>Calathea</i> spp. – 3 ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
14	<i>Calathea</i> spp. – 4 ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
15	<i>Calathea</i> spp. – 5 ornamental - Marantaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
16	Kion (<i>Zingiber officinale</i>) - Zingiberaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
17	Azafrán (<i>Curcuma longa</i>) - Zingiberaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
18	Heliconia 1 (<i>Heliconia</i> sp.) - Heliconiaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
19	Heliconia 2 (<i>Heliconia</i> sp.) - Heliconiaceae	Inoculación a hoja cartucho	Negativo
20	Arroz (<i>Oryza sativa</i>) - Poaceae	Aspersión a toda la planta	Negativo
21	Arrocillo (<i>Rottboellia</i> sp.) - Poaceae	Aspersión a toda la planta	Negativo

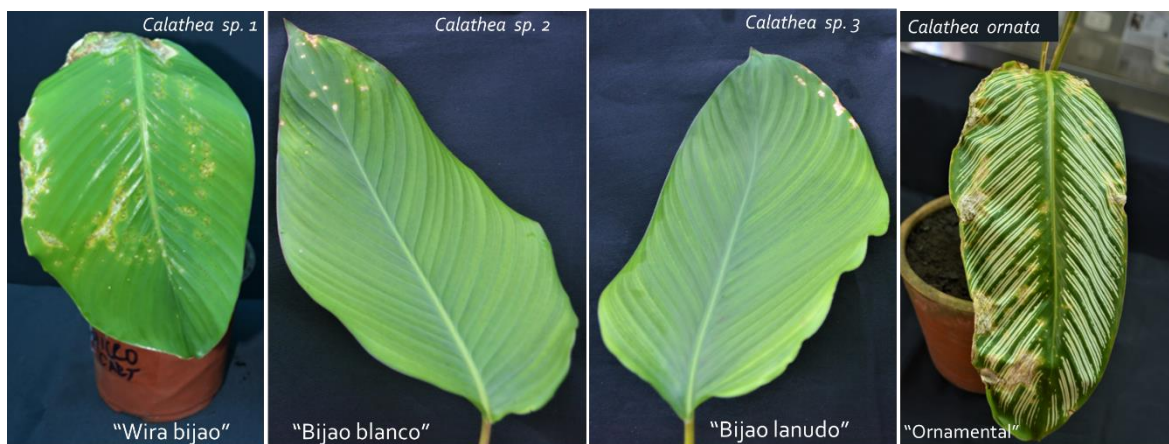


Figura 23: Síntomas desarrollados por *Pyricularia*-bijao en tres especies diferentes de *Calathea* por inoculación en el estado de hoja cartucho

4.2.5. Porcentaje de área foliar dañada en hojas al estado cosecha

Existe mayor porcentaje de área foliar afectada en un lado de la hoja, visto desde la base del haz. En la Figura 25, se muestra la existencia de mayor porcentaje de área foliar dañada en el lado derecho de la hoja. La causa de esta característica podría ser atribuida a la concentración de los pigmentos antociánicos (fenoles) presentes en el lado expuesto en las hojas cartucho (Figura 26 a), ese lado corresponderá al lado izquierdo, cuando la hoja se extienda totalmente (Figura 25) o al lado derecho si es visto desde el envés (Figura 26). Al realizar la cuantificación de fenoles totales mediante el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu en extractos hidroalcohólicos (70:30 v/v metanol:agua), expresados en miliequivalentes a ácido gálico por g de muestra (mg EAG.g^{-1}), se determinó que, en promedio el mayor contenido de este compuesto se encuentra en el lado derecho (4.37), mientras que en el lado izquierdo el contenido es solo de $3.43 \text{ mg EAG.g}^{-1}$ (Figura 26 c). Este mayor contenido de polifenoles totales estaría acondicionando una menor infección de *P. oryzae*. El efecto antifúngico de los fenoles está bastante documentado; Tellez *et al.* (2016), determinaron que las manchas foliares en diferentes especies de árboles tropicales causados por *Calonectria* sp. disminuyeron a medida que aumentó el contenido de pigmentos antociánicos en las hojas jóvenes.

Aun cuando la enfermedad se presenta en más del 80% de las hojas comercializadas, estas no superan el 5 por ciento, en el lado derecho (Figura 25); sin embargo, sus consecuencias

son graves debido a que al momento de ser sometidas al ahumado a una temperatura de más de 150 °C el área necrosada se quema, afectando significativamente la utilidad de la hoja. La práctica del ahumado se realiza para que la hoja sea maleable al momento de la envoltura del alimento y fundamentalmente para integrar en ellas aromas y sabores, especialmente a los denominados “juanes”; además, en este plato típico de la selva se requiere que las hojas actúen como una envoltura hermética para que no ingrese el agua al momento de la cocción. El uso de hojas ahumadas con áreas necróticas requerirá emplear dos o más hojas por cada unidad de plato.

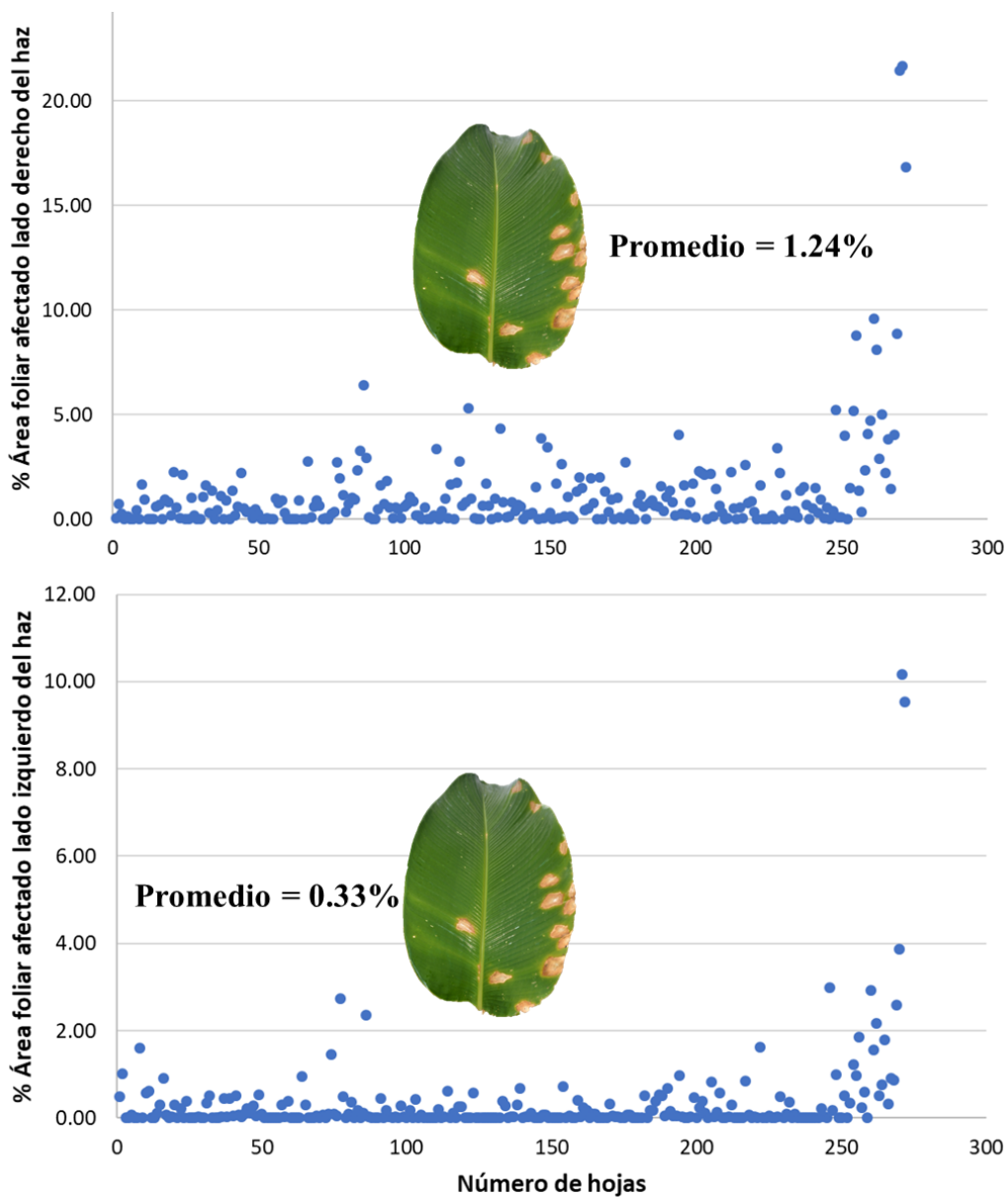


Figura 24: Porcentaje de área foliar afectada según el lado derecho o izquierdo de hoja al estado de cosecha, visto desde el haz

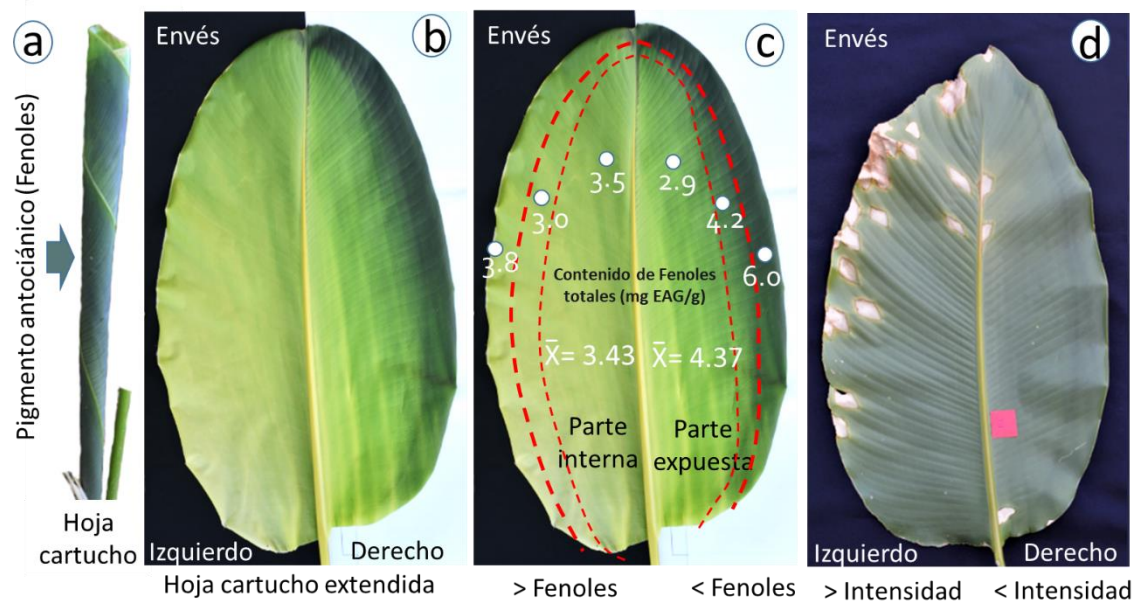


Figura 25: Presencia de fenoles en las hojas cartucho de “wira bijao” y cantidad de fenoles totales en cada lado correlacionados con la intensidad de daño por *Pyricularia oryzae*

Las zonas cultivadas de bijao, según el sistema de clasificación de zonas de vida de Holdridge corresponde a un Bosque Húmedo Tropical, que se caracteriza por ser un clima cálido y húmedo con meses (abril-setiembre) de menor y mayor (octubre-marzo) precipitación que fluctúa entre 3 384 a 3 403 mm/año y temperaturas que fluctúa entre 19.5 a 29.9 °C, y una humedad relativa media histórica que fluctúa entre 82.2 a 84.3 por ciento. Estas condiciones climáticas tienen un impacto en el desarrollo de las enfermedades en las plantas, ya que proporcionan el ambiente propicio para la proliferación de patógenos y la propagación de enfermedades. Según Picco y Rodolfi (2002), estas condiciones climáticas son muy favorables para el desarrollo epidémico del género *Pyricularia*. Aun cuando, las observaciones de campo muestran un nivel de incidencia y severidad uniforme a lo largo del año es necesario evaluar su comportamiento en la época de menor y mayor precipitación.

4.3. Análisis molecular

Las secuencias de la región gen 28S de los aislamientos *Pyricularia-wira bijao* (CPQBA 2629-22 DRM 01) y *Pyricularia-bijao blanco* (CPQBA 2629-22 DRM 02) obtenidos con los primers empleados, se ensamblaron en un consenso (secuencia de consenso única que

combina los diferentes fragmentos obtenidos) y comparado con secuencias de organismos representados en bases de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y CBS (<http://www.westerdijkinstituut.nl/>), permiten identificar a los dos agentes causales de manchas foliares en “Wira bijao” y “Bijao blanco” como *Pyricularia oryzae* Cavara 1892 (Cuadro 16).

Las secuencias de la región D1/D2 del gen 28S de CPQBA 2629-22 DRM 01 y CPQBA 2629-22 DRM 02 mostraron 99-100 por ciento de similitud con las secuencias de la misma región del operón ribosómico de la especie *Pyricularia oryzae*, depositadas en la base de datos GenBank y en la base de datos CBS.

Cuadro 16: Resultados de la identificación molecular del agente causal del quemado de hojas en *Calathea* sp. “wira bijao” y “bijao blanco”

Identificación de Origen (Perú)	Clave de identificación en Brasil	Resultado de Identificación
Género: <i>Pyricularia</i> Hospedante: <i>Calathea</i> sp. 1- “Wira bijao” Colector: Oscar Cabezas H. Fecha de siembra: 18/12/21 Procedencia: Leoncio Prado - Huánuco	CPQBA 2629-22 DRM 01 (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas)	<i>Pyricularia oryzae</i> Cavara 1892
Género: <i>Pyricularia</i> Hospedante: <i>Calathea</i> sp. 2 – “Bijao blanco” Colector: Oscar Cabezas H. Fecha de siembra: 18/12/21 Procedencia: Leoncio Prado - Huánuco	CPQBA 2629-22 DRM 02	<i>Pyricularia oryzae</i> Cavara 1892

El dendograma de distancia genética, construido con las secuencias de la región del gen 28S de las muestras CPQBA 2629-22 DRM 01 (wira bijao) y CPQBA 2629-22 DRM 02 (bijao blanco), y de otras especies de hongos obtenida de las bases de datos Mykobank presentado en la Figura 27. El agrupamiento de las muestras aisladas en este trabajo con los linajes de las especies de referencia: CBS 658.66, CBS 659.66 y G58 de *Pyricularia oryzae* sugieren que las dos muestras serían *Pyricularia oryzae* Cavara 1892.

Actualmente, los reportes científicos concluyen que *P. oryzae* solo causan enfermedades en especies de plantas de la familia Poaceae; sin embargo, Pappas y Vloutoglou (1996) y Pappas y Paplomatas (1998) lo reportaron causando manchas foliares en *Ctenanthe oppenheimiana* and *C. setosa* miembros de la familia Marantaceae a los que también pertenece el “wira bijao”. El análisis polifilético realizado del género *Pyricularia* por Klaubauf *et al.* (2014), lo renombraron al agente causal de las manchas foliares en *Ctenanthe* como *Pyricularia ctenantheicola* por pertenecer a grupos monofiléticos diferentes.

La estrecha relación filogenética (Figura 27) y la conclusión de la identidad basado en su estructura molecular de los dos aislamientos obtenidos de “bijao” en *Pyricularia oryzae*, sugieren la existencia de formas patogénicas especializadas en algunas especies de la familia Marantaceae; sin embargo, es necesario realizar el secuenciamiento de otras regiones genómicas, tal como fue realizado por Khemmuk (2016), que además de secuenciar las regiones ITS y LSU secuenció otras como ACT, RPB1, BT, CAL, TEF1 y MCM7 para estudiar las relaciones filogenéticas de la familia Pyriculariaceae. Además, Dizkirici and Kalmer (2019), sugieren, que además de secuenciar la región ITS, se secuencien genes que codifican proteínas como TEF1- α , RPB1, RPB2, β -tubulin y CaM para la identificación específica de hongos. Considerando, estos hechos, es necesario secuenciar un mayor número de regiones a fin de dar mayor consistencia a la identidad de *Pyricularia oryzae* como agente causal de las manchas foliares en *Calathea* sp. cultivar “wira bijao” y “bijao blanco”.

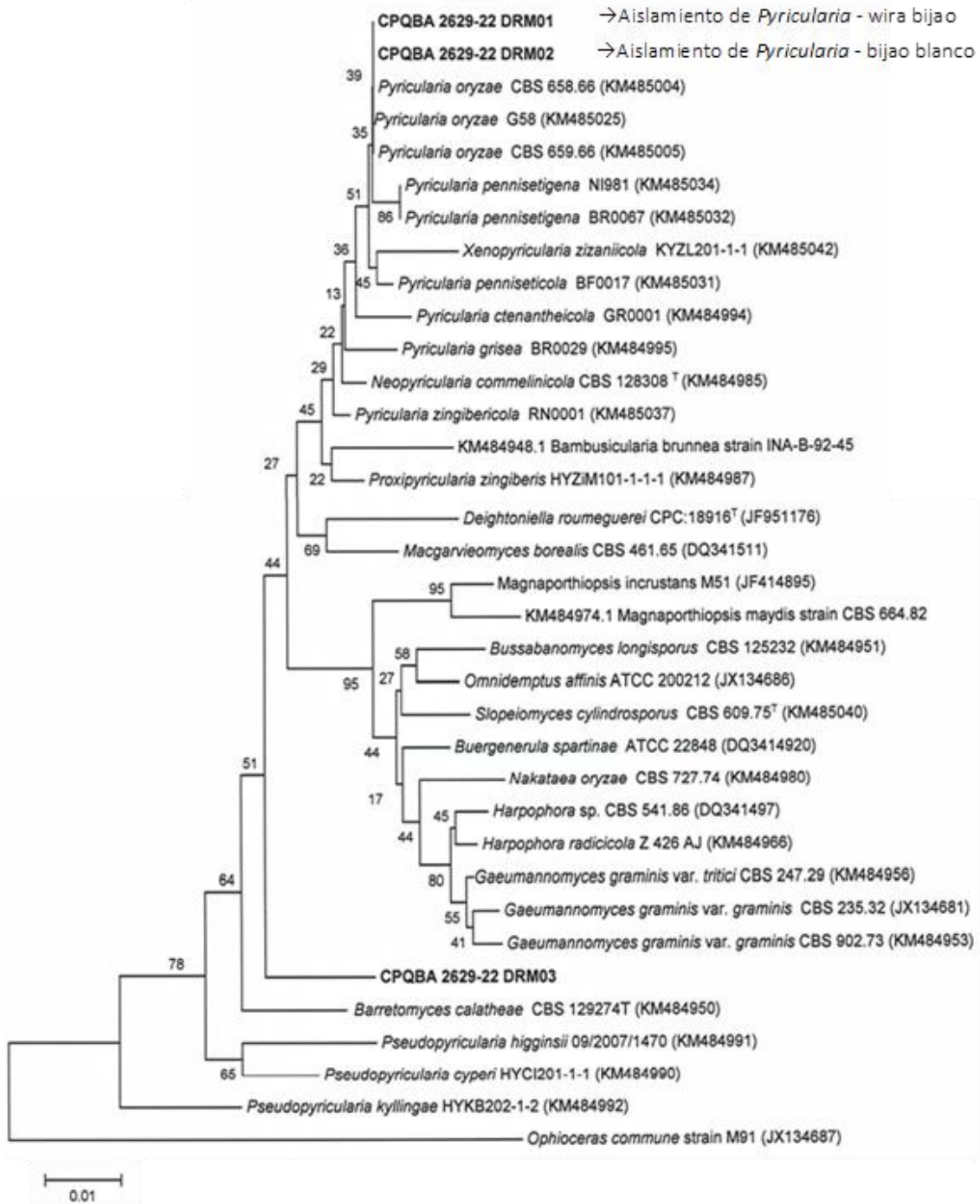


Figura 26: Dendrograma basado en distancias genéticas con el método Neighbor-joining usando las secuencias D1/D2 del gen 28S, mostrando el agrupamiento de *Pyricularia oryzae* con las muestras CPQBA 2629-22 DRM 01 y DRM 02, aislados de “wira bijao” y “bijao blanco”, respectivamente

V. CONCLUSIONES

1. Las características morfológicas, culturales y patogénicas, permiten establecer que el género *Pyricularia*, que infecta a hojas de *Calathea* sp. cv. “wira bijao”, es diferente a las especies de *P. oryzae* y *P. grisea* descrita por Ellis (1970) y *Barretomyces calathea*.
2. Aun cuando, el análisis de distancias genéticas por el método de Neighbor-Joining usando la región D1/D2 del gen 28S determinó que, el causante de las manchas foliares en hojas de *Calathea* sp. “wira bijao” es genéticamente semejante a *Pyricularia oryzae* Cavara 1892, es necesario analizar otros genes que permitan determinar su filogenia dentro de la familia Pyriculariaceae.
3. Las inoculaciones cruzadas del aislamiento de *Pyricularia* obtenidos de arroz, causaron lesiones leves en hojas de “wira bijao”; mientras que, el aislamiento de *Pyricularia* que infecta al “wira bijao” no causa ninguna lesión visible en el arroz, pero sí tiene capacidad de infección sobre otras cuatro especies de *Calathea*.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar inoculaciones cruzadas con un mayor número de aislamientos de *Pyricularia oryzae* obtenidos de arroz sobre plántulas de *Calathea* sp. “wira bijao”.
2. Realizar inoculaciones cruzadas sobre cultivares diferenciales de arroz del aislamiento de *Pyricularia oryzae* obtenidos de *Calathea* sp.
3. Realizar el secuenciamiento de otras regiones como ACT, RPB1, BT, CAL, TEF1 y MCM7, para una mayor claridad en la identidad de *Pyricularia oryzae* como agente causal de las manchas foliares en *Calathea* sp. “wira bijao”.
4. Realizar la identificación a nivel de especie a *Calathea* sp. denominado localmente como “wira bijao”.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aamir, S; Sutar, S; Singh, SK; Baghela, A. 2015. A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. *Plant Pathology & Quarantine* 5(2): 74-81.

Andersson, L; Chase, MV. 2001. Phylogeny and classification of Marantaceae. *Bot. Journal Linn. Soc.* 135(3): 275-287.

Aucique-Pérez, CE; Resende, RS; Martins, AO; Silveira, SP; Cavalcanti, JHF; Morerira, NV; Fernie, AR; Araújo, WL; Murilo, FD; Rodrigues, FA. 2020. How do wheat plants cope with *Pyricularia oryzae* infection? A physiological and metabolic approach, 252(2), 24 p. DOI: 10.1007/s00425-020-03428-9.

Barnet, HL; Hunter, B. 1992. Ilustración de géneros de hongos imperfectos. 3ra. Ed. Infomusa. 100 p.

Braga, JMA. 2005. Marantaceae – Novidades taxonômicas e nomenclaturais III: Tipificações, sinonímias e uma nova combinação em *Calathea*. *Acta Bot. Bras.* 19(4): 763-768.

Bussaban, B; Lumyong, S; Lumyong, P; Seelanan, T; Park, DC; McKenzie, EHC; Hyde, K. 2005. Molecular and morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. *Mycologia*, 97(5), 1002–1011.

Cabezas, O; Mattos, L. 2018. Mancha foliar causada por *Pyricularia* sp. en *Calathea* en el Perú. XXV Congreso Peruano de Fitopatología. Libro de resúmenes pp. 21. Piura, 16 al 21 septiembre 2018.

Chern, L L; Jie, L S; Feng, C T. & Ho, W C. 2011. First report of leaf blight on *Calathea picturata* Caused by *Exserohilum rostratum* in Taiwan. APS Publications. The American

Phytopathological Society (APS). Recuperado de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-12-10-0939>.

Chese, AR. 1982. *Alternaria* leaf spot of *Calathea* spp. *Plant Disease* 66:953-954.

Correa-Victoria, FJ; Zeigler, RS. 1993. Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast "hot-spot" breeding site in Eastern Colombia. *Plant Disease*, St. Paul, v.77, p. 1029-1035.

Dahlgren, R.M.T. 1985. The families of the Monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy. Springer – Verlag Berlin Heidelberg. Germany. 145 p.

Dean, R; Van Kan, JAL; Pretorius, ZA; Hammond-Kosack, KE; Di Pietro, A; Spanu, PD; Rudd, JJ; Dickman, M; Kahmann, R; Ellis, J; Foster, G.D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13, 414–430.

Díaz-Piedrahita, S. 2013. Las hojas de las plantas como envolturas de alimentos. Volume 12 of Biblioteca básica de cocinas tradicionales de Colombia. Ministerio de Cultura, Colombia. 115 p.

Dizkirici, Ayten and Kalmer, Aysenur. 2019. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwigia*. 109. 187-224. [10.1127/nova_hedwigia/2019/0528](https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2019/0528).

Dubina, EV; Alabushev, AV; Kostylev, PI; Kharchenko, ES; Ruban, MG; Aniskina, YV; Shilov, IA; Velishaeva, NS; Maximenko, EP; Makukha, YA. 2020. Biodiversity of *Pyricularia oryzae* Cav. in rice-growing regions of the south of Russia using PCR method. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(2), 289–303. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00737-6>.

Dutta, S; Bandyopadhyay, S; Jha, S. 2019. Cultural and morphological characterization of *Pyricularia grisea* causing blast disease of rice. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 8(9): 2319-7706.

Ebbole, DJ. 2007. *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. Annual Review of Phytopathology. 45, 437–456.

EcoBiosis. 2013. Ficha especie: *Calathea lutea* (Aubl.) Schult (en línea). Portal Nacional de Biodiversidad. Museo Nacional de Costa Rica. Consultado 09 oct. 2019. Disponible en <http://ecobiosis.museocostarica.go.cr/especies/ficha/1/3348>.

El Comercio. 2017. ¿Por qué la Fiesta de San Juan es la más importante de la Amazonía peruana? (en línea). Empresa Editora El Comercio. Redactado el 16 junio 2017. Consultado el 09 octubre 2020. Disponible en: <https://elcomercio.pe/autor/redaccion-ec>.

Ellis, MB. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. International Mycological Institute. UK. 467 p.

Fei, Li-Wang; Lu, Wen-Bo; Xiao-Zhou Xu; Feng-Cheng Yan; Li-wei Zhang; Jin-Tao Liu; Yuan-Jun Bai; Zhen-Yu LI; Wen-Sheng Zhao; Jun Yang, You-Liang Peng. 2019. A rapid approach for isolating a single fungal spore from rice blast diseased leaves, Journal of Integrative Agriculture, Volume 18, Issue 6. Pages 1415-1418.

French, ER; Torres HT. 1980. Métodos de investigación en Fitopatología. Primera edición. Editorial IICA. San José, Costa Rica. 289 p.

Fujita, K; Arase, S; Hiratsuka, H; Honda, Y; Nozu, M. 1994. The role of toxin(s) produced by germinating spores of *Pyricularia oryzae* in pathogenesis. J. Phytopathol. 142:245-252.

Galhano, R; Talbot, NJ. 2011. The biology of blast: Understanding how *Magnaporthe oryzae* invades rice plants. Fungal Biology Reviews 25, 61–67.

Hall, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41 :95-98.

Howard, R. J., & Ferrari, M. A. 1989. Role of melanin in appressorium function. Experimental Mycology, 13(4), 403-418.

Hussin, NA; Yeo, FKS; Mohamad, N.; Hamsein, NN; Thanh, TAV; Chung, HH; Lai, LS. 2020. Isolation and characterization of *Pyricularia oryzae* isolated from lowland rice in Sarawak, Malaysian borneo. Malaysian Journal of Microbiology, 16(1), 58–67. <https://doi.org/10.21161/mjm.190423>.

Kankanala, P; Czymmek, K; Valent, B. 2007. Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. The Plant Cell 19, 706–724.

Kato, H. 2001. Rice blast disease. Pesticide Outlook 12, 23–25.

Kennedy, H; Andersson, L; Hagberg, M. 1988. Marantaceae. Págs. 13-188. En: Harling, G. y Andersson, L. (eds.). Flora of Ecuador 32. Göteborg University, Göteborg.

Khemruk, W. 2017. Plant pathogenic Magnaporthales in Australia, with particular reference to *Pyricularia oryzae* on wild and cultivated rice. PhD Thesis, Qld Alliance for Agriculture and Food Innovation, The University of Queensland. <https://doi.org/10.14264/uql.2017.490>

Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16:111-120.

Klaubauf, S; Tharreau, D; Fournier, E; Groenewald, JZ; Crous, PW; De Vries, RP; Lebrun, MH. 2014. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). Studies in Mycology, 79(1), 85–120.

Kotani, S; Kurata, M. 1992. Black blotch of ginger rhizome by *Pyricularia zingiberi* Nishikado. Japanese Journal of Phytopathology, 58(3), 469–472. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.58.469>.

Lascurain, RM. 1995. Marantaceae: flora de Veracruz. Fascículo 89. Publicada por el Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México. 40 p.

Leahy, R. M. 1991. Bacterial leaf spot of *Calathea* spp. Plant Pathology Circular No. 345.

Lifemap-NCBI. 2021. NCBI taxonomy. Version actualizada a abril 2020 (en línea). National Center for Biotechnology Information. Consultado 28 agosto 2021. Disponible en: <http://lifemap.univ-lyon1.fr/explore.html>.

Longya, A; Talumphai, S; Jantasuriyarat, C. 2020. Morphological characterization and genetic diversity of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, from Thailand using ISSR and SRAP markers. *Journal of Fungi*, 6(1), 38. <https://doi.org/10.3390/jof6010038>

Maharachchikumbura, S. S. N.; Hyde, K. D.; Jones, E. B. G.; McKenzie, E. H. C.; Huang, S.-K.; Abdel-Wahab, M. A. y Xu, J. 2015. Towards a natural classification and backbone tree for Sordariomycetes. *Fungal Diversity* 2015 72:1, 72(1), 199–301.

Nartymov, D; Kharitonov, E; Dubina, E; Garkusha, S; Ruban, M; Istomin, N; Kostylev, P. 2021. Studying of cultural properties of *Pyricularia oryzae* Cav. strains in the South of Russia. *Microbiology Research*, 12(1), 21–28. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12010003>.

O'Donnell, K., Cigelnik, E. and Nirenberg, H.I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90:465–493.

OPI. 2011. *Calathea*. (en línea). Oglesby Plants International. Consultado 28 agosto 2021. Disponible en: <http://www.oglesbytc.com/cultural-notes/calathea/>.

Ou, S. H. 1980. A look at worldwide rice blast disease control. *Plant Dis.* 64:439. American Phytopathological Society. DOI: 10.1094/PD-64-439.

Pappas AC. and Paplomatas EJ. 1998. *Pyricularia* leaf spot: a new disease of ornamental plants of the family Marantaceae. *Plant Dis* 82:465–469.

Pappas, AC. and Vloutoglou, I. 1996. First report of a new leaf spot disease of *Ctenanthe* caused by *Pyricularia oryzae*. *Plant Dis.* 80:463.

Picco, A.M.; Rodolfi M. 2002. *Pyricularia grisea* and *Bipolaris oryzae*: a preliminary study on the occurrence of airborne spores in a rice field. *Aerobiologia* 18: 163-167.

Prabhu, AS; Filippi, MC; Zimmermann, FJP. 2003. Cultivar response to fungicide application in relation to rice blast control, productivity and sustainability. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.1, p.11-17.

Prince, L; Kress, WJ. 2006. Phylogenetic relationships and classification in the prayer plant family (Marantaceae): Insights from plastid DNA sequence data. *Taxon* 55(2): 281-296.

Priya, V; Saveetha, K; Sankaralingam, ARR; Robin, S. 2013. Variability in *Pyricularia oryzae* from different rice growing regions of Tamil Nadu, India. *African Journal of Microbiology Research*, 7(26), 3379–3388. <https://doi.org/10.5897/ajmr12.1286>.

Qi, H; Yang, J; Yin, C; Zhao, J; Ren, X; Jia, S; Zhang, G. 2019. Analysis of *Pyricularia oryzae* and *P. grisea* from different hosts based on multilocus phylogeny and pathogenicity associated with host preference in China.

Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J. and Oberlies, N.H. 2017. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products* 80 (3): 756–770. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085.

Robarts, DWH; Wolfe, AD. 2014. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology. *Appl. Plant Sci*.

Rossman, AY; Howard, RJ; Valent, B. 1990. *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fungus. *Mycologia*, 82(4), 509. <https://doi.org/10.2307/3760024>

Saitou, N; Nei, M. 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

Simone, GW; Brunk, DD. 1983. New leaf spot of *Calathea* and *Marantha* spp. Incited by *Dreschlera setariae*. *Plant Disease* 67:1160-1161.

Soares, DJ; Rocha FB; Barreto, RW. 2011. *Pyriculariopsis calathea* anam. nov. a novel fungus from the Atlantic rainforest of Brazil associated with leaf spots on *Calathea* sp., with a key of *Pyriculariopsis* spp. *Mycological Progress* 10: 315–321.

Tamura, K; Stecher, G; Peterson, D; Filipinski, A; Kumar, S. 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.

Tellez, P; Rojas, E; Van Bael, S. (2016). Red coloration in young tropical leaves associated with reduced fungal pathogen damage. *Biotropica*, 48(2), 150–153. <https://doi.org/10.1111/btp.12303>.

Thierry, M; Gladieux, P; Fournier, E; Tharreau, D; Ioos, R. (2020). A genomic approach to develop a new qPCR test enabling detection of the *Pyricularia oryzae* lineage causing wheat blast. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0685-RE>

Tharreau, D; Fudal, I; Andriantsimialona, D; Santoso, UD; Fournier, E; Lebrun, MH; Nottéghem, JL. 2009. World population structure and migration of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. In "Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease" (G.-L. Wang and B. Valent, eds.), Springer Netherlands. pp. 209–215.

The Heliconia Society International. 2014. The order Zingiberales. USA. Consultado 20 marzo 2020. Disponible en: <https://www.heliconia.org/the-plants>.

Thompson, JD; Gibson, TJ; Plewniak, F; Jeanmougin, F; Higgins, DG. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.

Vienne, DM. 2016. Lifemap: Exploring the entire tree of life (en línea). *PLOS Biology* 14 (12):2001624. Consultado 14 jul. 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001624>.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Mediciones de conidia y conidióforo en micras de *Pyricularia-bijao* directamente de hoja infectada

Nº Observaciones	Conídias		Conidióforo	
	Largo	Diámetro	Largo	Diámetro
1	28.88	13.27	100.69	4.79
2	26.72	10.69	137.76	5.48
3	26.25	11.29	108.57	4.11
4	31.04	10.24	116.29	4.79
5	28.11	10.50	126.80	5.96
6	26.10	11.09	92.36	5.59
7	26.25	10.97	89.42	5.03
8	27.18	9.88	77.07	5.00
9	27.03	10.32	123.40	4.53
10	26.25	9.59	84.02	5.41
11	27.64	10.72	102.24	4.93
12	27.49	10.24	111.66	5.65
13	26.10	11.04	79.53	4.56
14	26.41	11.83	99.78	5.10
15	29.19	11.83	113.89	5.20
16	28.73	10.76	105.85	4.98
17	27.03	10.78	85.45	4.23
18	27.18	10.50	112.60	5.23
19	28.73	11.24	125.78	5.13
20	27.03	10.32	109.56	4.98
21	30.12	9.85	112.89	5.10
22	26.72	9.95	86.56	5.20
23	26.41	10.25	113.81	5.11
24	29.65	11.92	98.54	5.13
25	26.72	9.53	106.96	4.79
26	25.48	11.09	86.25	4.75
27	28.26	10.29	88.87	4.89
28	30.12	10.69	96.47	5.23
29	28.79	9.89	106.78	4.69
30	30.45	9.13	86.96	4.98
31	27.43	9.30		
32	27.6	9.95		
33	28.06	8.36		
34	31.12	8.37		
35	26.49	8.87		
36	22.23	9.9		
37	30.2	9.52		

Continuación

38	26.38	9.16		
39	27.75	9.51		
40	30.5	10.17		
41	29.42	9.98		
42	29.5	9.09		
43	28.76	9.89		
44	26.54	9.24		
45	30.15	8.33		
46	29.39	8.53		
47	29.4	7.95		
48	25.09	9.64		
49	30.73	9.19		
50	24.89	7.99		
Promedio	27.60	10.74	102.89	5.02
Desv. Stan	1.51	0.84	15.28	0.39
Min	22.23	7.95	77.07	4.11
Max	31.12	13.27	137.76	5.96

Anexo 2: Mediciones de conidia y conidióforo en micras (μm) de *Pyricularia*-arroz directamente de hoja infectada

Nº Observaciones	Conídias		Conidióforo	
	Largo	Diámetro	Largo	Diámetro
1	22.08	7.54	105.02	4.63
2	19.92	8.49	120.46	4.79
3	23.47	9.08	124.32	4.53
4	22.24	7.98	117.68	3.91
5	20.23	8.06	113.05	5.17
6	20.08	7.63	148.88	3.57
7	23.01	8.12	122.93	5.00
8	23.47	6.46	118.76	4.74
9	18.38	7.12		
10	21.93	8.91		
11	19.92	7.98		
12	19.77	7.24		
13	22.39	7.72		
14	21.62	8.23		
15	21.31	8.22		
16	20.54	9.17		
17	20.08	7.51		
18	17.61	9.02		
19	19.31	8.31		
20	20.54	7.78		
21	21.16	8.03		
22	27.03	8.59		
23	23.63	8.46		
24	20.08	7.43		
25	20.23	8.11		
26	21.16	8.77		
27	22.24	7.54		
28	18.38	7.71		
29	21.31	8.29		
30	22.24	7.58		
31	19.31	7.58		
32	18.38	8.45		
33	19.46	7.89		
34	20.85	8.11		
35	20.08	8.26		
36	19.46	7.01		

Continuación

37	18.07	8.08		
38	23.78	7.60		
39	22.08	7.51		
40	18.69	8.74		
41	23.01	8.51		
42	23.47	8.69		
43	17.61	7.71		
44	18.84	7.64		
45	18.22	8.23		
46	18.38	7.63		
47	19.31	8.94		
48	19.92	6.90		
49	22.24	7.20		
50	20.89	7.11		
Promedio	20.75	7.98	121.39	4.54
Desv. Stan	1.95	0.61	12.68	0.54
Min	17.61	6.46	105.02	3.57
Max	27.03	9.17	148.88	5.17

Anexo 3: Mediciones de conidia y conidióforo en micras (μm) de *Pyricularia*-bijao y *Pyricularia*-arroz en medio PDA

Nº Observ.	<i>Pyricularia</i> aislamiento de bijao				<i>Pyricularia</i> aislamiento de arroz			
	Conídias		Conidióforo		Conídias		Conidióforo	
	Largo	Diámetro	Largo	Diámetro	Largo	Diámetro	Largo	Diámetro
1	36.00	9.11	199.32	4.96	26.52	8.06	235.48	4.11
2	28.21	10.64	127.28	4.96	20.62	7.42	510.78	4.60
3	32.99	10.52	99.07	4.70	21.04	6.13	190.36	4.71
4	35.71	10.17	148.00	4.04	24.70	7.03	185.10	3.57
5	28.01	9.88	95.41	3.99	23.26	7.78		
6	25.43	10.07	106.58	3.98	23.68	6.88		
7	32.27	10.24	81.17	4.02	24.46	7.21		
8	31.99	11.88	197.73	4.11	24.41	7.00		
9	24.47	9.31	90.55	4.12	25.36	7.76		
10	27.64	10.01	84.51	3.98	24.30	8.72		
11	31.34	10.32	48.36	3.71	23.46	8.04		
12	25.75	10.44	95.30	3.85	23.44	7.41		
13	30.86	9.38	121.49	5.11	25.16	7.58		
14	31.19	11.20	86.49	4.01	21.29	7.93		
15	26.35	10.07	51.40	3.56	18.36	6.59		
16	31.03	10.10	74.19	5.08	25.94	8.90		
17	26.70	10.97	69.95	4.04	26.60	8.49		
18	30.60	8.48			24.63	7.85		
19	30.03	9.88			22.44	7.73		
20	24.41	9.26			25.88	8.64		
21	30.81	9.33			26.28	8.71		
22	25.53	10.38			23.09	8.88		
23	31.16	10.69			24.40	8.22		
24	27.93	10.01			24.40	8.82		
25	31.66	10.04			24.11	7.32		
26	31.59	11.33			19.54	7.48		
27	27.14	11.19			21.41	9.04		
28	32.88	8.57			23.16	7.47		
29	19.53	8.77			24.96	7.05		
30	23.08	7.40			23.26	9.20		
31	23.71	8.77			22.68	7.05		
32	26.70	8.83			22.59	8.25		
33	30.32	8.92			21.38	6.26		
34	34.22	8.47			22.69	8.22		
35	36.41	8.37			25.88	9.19		
36	31.25	6.13			22.04	8.85		

Continuación

37	25.76	8.37			23.03	8.23		
38	24.63	9.99			24.31	7.90		
39	27.45	8.46			23.16	8.22		
40	29.99	7.58			24.93	8.62		
41	29.14	9.45			25.03	8.08		
42	28.28	8.92			22.90	7.76		
43	33.96	8.67			23.99	8.16		
44	26.72	8.66			26.46	7.70		
45	27.26	11.32			23.39	8.79		
46	27.34	10.75			25.57	9.03		
47	27.90	11.78			26.90	7.96		
48	27.12	9.23			29.19	8.49		
49	35.38	12.97			23.45	7.93		
50	34.69	11.75			22.03	7.80		
Promedio	29.21	9.74	104.52	4.25	23.84	7.96	280.43	4.25
Desv. Stan	3.72	1.28	43.40	0.50	1.99	0.75	155.22	0.52
Min	19.53	6.13	48.36	3.56	18.36	6.13	185.10	3.57
Max	36.41	12.97	199.32	5.11	29.19	9.20	510.78	4.71

Anexo 4: Análisis de variancia para el efecto del pH en el ritmo de crecimiento micelial del aislamiento de *Pyricularia*-arroz. Tukey 5 por ciento

Fuente	GL	Valor F	Valor p	Sig.
Factor	9	1.77	0.097	**
Error	50			
Total	59			

Anexo 5: Análisis de variancia para el efecto de la luz continua, luz alterna y oscuridad en el ritmo de crecimiento micelial del aislamiento de *Pyricularia*-arroz. Tukey 5 por ciento

Fuente	GL	Valor F	Valor p	Sig.
Factor	2	5.02	0.014	**
Error	27			
Total	29			

Anexo 6: Análisis de variancia para el efecto del pH en el ritmo de crecimiento micelial del aislamiento de *Pyricularia*-bijao. Tukey 5 por ciento

Fuente	GL	Valor F	Valor p	Sig.
Factor	10	81.27	0.015	**
Error	44			
Total	54			

Anexo 7: Análisis de variancia para el efecto de la luz continua, luz alterna y oscuridad en el ritmo de crecimiento micelial del aislamiento de *Pyricularia*-bijao. Tukey 5 por ciento

Fuente	GL	Valor F	Valor p	Sig.
Factor	2	8.345	0.002	**
Error	27			
Total	29			

Anexo 8: Análisis de variancia para el efecto de los medios de cultivo en el ritmo de crecimiento radial del aislamiento de *Pyricularia*-bijao. Tukey 5 por ciento

Fuente	GL	Valor F	Valor p	Sig.
Factor	7	8.336	0.022	**
Error	40			
Total	47			

Anexo 9: Análisis de variancia para el efecto de los medios de cultivo en el ritmo de crecimiento radial del aislamiento de *Pyricularia*-arroz. Tukey 5 por ciento

Fuente	GL	Valor F	Valor p	Sig.
Factor	2	119.76	0.0013	**
Error	27			
Total	29			

Anexo 10: Medios de cultivo para determinar las características culturales de los aislamientos *Pyricularia*-bijao y arroz

Papa Dextrosa Agar (PDA) – 1 litro

Ingredientes:

- 200 g de papa pelada
- 17 g de agar-agar
- 20 g de dextrosa

Preparación:

- Cortar la papa en cuadrados de 1 cm² aproximadamente
- En un recipiente con 500 ml de agua destilada poner a cocinar la papa
- En otro recipiente con 500 ml de agua destilada agregar 17 g de agar-agar y calentar en microondas hasta su disolución completa.
- Agregar al agar disuelto el caldo de papa y agregar 20 g de dextrosa, mezclándolos homogéneamente y enrazar a un litro.
- Distribuir en las botellas para la esterilización.
- Esterilizar en autoclave a una presión de 15 lb/pulg², durante 15 minutos.

Oat Meal Agar (OMA) / Agar Harina Avena (AHA)

Ingredientes:

- 17 g de agar-agar
- 47 g de harina de avena
- 20 g glucosa
- 1000 ml agua destilada

Preparación:

- En un recipiente con 500 ml de agua destilada agregar 17 g de agar-agar y calentar en microondas hasta su disolución completa.
- En otro recipiente con 500 ml de agua destilada agregar 47 g de harina de avena y calentar en microondas hasta su disolución completa por aproximadamente 1 hora.
- Mezclar las diluciones de agar y harina, sobre la mezcla adicionar la glucosa.
- Distribuir en las botellas para la esterilización.
- Esterilizar a 121 °C y a 15 libras de presión, durante 20 minutos.

Agar-V8 casero modificado

Ingredientes A:

- 2 tomates grandes
- 2 zanahorias
- 3 ramitas de apio con todo y hojas
- ½ puño de cilantro lavado
- ¼ sal de mar
- ¼ cucharadita de pimienta negra
- ¼ Taza de espinacas
- 1 cucharada de perejil
- 1 titad de beterraga
- 1 taza de agua destilada

Ingredientes B:

- 10 g de extracto de levadura
- 800 ml de agua destilada

Preparación:

- Colocar todos los ingredientes A en una licuadora hasta obtener un jugo uniforme
- Filtrar en una tela de gasa
- 200 ml del filtrado, adicionar el extracto de levadura y enrazar a 1000 ml con agua destilada
- Distribuir en las botellas para la esterilización.
- Esterilizar a 121 °C y a 15 libras de presión, durante 20 minutos.

Medio PDA + Harina de Arroz

Ingrediente:

- 200 g de papa pelada
- 20 g de dextrosa
- 17 g de agar-agar
- 50 g de harina de arroz

Preparación:

- Preparar medio PDA para un volumen de 800 ml
- En 200 ml de agua destilada someter a cocción los 50 g de harina de arroz
- Mezclar el PDA y solución de harina de arroz y enrazar a 1000 ml.
- Distribuir en las botellas para la esterilización.
- Esterilizar a 121 °C y a 15 libras de presión, durante 20 minutos.

Medio PDA + jugo hoja de “wira bijao”

Ingrediente:

- 200 g de papa pelada
- 20 g de dextrosa
- 17 g de agar-agar
- 50 g de hoja fresca de “wira bijao”

Preparación:

- Preparar medio PDA para un volumen de 800 ml
- En 200 ml de agua destilada licuar los 50 g de hoja de “wira bijao”
- Mezclar el PDA y el licuado de hoja de “wira bijao” y enrazar a 1000 ml.
- Distribuir en las botellas para la esterilización.
- Esterilizar a 121 °C y a 15 libras de presión, durante 20 minutos.

Medio Agar Jugo hoja de “wira bijao”

Ingrediente:

- 200 g de hoja fresca de “wira bijao”
- 20 g de dextrosa
- 17 g de agar-agar

Preparación:

- Cortar las hojas en trozos pequeños y licuar con 400 ml de agua destilada
- En otro recipiente con 500 ml de agua destilada agregar 17 g de agar-agar y calentar en microondas hasta su disolución completa.
- Agregar al agar disuelto el licuado de hojas de “wira bijao” y agregar 20 g de dextrosa, mezclándolos homogéneamente y enrazar a un litro.
- Distribuir en las botellas para la esterilización.
- Esterilizar en autoclave a una presión de 15 lb/pulg², durante 15 minutos.

Anexo 11: Resolución de autorización de SERFOR para colecta de muestras de hojas de *Calathea* sp.



Firmado digitalmente por GALVEZ DURAND BESNARD Jessica Maria
FAU 20565836927 soft
Cargo: Directora
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 21.05.2021 18:01:05 -05:00

RESOLUCIÓN DE DIRECCIÓN GENERAL

Magdalena Del Mar, 21 de Mayo del 2021

RDG N° D000283-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS

VISTOS:

La solicitud, registrada con número de expediente 2021-14677, de fecha 05 de mayo de 2021, conteniendo la solicitud de autorización con fines de investigación científica de flora silvestre, fuera de Áreas Naturales Protegidas, presentada por el señor **OSCAR ESMAEL CABEZAS HUAYLLAS** (en adelante, el administrado), identificado con DNI N° 07043313 y el Informe Técnico N° D000146-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPF, de fecha 21 de mayo de 2021, y;

CONSIDERANDO:

Que, el artículo 66° de la Constitución Política del Perú de 1993 establece que los recursos naturales, renovables y no renovables, son patrimonio de la Nación; y el Estado es soberano en su aprovechamiento;

Que, de conformidad con la Ley Forestal y de Fauna Silvestre, aprobada por Ley N° 29763; el Reglamento para la Gestión Forestal, aprobado mediante Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI; el Decreto Supremo N° 004-2019-JUS que aprueba el Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444 Ley del Procedimiento Administrativo General; el literal g) del Artículo 53° del Reglamento de Organización y Funciones aprobado por Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI, así como su modificatoria mediante Decreto Supremo N° 014-2016-MINAGRI y; la Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE.



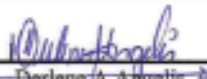


SE RESUELVE:

Artículo 1.- OTORGAR la Autorización con fines de investigación científica de flora silvestre, con estudios moleculares, fuera de Áreas Naturales Protegidas, al señor **OSCAR ESMAEL CABEZAS HUAYLLAS**, identificado con DNI N° 07043313, correspondiéndole el Código de Autorización N° **AUT-IFL-2021-030**, como parte del proyecto de investigación titulado "**Caracterización morfológica, patológica y molecular de *Pyricularia* sp. causante de manchas foliares en *Calathea* sp. en Huánuco**", a desarrollarse en el Sector "El Mirador", distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco; cuya vigencia se contabilizará desde el día siguiente hábil de su notificación.

Artículo 2.- El administrado se encuentra sujeto al cumplimiento de lo presentado en el plan de investigación y al plazo correspondiente a cinco (05) meses; así como, con la colecta del material biológico indicado en el **Cuadro N° 01** del **ANEXO 1** de la presente resolución; asimismo, con las obligaciones establecidas en la legislación forestal y de fauna silvestre, según lo señalado en la parte de considerativa de la presente resolución de dirección general.

Artículo 3.- El administrado deberá implementar las medidas dispuestas en el "Protocolo Sanitario Sectorial ante el COVID-19 en la Actividad Forestal" establecida en la Resolución Ministerial N° 152-2020-MINAGRI, de fecha 28 de junio de 2020, en lo que resulte aplicable.

Anexo 12: Resultados del servicio de análisis molecular de los dos aislamientos del agente causal de manchas foliares en *Calathea* sp.

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGO	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO		 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 24
	NÚMERO PROCESSO: CPQBA 2629/22 DRM		
1 – DADOS CADASTRAIS DA EMPRESA SOLICITANTE			
RAZÃO SOCIAL: Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS)			
ENDEREÇO: Av Universitaria s/n km 1,5 carretera Tingo Maria			
CIDADE: Tingo Maria		UF:	CEP: 10131
CNPJ/CPF: 00		INSCRIÇÃO ESTADUAL: 00	
2 – DADOS DAS AMOSTRAS			
IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO: fungo			No CPS: 028/2022
TOTAL DE AMOSTRAS: 3		LOCAL DE PRODUÇÃO: não informado	
LOTE:		VALIDADE:	
3 – ENSAIOS			
ENSAIOS REALIZADOS: Fungal identification			
NÚMERO DOS PROCEDIMENTOS (E/R)			
PADRM-10			
4 – EXECUÇÃO DOS ENSAIOS			
DIVISÃO Recursos Microbianos CPQBA – UNICAMP AV. Alexandre Cazalatto, 999 - Vila Betel – Paulínia – SP - CEP: 13140-000			
RESPONSÁVEL PELO ENSAIO: Derlene A. Angelis			
DATA DO RECEBIMENTO DA AMOSTRA		17/02/2022	
PERÍODO REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS		DE: 20/02/2022 A 20/04/2022	
DATA DE EMISSÃO DO RELATÓRIO			
CPQBA - UNICAMP, 20 de abril de 2022			
 Derlene A. Angelis RESPONSÁVEL PELO ENSAIO		 Fabiana F. Garboggini COORDENADOR DA DIVISÃO	
 Valéria M. Merzel DIRETOR DO CPQBA			



UNICAMP
FMQ-07
Emissão: GGQ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 2629/22 DRM

PÁGINA: 2 de 10

I - Identificação de Fungos Filamentosos

1. Objetivos

Identificação molecular de 3 (três) linhagens de fungos filamentosos utilizando sequenciamento e análise de distância genética baseada em fragmentos do gene 28S (região D1/D2) e do espaçador dos genes ribossomais (ITS).

2. Amostras recebidas

Amostra	Id Cliente
CPQBA 2629-22 DRM 01	Gênero: <i>Pyricularia</i> ? Hospedante: <i>Calathea</i> sp. Colector: Osear Cabezas Fecha Siembra 18/Dic/2021 Procedência: Leoncio Prado Huánuco-Peru Nº Muestra R1 Meio: PDA (100%)
CPQBA 2629-22 DRM 02	Gênero: <i>Pyricularia</i> ? Hospedante: <i>Calathea</i> sp. Colector: Osear Cabezas Fecha Siembra 18/Dic/2021 Procedência: Leoncio Prado Huánuco-Peru Nº Muestra R3 Meio: PDA (100%)



FMQ-07
Emissão: GGQ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 2629/22 DRM

PÁGINA: 4 de 10

- A seqüências parciais sequenciadas das amostras estão apresentadas no Anexo I.
- O resultado da identificação está apresentado abaixo:

Amostra	Id Cliente	Identificação
CPQBA 2629-22 DRM 01	Género: Pyricularia? Hospedante: Calathea sp. Colector: Osear Cabezas Fecha: Siembra 18/Dic/2021 Procedencia: Leoncio Prado Huánuco-Peru N° Muestra: R1 Medio: PDA (100%)	<i>Pyricularia cf oryzae</i> Cavara 1892
CPQBA 2629-22 DRM 02	Género: Pyricularia? Hospedante: Calathea sp. Colector: Osear Cabezas Fecha: Siembra 18/Dic/2021 Procedencia: Leoncio Prado Huánuco-Peru N° Muestra: R3 Medio: PDA (100%)	<i>Pyricularia cf oryzae</i> Cavara 1892

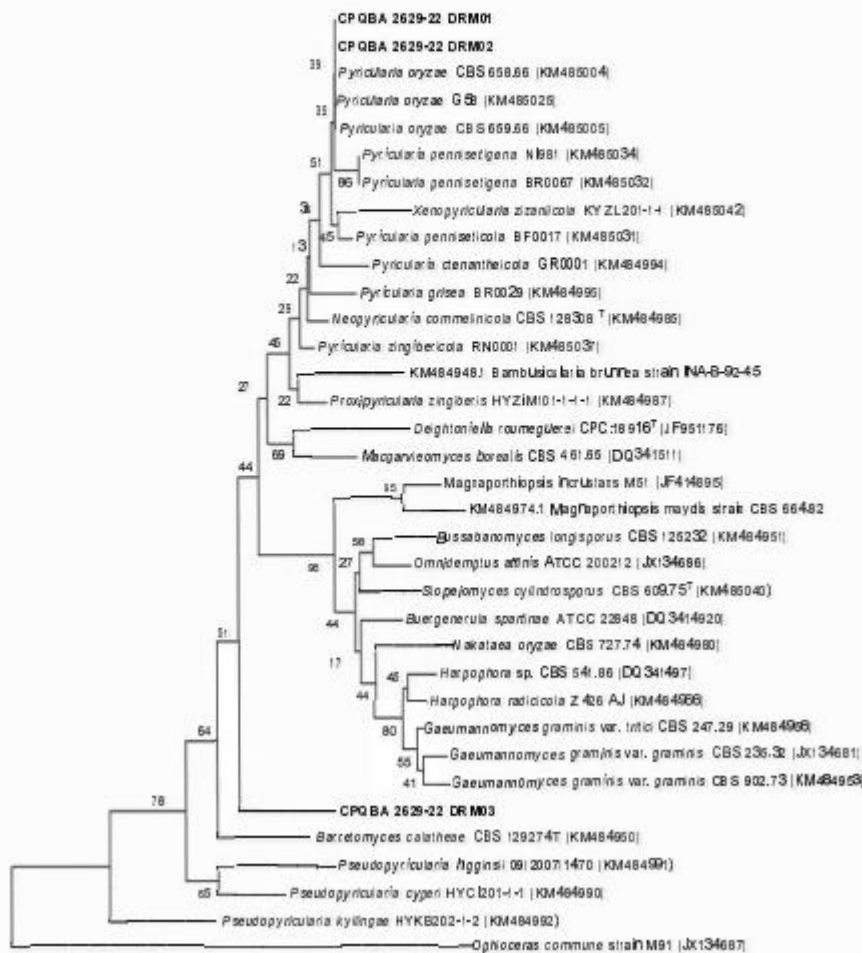
[Handwritten signatures]

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vedada sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

E-mail: cnpesq@cpqba.unicamp.br



0.01

Figura 1. Dendrograma baseado em distância genética utilizando o método Neighbor-joining, demonstrando a relação entre a sequência parcial da região do gene 28S das amostras CPQBA 2629-22DRM 01, CPQBA 2629-22DRM 02 e CPQBA 2629-22DRM 03 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados Mycobank (CBS, KNAW, atual), Westerdijk Fungal Biodiversity Institute e Genbank.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vedado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometer. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicação do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br