



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



Identificación del agente causal de la cenicilla del epazote
(*Chenopodium ambrosioides* L.) y su control con agua
electrolizada

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAFSTRA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



PRESENTA

Ilse Yanerith López Hernández

COMITÉ

Director: Dr. Rogelio Castro Brindis

Co director: Dra. Evert Villanueva Sánchez

Asesor: Dr. José Oscar Mascorro Gallardo



Chapingo, Texcoco. Estado de México, junio del 2023.

La presente tesis titulada: "**Identificación del agente causal de la cenicilla del epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) y su control con agua electrolizada**", realizada por la **C. Ilse Yanerith López Hernández**, bajo la dirección del **Dr. Rogelio Castro Brindis** y codirección de la **Dra. Evert Villanueva Sánchez**, ha sido revisada y aprobada por los miembros del jurado, como requisito parcial para obtener el Título de:

Maestro en Ciencias en Horticultura

Comité Particular

Director:


Dr. Rogelio Castro Brindis

Codirector:


Dra. Evert Villanueva Sánchez

Asesor:


Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

Texcoco de Mora, Edo México, México, junio 2023.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2 OBJETIVOS	1
2.1 Objetivos generales	1
2.2 Objetivos específicos	2
3 HIPÓTESIS	2
4 REVISIÓN DE LITERATURA	2
4.1 Cultivo de epazote (<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.)	2
4.2 Origen y distribución del epazote	2
4.3 Clasificación taxonómica y descripción botánica.....	3
4.4 Generalidades de la producción del cultivo	3
4.5 Problemas fitosanitarios del epazote	4
4.6 Cenicilla polvorienta	4
4.7 Agua electrolizada.....	6
4.8 Descripción y tipos de agua electrolizada	6
4.9 Modo de acción.....	7
4.10 Citometría de flujo.....	8
5 MATERIALES Y MÉTODOS	10
5.1 Obtención de tratamientos	10
5.2 Identificación del agente causal	10

5.2.1	Recolección del material.....	10
5.2.2	Caracterización morfométrica mediante microscopía de luz	11
5.2.3	Caracterización morfométrica mediante microscopía de barrido.....	11
5.2.4	Caracterización molecular. Extracción de DNA y PCR	12
5.3	Pruebas <i>in vitro</i> del efecto del agua electrolizada	13
5.3.1	Efecto del agua electrolizada sobre la morfología de esporas de cenicilla.....	14
5.3.2	Análisis de viabilidad de esporas mediante citometría de flujo.....	14
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
6.1	Identificación del agente causal	14
6.1.1	Síntomas de la enfermedad.....	14
6.1.2	Caracterización morfológica	16
6.1.3	Caracterización molecular	19
6.2	Pruebas <i>in vitro</i> del efecto del agua electrolizada	19
6.2.1	Efecto del agua electrolizada sobre la morfología de esporas de cenicilla.....	19
6.2.2	Análisis de viabilidad de esporas mediante citometría de flujo.....	27
7	CONCLUSIONES.....	31
8	LITERATURA CITADA	31
	Apéndice A. Secuencia de ADN, región ITS 4 e ITS 5.	37
	Apéndice B. Búsqueda de similitud de la secuencia obtenida con BLASTN:.....	39

Apéndice C. Acceso registrado en el GenBank (OP748254.1):	40
---	----

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de los tipos de agua electrolizada.....	10
Cuadro 2. Porcentaje de esporas de <i>Erysiphe betae</i> viables antes y después de la aplicación de tratamientos.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Epazote variedad hojuda con síntomas de cenicilla	16
Figura 2. Micrografías con microscopia de luz del hongo <i>Erysiphe betae</i>	17
Figura 3. Micrografías con microscopia electrónica de barrido del hongo <i>Erysiphe betae</i>	18
Figura 4. Esporas con agua destilada, ML	20
Figura 5. Esporas con agua destilada, MEB	21
Figura 6. Esporas con alcohol, ML	21
Figura 7. Esporas con alcohol, MEB	22
Figura 8. Esporas con Agua electrolizada acida, ML	22
Figura 9. Esporas con agua electrolizada ácida, MEB	23
Figura 10. Esporas con agua electrolizada neutra, ML	23
Figura 11. Esporas con Agua electrolizada neutra, MEB	24
Figura 12. Esporas con Agua electrolizada alcalina, ML	24
Figura 13. Esporas con Agua electrolizada alcalina, MEB	25
Figura 14. Esporas con azufre, ML	25
Figura 15. Esporas con azufre, MEB	26
Figura 16. Grafico de densidad para la comparación de dos variables en un plano, SSC-FSC.	28
Figura 17. Diagrama de densidad de esporas antes y después de la aplicación de tratamiento, AEN.	28
Figura 18. Diagrama de densidad de esporas antes y después de la aplicación de tratamiento, AEA.	29
Figura 19. Diagrama de densidad de esporas antes y después de la aplicación de tratamiento, AEAc	30

DEDICATORIAS

A mis seres queridos que alientan mis ánimos de superación.

A Dios.

A los futuros integrantes de mi vida para enseñar con ejemplo.

A mi persona.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Universidad Autónoma Chapingo, Maestría en Ciencias en Horticultura.

Al Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal principalmente a la Dra. Evert Villanueva Sánchez y a todo su equipo de trabajo del área de Citometría de Flujo.

A la Dra. Martha Hernández Rodríguez y el M.C. Simón Morales Rodríguez del Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Clemente Villanueva Verduzco

A Manuel Ponce Paredes técnico de campo de la Universidad Autónoma Chapingo.

Al Dr. Moisés Camacho Tapia

A la colega Flor Lucas

Y a mi comité asesor el Dr. Rogelio Castro Brindis, la Dra. Evert Villanueva Sánchez y el Dr. José Oscar Mascorro Gallardo.

DATOS BIBLIOGRÁFICOS



Nombre: Ilse Yanerith López Hernández

Fecha de nacimiento: 12 de abril de 1994

Lugar de residencia: Santo Tomás Apipilhuasco, Tepetlaoxtoc, Estado de México.

CURP: LOHI940412MMCPRL08

Profesión: Ingeniero Agrónomo Parasitólogo

Cedula profesional: 11970436

Experiencia laboral:

Coordinador del área de capacitación en Ejecutips S de R.L. de C.V.

Impartición de cursos de capacitación “Buen Uso y Manejo de Plaguicidas” formato online.

Apoyo en los tramites de verificación de empresas comercializadoras de agroquímicos y estudios de efectividad biológica de plaguicidas.

Logística en Asociación de Ingenieros Agrónomos Parasitólogos, IAP A.C.

Identificación del agente causal de la cenicilla del epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) y su control con agua electrolizada

RESUMEN

Mediante microscopia de luz, microscopia electrónica de barrido y secuenciación de ADN se identificó a *Erysiphe betae* como el agente causal de la cenicilla del epazote. Por otra parte, se analizó el efecto del agua electrolizada (AE) en sus tres presentaciones: ácida (AEAc), neutra (AEN) y alcalina (AEA). Para conocer la viabilidad de esporas de cenicilla de epazote, se empleó la técnica de citometría de flujo para discriminar células viables de las no viables y se utilizó ioduro de propidio como fluorocromo indicador de células con membrana comprometida (no viables). Los resultados se presentaron en gráficos de densidad para obtener porcentajes de viabilidad a las 0 y a las 72 horas de la aplicación de los tratamientos. El AEN se ubicó como el mejor tratamiento con un porcentaje de viabilidad de 28.9 %, el cual se observó a las 72 horas. A este resultado le siguió el obtenido con el AEA, que fue de 49.1 %.

Palabras clave: *Erysiphe betae*, citometría de flujo, agua electrolizada neutra.

Identification of the causative agent of epazote powdery mildew (*Chenopodium ambrosioides* L.) and its control with electrolyzed water

ABSTRACT

Using light microscopy, scanning electron microscopy and DNA sequencing, *Erysiphe betae* was identified as the causative agent of epazote powdery mildew. On the other hand, the effect of electrolyzed water (EW) was analyzed in its three presentations: acid (AcEW), neutral (NEW) and alkaline (AEW). To determine the viability of epazote powdery mildew spores, the flow cytometry technique was used to discriminate viable from non-viable cells and propidium iodide was used as an indicator fluorochrome for membrane-compromised (non-viable) cells. The results were presented in density graphs to obtain viability percentages at 0 and 72 hours after the application of the treatments. The NEW was ranked as the best treatment with a viability percentage of 28.9 %, which was observed at 72 hours. This result was followed by the one obtained with the AEW, which was 49.1 %.

Key words: *Erysiphe betae*, flow cytometry, neutral electrolyzed water.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

México es lugar de origen de la planta de epazote, la referencia más antigua que se conoce está en el Códice Florentino que lo mencionó como una hierba olorosa, altilla y delgada (SAGARPA, 2006). Sus hojas son reconocidas por su uso en la gastronomía y en la medicina herbolaria mexicana, sin embargo, esta planta es producida en bajas cantidades; registros del SIAP, 2019 mencionaron sólo a tres estados productores; Puebla con 1,145 toneladas, Tlaxcala con 380 y el Estado de México con 308 toneladas.

La escasa producción de esta planta se debe al bajo índice de ganancia que se obtiene al cultivarla y también a la baja demanda en los mercados ya que es común encontrarla como un ruderal, una planta de traspatio o incluso como maleza. El poco interés en su producción a alta escala ha ocasionado el desconocimiento de las plagas y enfermedades que le afectan y en consecuencia el método adecuado para su control. Un problema común de encontrar en hojas de epazote son manchas blanquecinas en ambos lados de la hoja que avanzan rápidamente hasta cubrirla por completo; debido a que la hoja de epazote es el órgano comestible o de interés para el productor, la presencia de esta enfermedad deteriora el producto y reduce las posibilidades de su comercialización. El agente causal de esta enfermedad, comúnmente llamada como “cenicilla polvorienta”, es desconocido; el objetivo de este trabajo es identificar el género y la especie del mismo y a su vez probar el efecto *in vitro* del agua electrolizada acida, neutra y alcalina en esporas de cenicilla utilizando citómetro de flujo para determinar la viabilidad.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

- Identificar el agente causal de la cenicilla polvorienta presente en el cultivo de epazote *Chenopodium ambrosioides* L.
- Evaluar el efecto *in vitro* del agua electrolizada acida, neutra y alcalina como funguicidas para el control de la cenicilla en epazote.

2.2 Objetivos específicos

- Observar los cambios estructurales en las esporas de cenilla después de la aplicación de cada tratamiento por microscopía de luz y electrónica de barrido.
- Determinar el porcentaje de viabilidad de las esporas de cenilla expuestas a diferentes tratamientos con agua electrolizada por Citometría de Flujo

3 HIPÓTESIS

- El agua electrolizada en alguno de sus tipos (oxidante, básica o neutra), puede afectar la viabilidad de las esporas de cenilla.

4 REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Cultivo de epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.)

Chenopodium ambrosioides L., familia Chenopodiace (sinon.: *Dysphania ambrosioides*, *C. anthermanticum* A. Gray., *Botrys ambrosioides* L., *Blitum ambrosioides* L.), es conocida en México como epazote o hierba del zorrillo; paico, bitia, caa-ne, en Argentina y Perú; hierba de Santa María, mastruz, en Brasil; 'worm grass', 'Mexican tea', 'fit weed', en EUA; aritasou, en Japón; simé kontwá, patois en Dominica (Gómez, 2008).

4.2 Origen y distribución del epazote

Chenopodium proviene del griego χήν (*cheén*), ganso y ποῦς (*poús*), pie, lo cual nos describe en cierto modo la forma que tienen las hojas ya que tienen 3 lóbulos. *Ambrosioides* proviene del griego Ἀμβροσία, α (*a*), prefijo de negación y βρότος (*brótos*), mortal, lo cual mitológicamente es un alimento reservado exclusivamente a los dioses del Olimpo (Takholm, 1977 como se citó en Gómez, 2008). Epazote proviene del Náhuatl *epatl*, hierba fétida, y *tzotl*, dulce, lo cual se refiere al olor tan fuerte que tiene esta hierba y que para muchos es desagradable (Takholm, 1977 como se citó en Gómez, 2008).

Chenopodium ambrosioides L. se extiende desde el norte hasta el sur de América, con mejor representación en la parte centro del continente debido a su buena aceptación, utilizada de manera tradicional por las poblaciones nativas desde la época prehispánica hasta la actualidad (Lozoya & Lozoya, 1982). La especie se extiende sobre todo en regiones templadas, tropicales y cálidas, sin embargo, el origen preciso de la especie se desconoce (Lozoya & Lozoya, 1982).

La FAO (2011) sugirió que la propagación del género *Chenopodium* se debe a su gran adaptabilidad a diversas temperaturas, tolerancia al frío y bajos porcentajes de humedad, lo que permite que las especies de este género colonicen diversos ambientes.

4.3 Clasificación taxonómica y descripción botánica

Es una planta aromática, perenne de la familia de las *Amaranthaceae*, más o menos pubescente, con el tallo usualmente postrado, olor fuerte, de aproximadamente 40 cm de altura; las hojas son oblongo-lanceoladas y serradas, de entre 4 cm de longitud y 1 cm de ancho, con pequeñas flores verdes en panículos terminales densos, cada uno con cinco sépalos; el cáliz persistente circunda al fruto, y las semillas son negras y no mayores a 0.8 mm de longitud (Gadano et al., 2006).

4.4 Generalidades de la producción del cultivo

La siembra de este cultivar se realiza al voleo, debido al tamaño tan pequeño de la semilla, se realiza a finales de invierno o principios de primavera, en el mes de marzo (Aguilar-Carpio et al., 2021). El suelo debe prepararse hasta tener una consistencia fina, se coloca la semilla y se cubre con muy poca tierra, al terminar se realiza un riego ligero; la germinación es buena, las primeras hojas aparecen a los 5 o 10 días después de la siembra; para tener una mejor distribución y control de densidad se hace un raleo a los 15 o 20 días de la emergencia (Aguilar-Carpio et al., 2021). Si la siembra fue en almacigo el trasplante es posible una vez que la planta alcanzo de 7 a 10 cm de altura y puede adaptarse bien a sustrato o a suelo, el riego debe ser diario, para plantas en invernadero con sustrato inerte como tezontle rojo, se recomienda nutrir con solución nutritiva de Steiner al 75 o 100 % (Aguilar-Carpio et al. 2021).

Para cultivo en suelo se recomienda con alto contenido de materia orgánica, suelto, y bien drenado. Antes de la siembra es recomendable un arado del terreno para que esté suelto y oxigenado (Aguilar-Carpio et al. 2021). El clima más apto es el templado y, también el templado cálido; no tolera las heladas. Crece en todo tipo de suelo, pero prefiere el arenoso (SIAP, 2020)

4.5 Problemas fitosanitarios del epazote

El cultivo de epazote suele ser tolerante a ciertas plagas y enfermedades debido a sus cualidades físico-químicas que le confieren una capacidad repelente (Vázquez-Luna et al., 2007). Algunas de las plagas observadas en el cultivo son la mosca blanca, la cochinilla algodonosa y los trips. En el caso de enfermedades se han observado daños por hongos principalmente mildiu y cenicilla. La cenicilla del epazote es una enfermedad de origen fúngico altamente agresiva debido a su velocidad de infección y su difícil erradicación.

4.6 Cenicilla polvorienta

Los hongos que provocan la cenicilla o el mildiú polvoso son parásitos biotróficos obligados del Phylum Ascomycota (Amano, 1986). La infección por este tipo de hongos se ve favorecida por la combinación alternada de alta humedad relativa y periodos de sequía. Las especies de hongos que provocan cenicilla suelen tener un rango de hospedantes muy estrecho (Amano, 1986). En conjunto, el número de hospedantes que pueden enfermar es muy alto, parasitan alrededor de 9,838 especies de plantas que pertenecen sólo a las angiospermas (Amano, 1986). El 93% de las plantas hospedantes son dicotiledóneas, mientras que el 7 % son monocotiledóneas (Takamatsu, 2013).

A diferencia de la mayoría de los patógenos fúngicos, los hongos de la cenicilla tienden a crecer superficialmente o epífitamente en las superficies de las plantas (Heffer, 2006). Durante la temporada de crecimiento, las hifas se producen en las superficies superior e inferior de las hojas, aunque algunas especies están restringidas a una sola superficie de la hoja (Heffer, 2006). Las infecciones también pueden ocurrir en tallos, flores o frutos (Heffer, 2006). Las células de absorción especializadas, denominadas haustorios, se extienden a las células epidérmicas de

la planta para obtener nutrición; si bien la mayoría de los hongos del mildiú polvoso producen micelio epífito, algunos géneros producen hifas que se encuentran dentro del tejido de la hoja; esto se conoce como crecimiento endófito (Heffer, 2006).

Las conidias (esporas asexuales) también se producen en la superficie de las plantas durante la temporada de crecimiento (Heffer, 2006). Se desarrollan individualmente o en cadenas sobre hifas especializadas llamadas conidióforos (Heffer, 2006). Los conidióforos surgen de las hifas epífitas o, en el caso de las hifas endófitas, los conidióforos emergen a través de los estomas de las hojas; al final de la temporada de crecimiento, los hongos de la cenicilla producen esporas sexuales, conocidas como ascosporas, en un asco en forma de saco encerrado en un cuerpo fructífero llamado casmotecio; el casmotecio es generalmente esférico sin abertura natural; las ascas con ascosporas se liberan cuando se desarrolla una grieta en la pared del cuerpo fructífero; este tipo de cuerpo fructífero es único entre los Ascomycota (Heffer, 2006). Puede haber una variedad de apéndices en la superficie de los casmotecios. Se cree que estos apéndices actúan como los ganchos del cierre de velcro, uniendo los cuerpos fructíferos al huésped, particularmente a la corteza de las plantas leñosas, donde pasan el invierno (Heffer, 2006). Los Ascomicetos pueden reproducirse asexualmente (anamorfo) o sexualmente (teleomorfo), fases diferenciadas que se presentan generalmente desfasadas una de la otra; no obstante, ocasionalmente y bajo ciertas condiciones, el holomorfo es observado de manera conjunta (Vega et al., 2012 como se citó en Berlanga-Padilla, 2018)

La cenicilla es una enfermedad policíclica que puede afectar la fotosíntesis, retrasar el crecimiento y aumentar la tasa de senescencia del tejido huésped (Félix-Gastelum, 2017). Las enfermedades que causan pueden ser leves o, en algunas situaciones, si no se tratan, pueden provocar graves pérdidas económicas en cultivos como manzanas, uvas, cucurbitáceas, plantas de ornato y aromáticas (Félix-Gastelum, 2017).

El agente causal de la cenicilla del epazote es desconocido por tanto el ciclo de vida de la enfermedad. En la actualidad sus técnicas de manejo se limitan al uso de productos recomendados para cenicilla en otras hortalizas.

4.7 Agua electrolizada

El agua electrolizada (AE) es un producto proveniente de una tecnología denominada “Activación Electroquímica de Soluciones” propuesta por el ingeniero Vitold Bakhir en 1972 quien, junto con un grupo de investigadores, crearon los primeros equipos formadores de sustancias electrolizadas para beneficio de la Unión Soviética; no fue hasta finales de los 80's que esta tecnología se dio a conocer al público, siendo Japón y Estados Unidos los dos países que mejor han explorado sus beneficios y en consecuencia realizan investigaciones respecto a sus posibles aplicaciones (Gomilla, 2015). Actualmente se reconoce el uso del agua electrolizada en la industria alimenticia, hospitalaria, ganadera y poco a poco en la agrícola (Tabernero de Paz, 2013).

4.8 Descripción y tipos de agua electrolizada

El agua electrolizada se obtiene por electrólisis de agua pura más una sal como el cloruro de sodio (NaCl) o una mezcla de cloruro de potasio y cloruro de magnesio (KCl-MgCl_2), la solución se coloca en una cámara de electrólisis equipada con una membrana no selectiva que divide al ánodo y el cátodo (Jardon-Xicotencatl et al., 2015). Durante la electrolisis la sal de NaCl es disuelta en el agua desionizada y se disocia en cloro (Cl^-) cargado negativamente y en sodio (Na^+) cargado positivamente (Suzuki et al., 2002). Durante la electrólisis, se forman el hidróxido (OH^-) y el hidrógeno (H^+), debido a la presencia de agua como disolvente (Suzuki et al., 2002). Se generan iones con carga negativa, Cl^- y OH^- que se mueven al ánodo para donar electrones y convertirse en oxígeno gaseoso (O_2), cloro gaseoso (Cl_2), ion hipoclorito (ClO^-), ácido hipocloroso (HOCl), y ácido clorhídrico (HCl), por otra parte se generan iones con carga positiva como el H^+ y el Na^+ que se mueven hacia el cátodo para aceptar electrones y convertirse en hidrógeno gaseoso (H_2) e hidróxido de sodio (NaOH) (Suzuki et al., 2002). El resultado de la electrolisis del agua generan tres tipos de soluciones electrolizadas (ácida, alcalina y neutra) estas difieren en sus propiedades fisicoquímicas como el potencial de hidrogeno (pH), el

potencial de óxido reducción (ORP) y el contenido de cloro activo (CCA) (Hricova et al, 2008). El agua electrolizada ácida y neutra tienen un pH de 2 y 7, respectivamente, un ORP de 1100 mV y un CCA de 10 a 90 mg/L; en diferencia el agua electrolizada alcalina tienen un pH de 10 a 13, un ORP de -800 a -900 mV y un CCA <1 ppm (Suzuki et al., 2002).

4.9 Modo de acción

El modo de acción del agua electrolizada en cualquiera de sus tipos se atribuye a sus propiedades fisicoquímicas anteriormente mencionadas; a pesar de que los tres tipos de soluciones tienen cualidades desinfectantes o bactericida existen diferencias que limita la recomendación de sus usos (Gómez-Espinoza, 2018).

El potencial de oxido reducción (ORP) es un indicador de la capacidad de una solución para oxidarse o reducirse, valores altos de ORP atribuyen una mayor fuerza oxidante (Hricova et al., 2008). El alto ORP del agua electrolizada neutra y ácida puede deberse al oxígeno liberado por la ruptura de enlaces débiles e inestables entre los radicales hidroxilo y clorhídrico (Hricova et al., 2008). El alto ORP probablemente cambia el flujo de electrones en las células. La oxidación debido al alto ORP del agua electrolizada ácida puede dañar las membranas celulares, causar la oxidación de los compuestos de sulfhidrilo en las superficies celulares y crear una interrupción en los procesos metabólicos celulares, lo que lleva a la inactivación de las células bacterianas (Hricova et al, 2008).

Hricova et al. (2008) sugirieron que niveles bajos de pH del agua electrolizada ácida reduce el crecimiento de células bacterianas provocando que estas sean más sensibles a los activos del cloro al sensibilizar su membrana externa a la entrada de HOCl. La labor del HOCl es modificar los flujos metabólicos y la producción de adenosín trifosfato (ATP), debido al cambio de flujo de electrones en la célula (Gutiérrez, 2006). Gómez-Espinoza (2018) indica que el HClO, produce la muerte celular microbiana al oxidar reacciones celulares, rutas respiratorias y grupos sulfhidrilos (-SH) de ciertas enzimas importantes en el metabolismo de los carbohidratos.

Por otra parte, el agua electrolizada neutra, o agua electrolizada de baja concentración, es una solución con pH entre 6-8, en la cual los principales agentes biocidas son el HOCl, ClO⁻, HO₂ y O₂. Debido a su pH neutro es más estable, ya que la pérdida de cloro se reduce significativamente; además, contribuye a la no corrosión de superficies metálicas (Wang et al., 2016 & Gómez-Jaimes et al. 2017)

4.10 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica analítica que permite la medida simultánea de varios parámetros de una misma partícula, las partículas deben estar en suspensión y son analizadas una a una en el seno de un flujo a una velocidad medida de 500 a 4,000 partículas por segundo (Sampedro, 1995). El flujo de partículas intercepta en su recorrido un rayo de luz muy focalizado; el impacto del rayo con cada partícula genera señales ópticas que, una vez recogidas por medio de detectores, son convertidas en señales o eventos electrónicos. Éstos son a su vez digitalizados y computarizados en milisegundos (Sampedro, 1995).

Los parámetros que pueden analizarse por citometría de flujo pueden dividirse en nucleares, citoplásmicos, de superficie y parámetros extracelulares (Barrera, 2004). Un aspecto importante y que representa una ventaja de la citometría, es la posibilidad de medir tantos parámetros como anticuerpos se dispongan para ello, marcados con distintos fluorocromos (Barrera, 2004). La señal luminosa o fluorescencia emitida por los fluoróforos o fluorocromos al ser excitados en la muestra, emitirán señales que serán recogidas y digitalizadas en una computadora (Patiño, 2022).

La variedad de fluorocromos actualmente disponibles posibilita que por medio de la citometría de flujo puedan realizarse análisis multiparamétricos no sólo de tipo estructural, sino también funcional y cinético: y así, pueden estudiarse variaciones de pH, de actividad cinética, de concentraciones iónicas o de potencial de membrana (Sampedro, 1995).

De forma general se puede decir que el análisis de partículas por medio de la citometría de flujo permite contabilizar células, estimar su tamaño relativo, conocer relativamente su complejidad estructural interna, distinguir y cuantificar su

florescencia, obtener análisis multi paramétricos con alto grado de precisión y separarlas físicamente (Sampedro, 1995).

La citometría de flujo ha sido mayormente explorada en el área médica para cuantificar el contenido de ADN (Acosta, 1995), para la identificación de células cancerígenas (Castillo,1999), para cuantificar la inestabilidad cromosómica (Barrera, 2018), entre otras muchas aplicaciones. En cambio, su uso ha sido poco estudiado en el área agrícola y veterinaria. Algunos estudios realizados en México han sido los reportados por Corona et al. (1999) con el título “Variabilidad en el contenido de ADN nuclear en chile (*Capsicum annuum* L. y *C. chinense* Jacq.) de México” en el cual estudiaron siete tipos de chile y sus cruza con 39 colectas de *C. annuum*, *C. chinense*. Otros autores como Serrato-Cruz et al. (2000) reportaron trabajos para la determinación del contenido de ADN nuclear y realizaron un recuento cromosómico para inferir el nivel de ploidía de siete poblaciones de *Tagetes* spp. Otro estudio también realizado en México es el de Palomino et al. (2010) en el que analizaron el tamaño del genoma y el cariotipo del cultivo de *Agave aktites* en Sonora.

Otra área de estudio de la citometría en el sector agrícola ha servido para medir la viabilidad de células ya sea de organismos de interés, como hongos entomopatógenos o de organismos considerados plaga de importancia. Muñoz et al. (2009) en su trabajo “Determinación de la viabilidad y daño celular en esporas de *Trichoderma harzianum* mediante citometría de flujo” evalúa la técnica de Ananta, (2005) para obtener los diferentes porcentajes de viabilidad de esporas, utilizando Ioduro de Propido para identificar las células con membrana comprometida (No viables) y CFDA para identificar las células con membrana intacta (Viables). Otro estudio relacionado con la viabilidad de esporas es el trabajo de De los Santos, (2018) en el que propuso un análisis para medir el porcentaje de viabilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* bajo del efecto de la toxina Bacilomicina D de *Bacillus amyloliquefaciens* para realizar las pruebas en citometría donde utilizó los cromóforos comerciales en kit la marca “LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability Kit”.

La técnica de viabilidad de esporas con el uso de citometría de flujo tiene potencial debido a su fácil detección y su alto grado de precisión incluso para parásitos obligados cuya manipulación es difícil de analizar debido a la nula posibilidad para obtener aislamientos (Laguado, 2007). Wattanaphansak (2005) logró determinar la viabilidad de *Lawsonia intracellularis*, una bacteria intracelular obligada causante de enteropatía proliferativa en cerdos y otras especies animales con el uso de fluorocromos FCM y DCM.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de tratamientos

El suministro de agua electrolizada acida (AEAc) y alcalina (AEA) se obtuvo de la empresa 4health con sede en Calle Poniente 146 #725, Interior 6, Industrial Vallejo, Alcandía Azcapotzalco, Ciudad de México. El agua electrolizada neutra (AEN) se obtuvo en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal (LANISAF) a partir de la combinación del AEAc y AEA. Las propiedades fisicoquímicas se midieron con un potenciómetro HANNA HI 2211 (Cuadro. 1)

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de los tipos de agua electrolizada

Tipo de AE	pH	ORP (mV)
AEAc	3.0	895
AEN	7.1	930
AEA	8.9	-215

5.2 Identificación del agente causal

5.2.1 Recolección del material

En el mes de junio del 2021 se cultivaron plantas de epazote de la variedad hojuda y fueron inoculadas manualmente mediante la dispersión de esporas en hojas sanas, combinado con la distribución alterna de plantas enfermas. Se mantuvieron en condiciones de invernadero manteniendo un riego frecuente, condiciones de

humedad de 80 % y temperaturas de entre 26-29 °C. Este proceso se repitió 4 veces durante un año para preservar inóculo.

Plantas vivas y con síntoma de cenicilla se llevaron al LANISAF para su análisis en microscopia y citometría de flujo.

5.2.2 Caracterización morfológica mediante microscopia de luz

Del material colectado se hicieron preparaciones semi permanentes utilizando agua destilada estéril y otras más con ácido láctico al 85 %, las estructuras del hongo fueron desprendidas de la hoja con cinta Schoch y analizadas en un microscopio compuesto de la marca ZEISS modelo PRIMO STAR. Se observaron y midieron 50 conidióforos, 50 conidios y 25 apresorios hifales. La identificación a nivel de género y especie se realizó siguiendo la clave de estados imperfectos de Erysiphaceae de Boesewinkel, (1980) y las claves de Braun y Cook, (2012).

5.2.3 Caracterización morfológica mediante microscopía de barrido

Plantas con síntoma se llevaron al laboratorio de microscopia del Colegio de Posgraduados, campus Montecillos. Allí se cortaron trozos de hoja de epazote con síntomas característicos de cenicilla de aproximadamente 5 mm² de diámetro, se transfirieron y mantuvieron durante 24 horas en glutaraldehído al 3 % con amortiguador de fosfatos para después ser procesadas. Los trozos de hoja fueron retirados del fijador y se lavaron tres veces con buffer de fosfato Sorensen (0.1 M pH 7.2) por 30 min y posteriormente se deshidrataron en una serie de etanoles graduales (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 %) y 100 % tres veces por 20 min. Las muestras se desecaron a punto crítico con CO₂ durante 50 min en una desecadora marca Samdri-780A en seguida se colocaron en un portamuestras de aluminio sobre cinta conductiva de carbón y se cubrieron con una fina capa de oro paladio en una ionizadora de metales FINE COAT ION SPUTTER modelo JFC – 1100. Las fotografías de las estructuras fúngicas procesadas se observaron con un microscopio electrónico de barrido JOEL modelo JSM-6390 (Bozzola y Russell, 1999).

5.2.4 Caracterización molecular. Extracción de DNA y PCR

La extracción de DNA y PCR se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal (LANISAF) en el área de Biología Molecular. Allí se llevaron plantas enfermas y mediante raspado se recolectó micelio de cenicilla de hojas de epazote, el micelio se colocó en un vial y se anido nitrógeno líquido, este se maceró y se depositó en dos tubos de microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad, posterior se le agregó a cada tubo 500 μ L de solución amortiguadora Dellaporta y se mezclaron con vórtex durante 10 s, después se pasaron a una incubadora durante 50 min manteniéndose a 65 °C. A continuación, se adiciono a cada tubo 700 μ L de cloroformo-alcohol isoamilico en concentración 24:1v/v y se agitaron en el vórtex por 10 s para después centrifugarse durante 10 minutos a 13,000 g en una microcentrífuga de la marca Centrifuge 5810R Eppendorf. La centrifuga genero un sobrenadante el cual se transfirió a nuevos tubos de microcentrífuga, se les adicionaron 700 μ L de isopropanol y se mezclaron por inversión, posteriormente se metieron a refrigeración durante 10 min a una temperatura de -20 °C, nuevamente se centrifugo cada tubo a 13,000 g durante 10 minutos, el sedimento resultante de esta centrifuga contenía el DNA, para dejarlo puro se retiró el sobrenadante. Se continuo con la adición de 500 μ L de etanol al 70 y los tubos se pasaron nuevamente a la centrifuga durante 5 minutos a 13,000 g y se desechó el sobrenadante. Para escurrir el sobrante de etanol los tubos se colocaron hacia abajo sobre papel absorbente estéril hasta observar que la pastilla del fondo del tubo estuviera seca, posteriormente se agregó 100 μ L de agua estéril libre de DNAsa y RNAsa. Para poder continuar con el análisis se cuantificó la calidad y concentración del ADN con el uso de un espectrofotómetro de la marca Nanodrop Lite (Thermo Scientific), Finalmente el ADN puro y en concentración suficiente se refrigero a -20°C durante 2 días hasta que se agendo fecha para la PCR.

Para la PCR se utilizaron los primers ITS 5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) y 4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (Camacho-Tapia, 2018). Los tubos que contenían el ADN puro se sacaron de refrigeración y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 horas, la mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 50 μ L, buffer de PCR 1x, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.8 μ M de cada primer, se

utilizó 0.04 U DNA polimerasa (Promega, EE.UU.) y 4 ng de DNA. La PCR se realizó en un termociclador modelo C-1000 de la marca (Bio-Rad, EE.UU.), se inició con una desnaturalización de 35 ciclos a 95 °C por 3 min, otra de 35 ciclos a 95 °C por 30 s, seguida de otra de 55 °C por 30 s, otra de 72 °C por 1 min; y una extensión final de 72°C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % con buffer de corrida TAE 1X. Se usó 7 µL del producto de PCR y 3 µL de buffer de carga, para llevar a electroforesis a 90 volts. El gel se analizó con luz ultravioleta con un transiluminador M-26X usando un sistema de imágenes GelDoc-It™ 300 (UVP, EE.UU.) el procedimiento de extracción y PCR se realizó de acuerdo a lo descrito por Rojas-Martínez et al. (2016), también utilizado por Nativitas (2021) en su tesis doctoral para identificar hongos de la especie *Monilinia fructicola*.

Los fragmentos amplificados con los primers ITS 5/ITS 4 fueron purificados mediante el protocolo de DNA clean & concentrator™-5 (Zymo Research, EE. UU.). Dichos fragmentos de DNA purificados se mandaron a secuenciar a Corea a la empresa Macrogen®. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos en NCBI con el software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dichas). Las secuencias se depositaron el GenBank.

5.3 Pruebas in vitro del efecto del agua electrolizada

Se realizaron dos bioensayos *in vitro*, en el primero se evaluó el efecto de los diferentes tipos de agua electrolizada sobre la morfología externa de esporas de cenicilla y en el segundo se evaluó por citometría de flujo la viabilidad de las esporas expuestas a los diferentes tipos de agua electrolizada. Los tratamientos evaluados en el primer bioensayo fueron, agua destilada estéril + 200µl de Tween 80 al 0.03%, alcohol isopropílico al 80%, agua electrolizada ácida, agua electrolizada neutra, agua electrolizada alcalina y un funguicida comercial a base de azufre elemental (LUCAFLOW, 725 g/L de i.a.); en el segundo bioensayo solo se utilizaron los tres tipos de agua electrolizada.

5.3.1 Efecto del agua electrolizada sobre la morfología de esporas de cenicilla

Mediante golpeteo de hojas se recolectaron esporas de cenicilla en cinco cajas Petri, a continuación, se agregó, en cajas distintas, una por tratamiento 5 ml de la solución de esporas y se observó el cambio en la morfología a los 30 min y a las 72 horas. Cada muestra se observó en microscopia de luz (ML) a 40x y 100x y en microscopia electrónica de barrido (MEB), el procedimiento para preparar las muestras observadas en MEB fue similar al mencionado en el apartado de 5.1.3.

5.3.2 Análisis de viabilidad de esporas mediante citometría de flujo

El primer paso fue obtener los controles positivos, para ello se colocó en tres tubos eppendor un ml de suspensión de esporas de cada tratamiento y se analizaron inmediatamente en un citómetro de enfoque acústico Attune® azul violeta (Applied Biosystems) con los cuales se identificó las señales de las esporas vivas en el equipo.

Para analizar la viabilidad se colocó en tres tubos eppendorf un ml de cada tratamiento y se analizaron para corroborar que las señales de las células vivas, como en los controles, se detectaran en el equipo en el mismo sitio del gráfico, posteriormente se adicionaron 2 µl de ioduro de propidio (IP) y se incubó en la oscuridad durante 72 horas. El número de eventos observados se estandarizó a $1,500 \pm 50$. Los datos se recolectaron en gráficos de densidad (Density Plot) analizados con el software Attune Cytometry Software.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación del agente causal

6.1.1 Síntomas de la enfermedad

Después de la infección provocada, se observó la evolución de los síntomas característicos de cenicilla en plantas de epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) (Figura 1). A los 13 días de la infección se observaron pequeñas colonias blanquecinas de 1-3 mm en la superficie adaxial de las hojas, a partir de entonces transcurrieron alrededor de 8 a 15 días para que el hongo cubriera la totalidad de la superficie de la hoja, también se observaron síntomas en la superficie abaxial pero

el avance para cubrir en su totalidad la superficie fue menor. En ningún momento se observaron síntomas en los tallos de la planta. Las hojas que se cubrieron de micelio se tornaron de color café-rojizo y se secaron, pero continuaron unidas al tallo.



Figura 1. Epazote variedad Hojuda con síntomas de cenicilla

A) Primeros síntomas visibles en forma de manchas blanquecinas circulares. B) Hoja de epazote vista desde la superficie adaxial cubierta en su totalidad por micelio blanco. C) Contraste de cobertura micelial en la superficie abaxial de la hoja de epazote. D) Planta con síntomas de cenicilla observables en todas las hojas excepto en brotes nuevos.

6.1.2 Caracterización morfológica

El agente causal de la cenicilla del epazote se caracterizó por presentar micelio hialino en la superficie de las hojas, mediante microscopia de luz (ML) se observaron y caracterizaron las estructuras reproductivas. El hongo presentó conidióforos (n=50) simples y erectos de 105-193 μm de largo x 7.6-9 μm de ancho (Figura 2A), la célula basal del conidióforo(n=30) presentó forma cilíndrica de 20-30 μm de longitud, seguidas por 3-4 células que antecedían al conidio. Los conidios(n=50) fueron hialinos y elipsoides de 14-17 μm de ancho x 37-43 μm de largo, se originaban individualmente en el ápice del conidióforo y se desprendía a su maduración (Figura 2B). También se observaron apresorios hifales(n=25) lobulados y multilobulados (Figura 2C). No se observaron las casmotecios de la fase sexual del hongo. Reforzando el proceso de identificación morfológica, bajo microscopia electrónica de barrido (MEB) se observaron conidióforos simples, sin ramificación con conidios catenados (Figura 3A), el conidio semi deshidratado presentó diferencia entre la pared externa y la pared terminal, la apariencia de la pared externa era fuertemente rugosa, arrugas anchas y rectangulares orientadas longitudinalmente (Figura 3E), la pared terminal no presentó arrugas a pesar de su apariencia semi colapsada (Figura 3B). Los conidios colapsados no presentaron diferencias en la forma del estriado (Figura 3F). Los apresorios hifales se encontraron solitarios, lobulados y multilobulados (Figura 3D).

Las características morfológicas observadas se compararon con la lectura de claves taxonómicas específicas para el orden Erysiphales propuesta con Boesewinkel (1980) las cuales asocian al hongo en cuestión con la especie *Erysiphe betae*, este resultado se reforzó con lo descrito por los autores Braun y Cook et al. (2012) y con Solano et al. (2022).

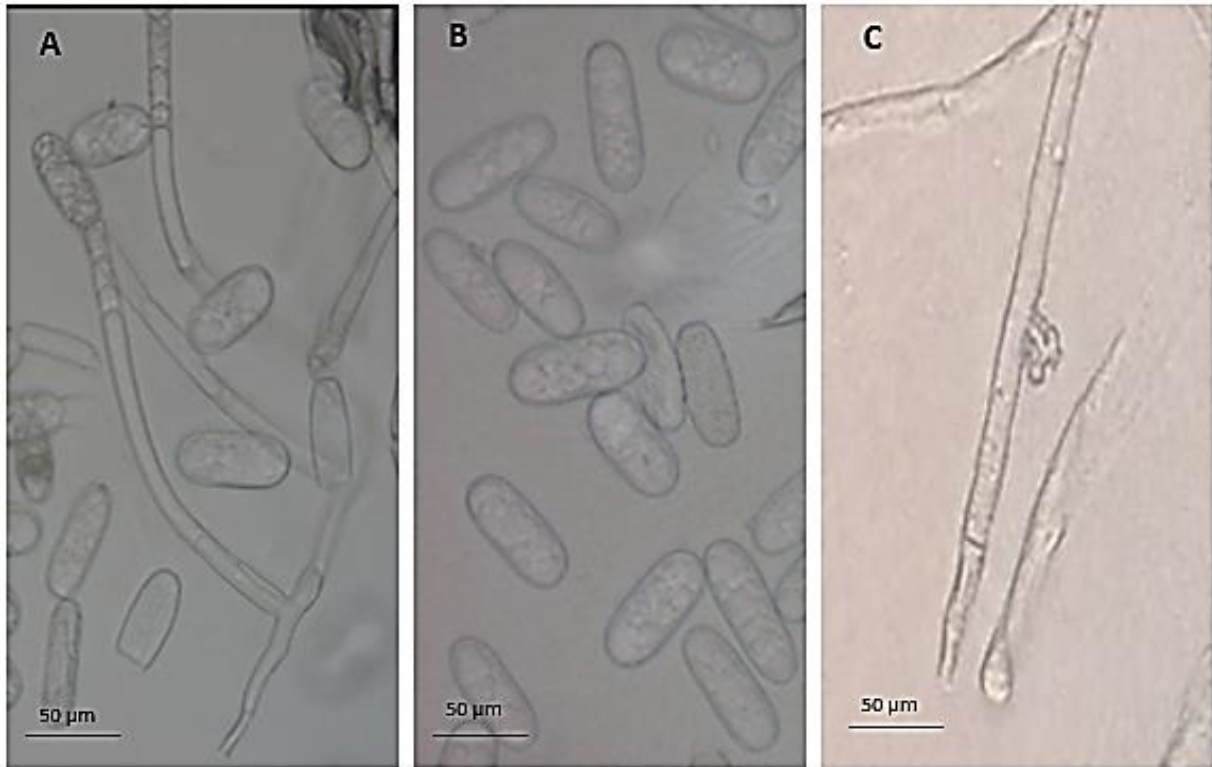


Figura 2. Micrografías con microscopia de luz del hongo *Erysiphe betae*

A) Conidióforo con conidio inmaduro. B) Conidios maduros con forma cilíndrica C) Apresorio hifal solitario multilobulado.

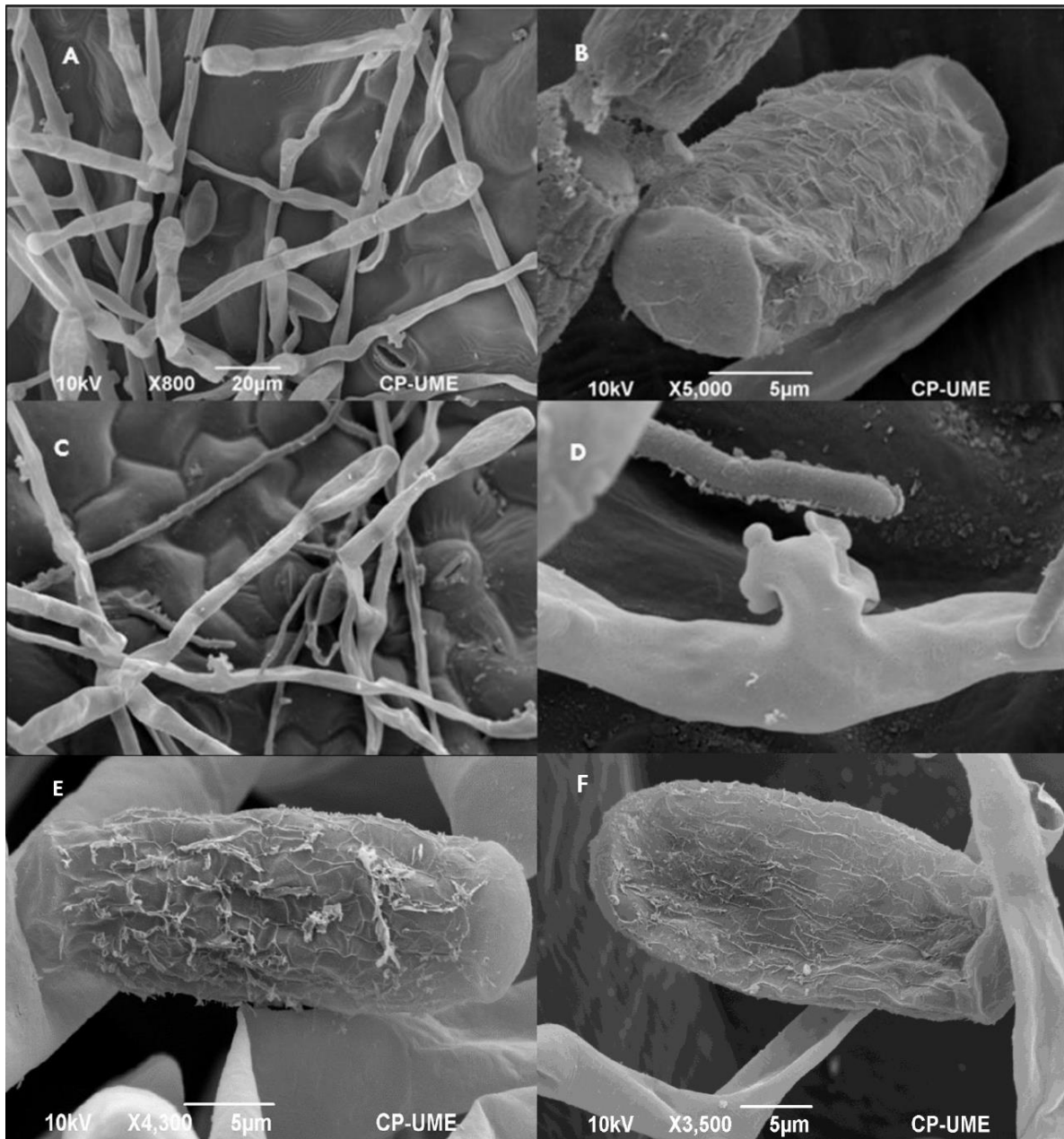


Figura 3. Micrografías con microscopia electrónica de barrido del hongo *Erysiphe betae*.

A) Conidióforo turgente con conidio inmaduro. B) Conidios maduros semi deshidratado con forma cilíndrica. C) Conidióforo deshidratado con conidios inmaduros presentes. D) Apresorio hifal solitario multilobulado E) Conidio maduro con estrías longitudinales F) Conidio deshidratado colapsado

6.1.3 Caracterización molecular

Las regiones amplificadas ITS 5 e ITS 4 presentaron un porcentaje de homología del 95 y el 96% respectivamente para la especie *Erysiphe betae*, según alineamientos en la base de datos del NCBI-BLAST (Apéndice A y B). La secuencia de nucleótidos del ejemplar fue depositada en el GenBank con el número de acceso: OP748254 (Apéndice C). Estos resultados se compararon con la secuencia obtenida para *Erysiphe betae* en acelga propuestas por Solano et al. (2023) y se encontró un alto grado de similitud.

6.2 Pruebas *in vitro* del efecto del agua electrolizada

6.2.1 Efecto del agua electrolizada sobre la morfología de esporas de cenicilla

La pared celular es una estructura esencial para la sobrevivencia de los hongos, su deterioro tiene efectos en el crecimiento, la morfología interna y estructural de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis (Pontón, 2008). Dado el papel vital que la pared celular provee se decidió observar los cambios estructurales después de someterse a distintos tratamientos, a continuación, se presentan imágenes de microscopia de luz (ML) y microscopia electrónica de barrido (MEB) que muestran el nivel de afectación de las esporas en un lapso de 72 horas.

Se considero como tratamiento testigo la suspensión de esporas con agua destilada a las 0 hrs (Figura 4A), el estado de las mismas se percibió íntegro, con apariencia turgente, los organelos que dentro la constituyen se encontraron bien distribuidos en todo el ancho de la célula y no hubo diferencia visible entre la pared celular y el interior, estas características se repitieron en todos los tratamientos observados a las 0 horas excepto en el tratamiento con esporas en suspensión con alcohol isopropílico (Figura 6A) en el que se observó una línea que se asocia con un doblés y pérdida de turgencia, también se observó una disminución en la intensidad del tono en el interior de la célula.

Estos resultados se pusieron en contraste con los observados a las 72 horas y se complementaron con observaciones en MEB. Las implicaciones observadas en esporas con agua destilada a las 72 horas (Figura 4E) (Figura 5) se describieron

como esporas colapsadas y con una separación visible entre la pared celular y el interior. Los tratamientos con agua electrolizada neutra (Figura 11) y alcalina (Figura 13) presentaron características similares, mantuvieron su turgencia, incluso dando una apariencia de hinchamiento y no se distinguió una separación entre la pared celular y el interior. En contraste, esporas con alcohol a las 72 horas (Figura 6E) (Figura 7) se observaron completamente colapsadas y sin turgencia, la línea del doblés se marcó con mayor intensidad y se relacionó al apelmazamiento del contenido interior de la célula. Las esporas con agua electrolizada ácida (Figura 8E) reflejaron un comportamiento similar al observado con el tratamiento en alcohol en el que la línea del doblés, asociada al apelmazamiento del interior de la célula, es muy notorio. Para el caso del tratamiento con azufre en ML (Figura 14E) se percibió una separación entre la pared celular y el interior, las implicaciones observadas en MEB (Figura 15) se asocian a un mayor estriado en la pared celular dando una apariencia de descamación y una disminución en la turgencia.

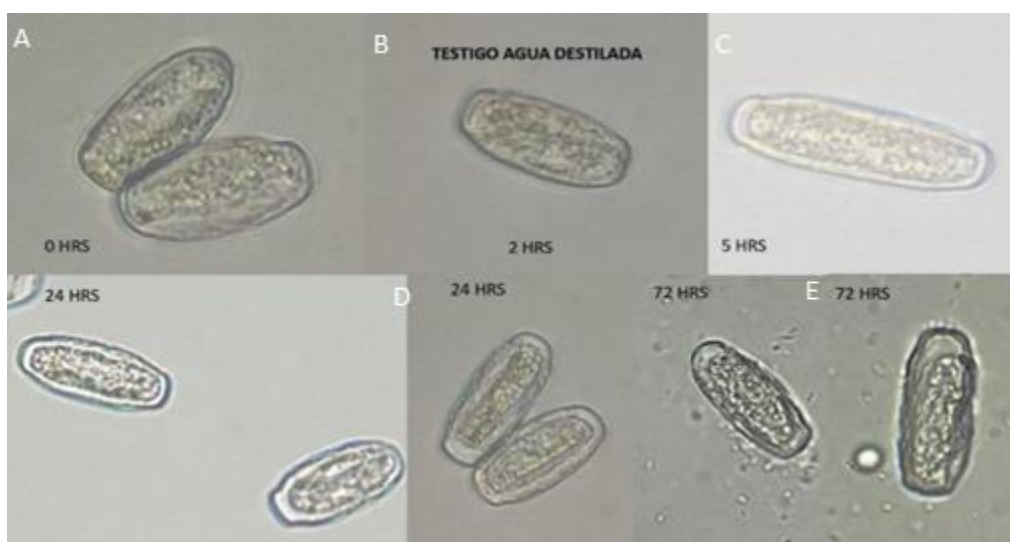


Figura 4. Esporas con agua destilada, ML

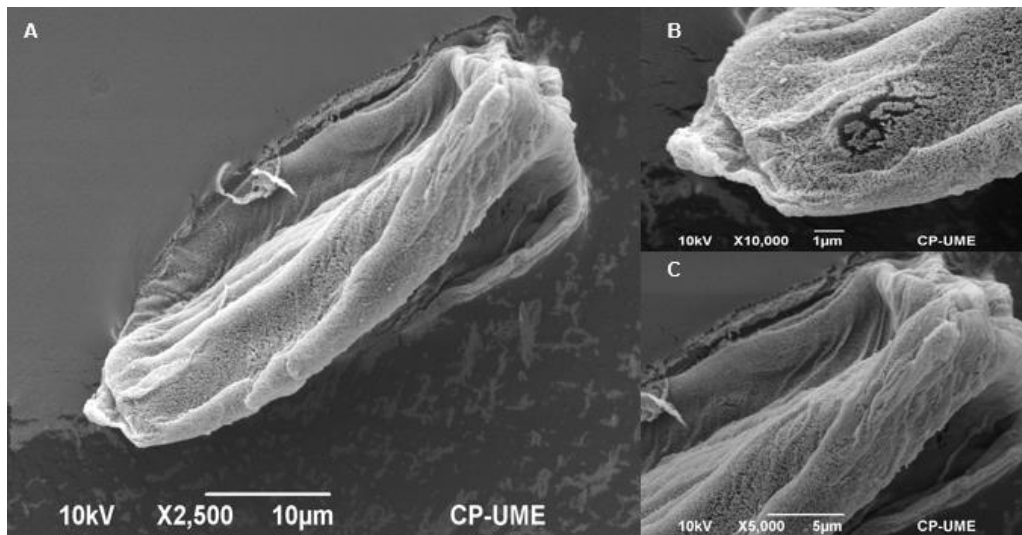


Figura 5. Esporas con agua destilada, MEB

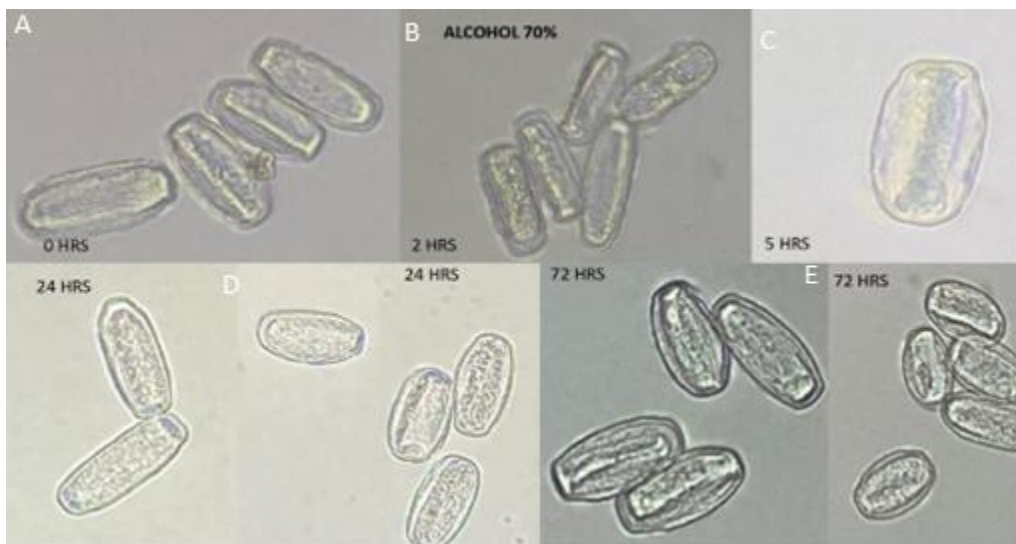


Figura 6. Esporas con alcohol, ML

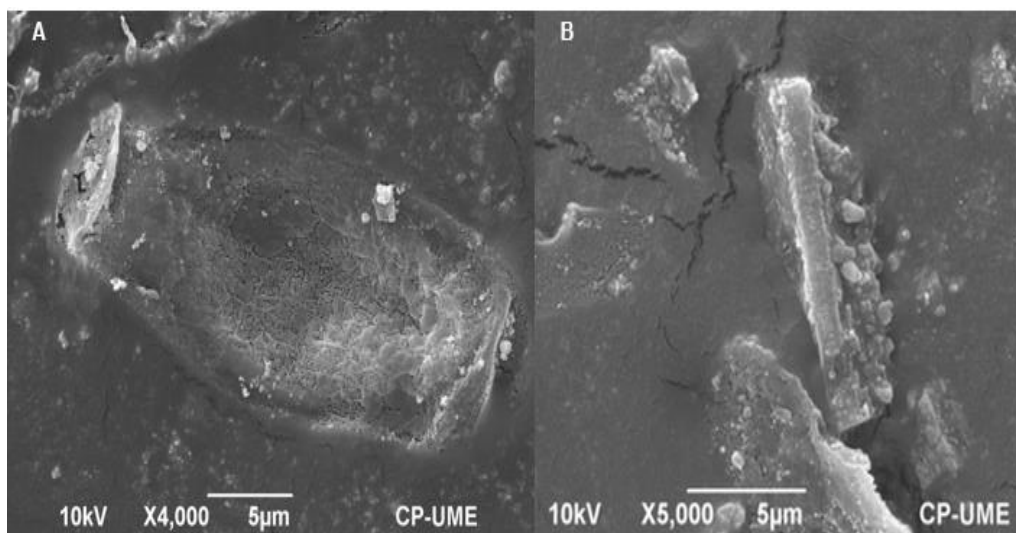


Figura 7. Esporas con alcohol, MEB

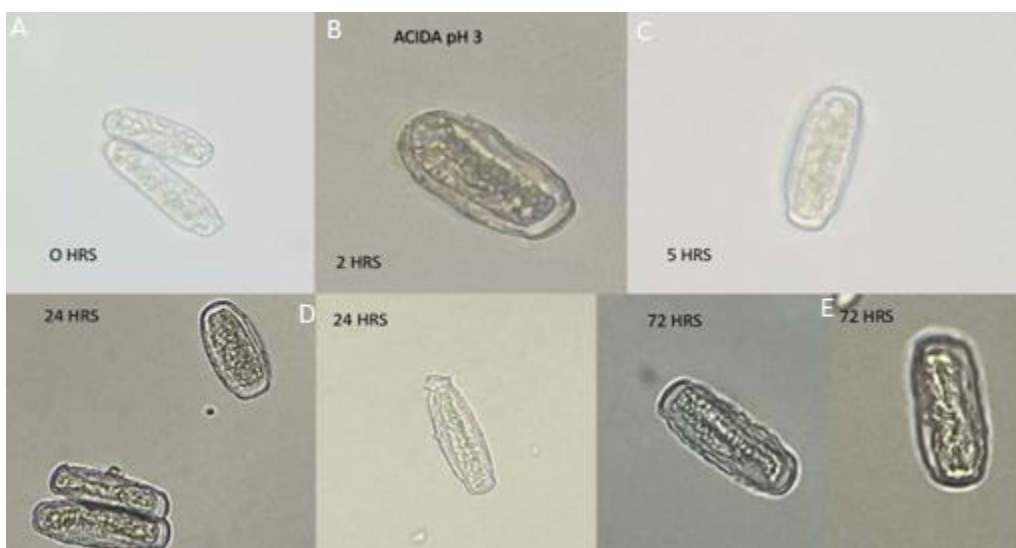


Figura 8. Esporas con agua electrolizada acida, ML

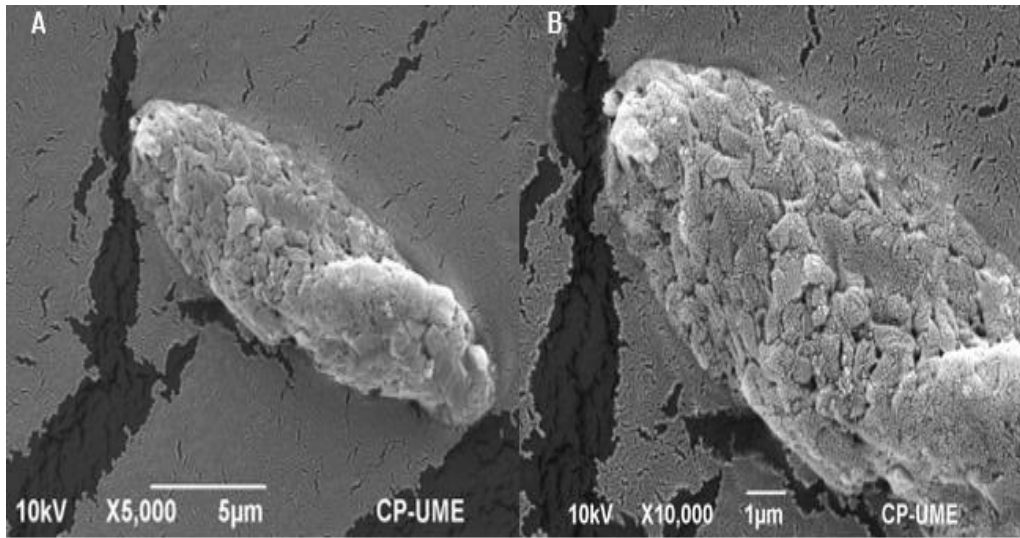


Figura 9. Esporas con agua electrolizada ácida, MEB

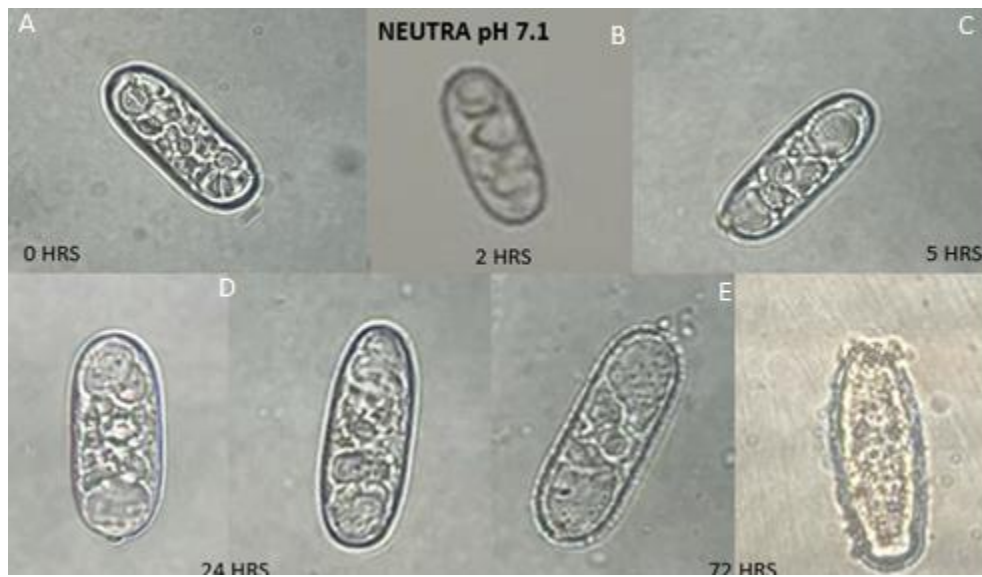


Figura 10. Esporas con agua electrolizada neutra, ML

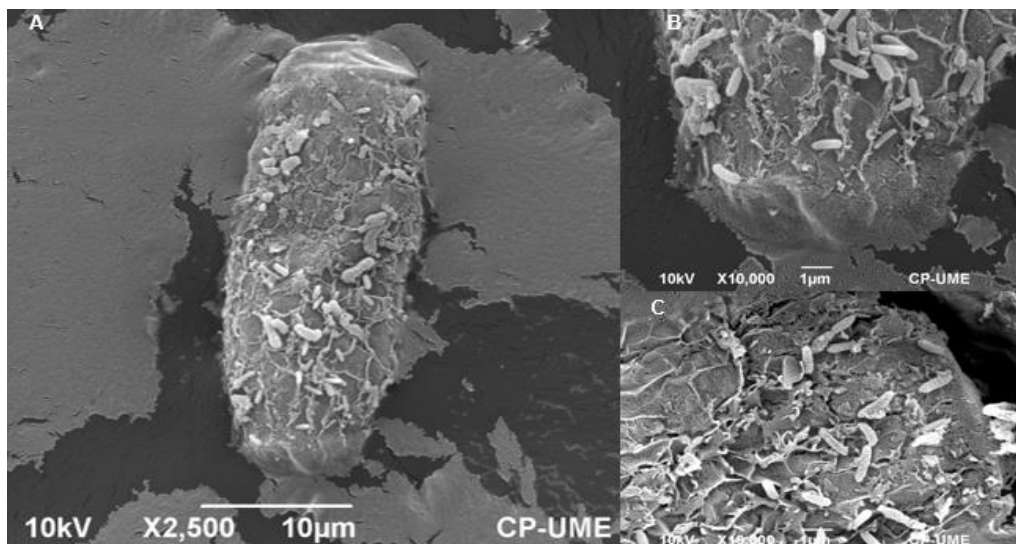


Figura 11. Esporas con agua electrolizada neutra, MEB

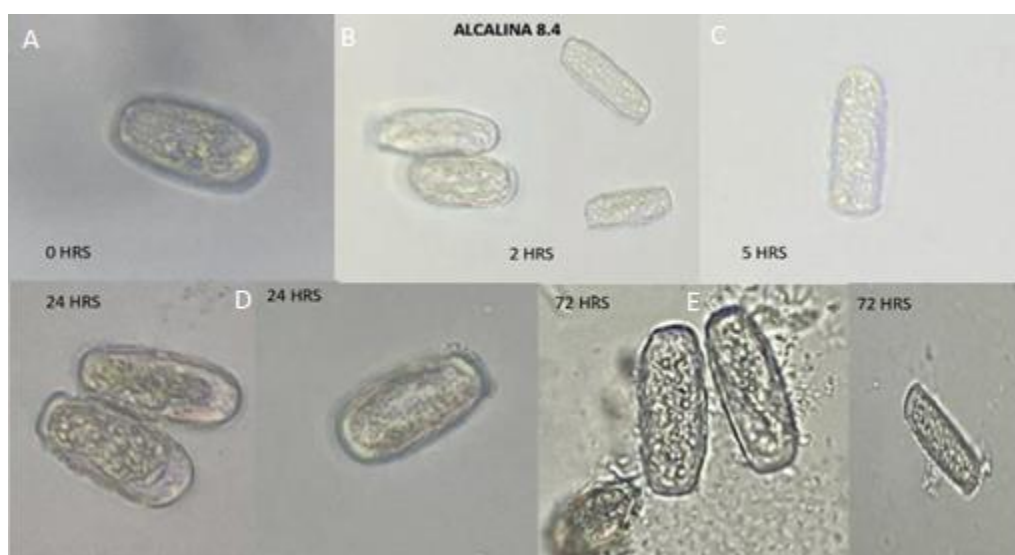


Figura 12. Esporas con agua electrolizada alcalina, ML

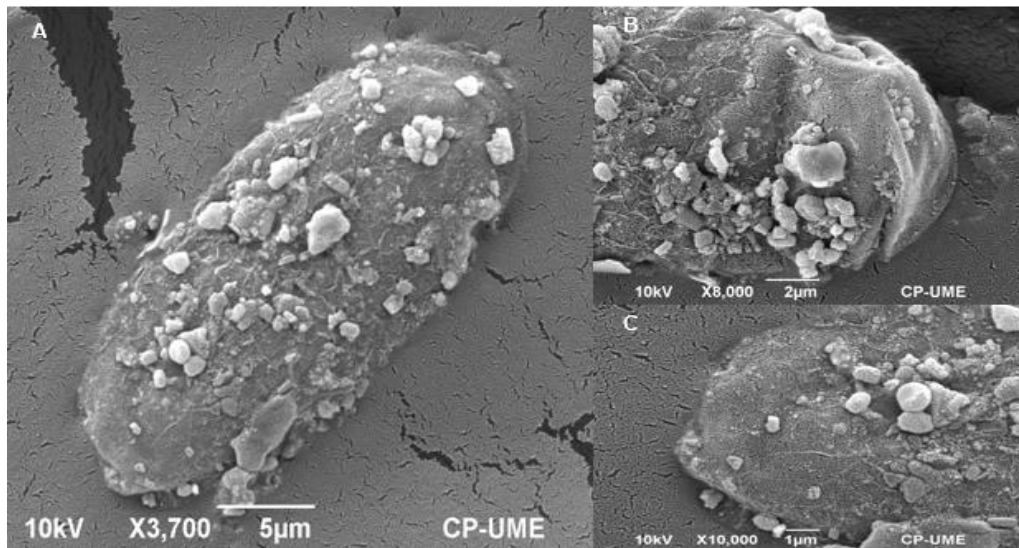


Figura 13. Esporas con agua electrolizada alcalina, MEB

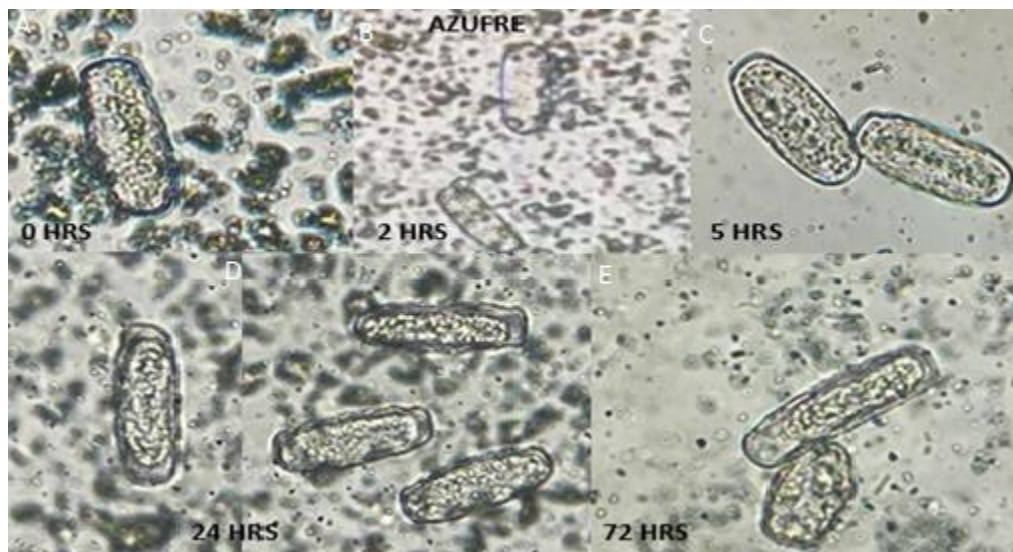


Figura 14. Esporas con azufre, ML

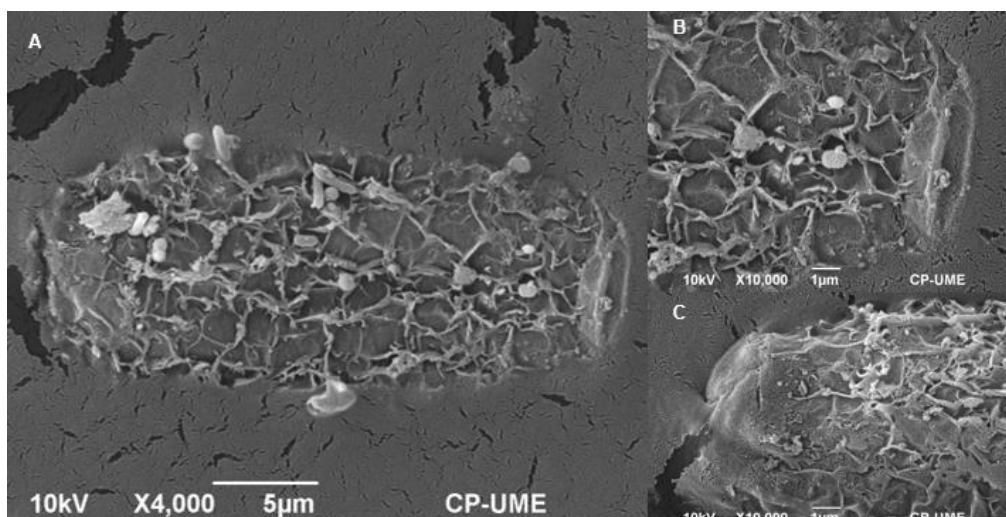


Figura 15. Esporas con azufre, MEB

Xiong et al. (2014) observaron en estudios con *Aspergillus flavus* que los cambios en las estructuras morfológicas de las células están relacionados con la permeabilidad del K^+ y Mg^{2+} de los conidios; en dicho estudio encontraron que el AEN y AEAc causaron daños en las estructuras funcionales celulares de conidios y micelios, lo que provocó una fuga acelerada de iones. Sin embargo, estos cambios en la morfología se han asociado con la síntesis de la pared celular de los conidios, la permeabilidad de la membrana celular y el metabolismo respiratorio de los conidios (Xiong et al. 2014). Esto se refuerza con lo descrito por Wadskog & Adler (2003) citado por Folch-Mallol (2004) quienes mencionaron que cuando un organismo como las levaduras se enfrenta a una situación de estrés por NaCl, su respuesta se centra en mantener una homeostasis adecuada del ion Na^+ al regular no sólo su concentración interna sino al mantener una relación alta K^+/Na^+ . Cuando esto no se cumple el Na^+ puede entrar a las células de levadura a través de los canales de K^+ (codificados por los genes TRK1 y TRK2)¹³⁷ y, parte de su toxicidad se debe a que interfiere con los procesos celulares que requieren del K^+ .

A pesar de dichos resultados se necesita más investigación para revelar qué factor importante en el AE destruye la estructura morfológica normal de los conidios.

6.2.2 Análisis de viabilidad de esporas mediante citometría de flujo

Se consideró al cuadrante II (Figura 16) como el área de colecta de esporas vivas, por consecuente los eventos que se localizaron fuera del cuadrante y se acercaron al origen del plano se consideraron como positivos a IP (no viables). Las células con membranas intactas pueden excluir colorantes de ácido nucleico, como el IP. Este tinte puede entrar en las células que tienen membranas comprometidas o dañadas, y se unen al ARN y al ADN (Ananta, 2005).

Para obtener los porcentajes de viabilidad se consideró la disminución en el número de eventos encontrados a las 0 y a las 72 horas (Cuadro 1).

Los datos tomados a las 0 horas en los diferentes tratamientos, mostraron que las esporas estaban vivas, situadas en el cuadrante II. A las 72 horas, el tratamiento con menor porcentaje de esporas vivas fue el agua electrolizada neutra (Figura 17) con 28.9 % seguido del tratamiento con agua electrolizada alcalina (Figura 18) con 49.1 %. Estos resultados evidenciaron una disminución en el tamaño y la complejidad de las células fúngicas debido al efecto de dichos tratamientos, como se observa en la Figura 17B las células migraron del cuadrante II al cuadrante III y se acercaron al origen. Los gráficos de FSC-IP y SSC-IP (Figura 17C y 17D) reforzaron los resultados, mostrando la tendencia de las células al acercarse al eje de las *y* que corresponde a células con pared celular comprometida teñidas con IP.

Por otro lado, el tratamiento con agua electrolizada ácida (Figura 19) obtuvo un 94.5 % de esporas vivas después de las 72 horas de exposición, siendo el tratamiento con menor efecto en la integridad de las células; los gráficos de SSC-IP y FSC-IP no muestran cambios en el cuadrante II.

Cuadro 2. Porcentaje de esporas de *Erysiphe betae* viables antes y después de la aplicación de tratamientos.

Tratamiento	0 horas			72 horas		
	Total	R2	%	Total	R2	%
AEN	2007	1976	98.5	2083	604	29.0
AEAc	1100	1063	96.6	2017	1907	94.5

R2 Cuadrante II, total de esporas viables.

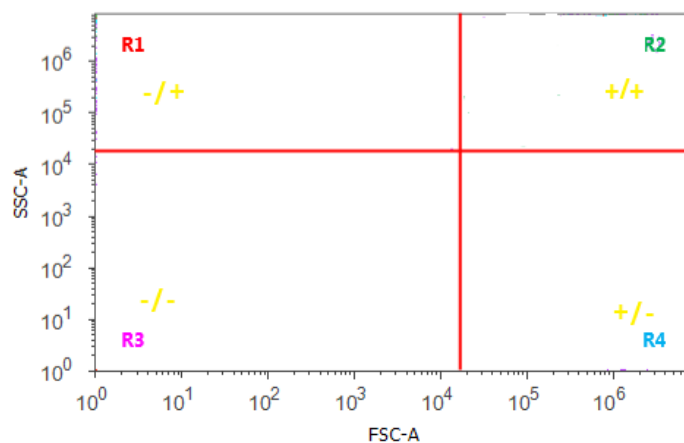


Figura 16. Grafico de densidad para la comparación de dos variables en un plano, SSC-FSC.

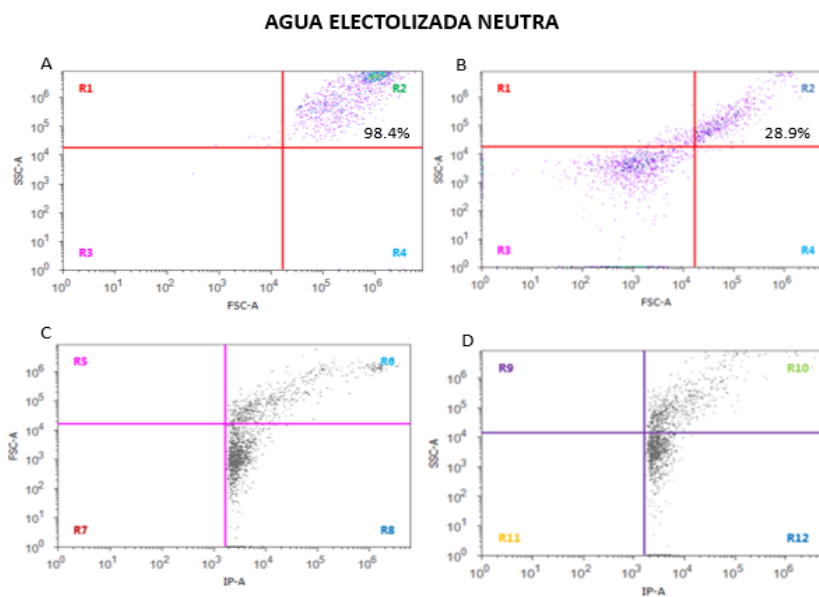


Figura 17. Diagrama de densidad de esporas antes y después de la aplicación de tratamiento, AEN.

A) SSC-FSC de esporas con tratamiento a las 0 h, B) SSC-FSC de esporas con tratamiento + IP a las 72 h C) FSC-IP de esporas con tratamiento + IP a las 72 h D) SSC-IP de esporas con tratamiento + IP a las 72 h.

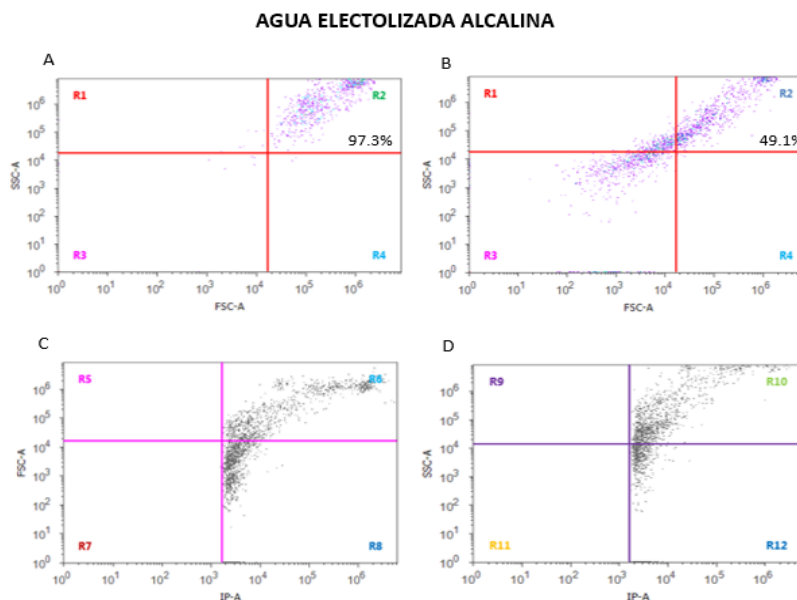


Figura 18. Diagrama de densidad de esporas antes y después de la aplicación de tratamiento, AEA.

A) SSC-FSC de esporas con tratamiento a las 0 h, B) SSC-FSC de esporas con tratamiento + IP a las 72 h C) FSC-IP de esporas con tratamiento + IP a las 72 h D) SSC-IP de esporas con tratamiento + IP a las 72 h.

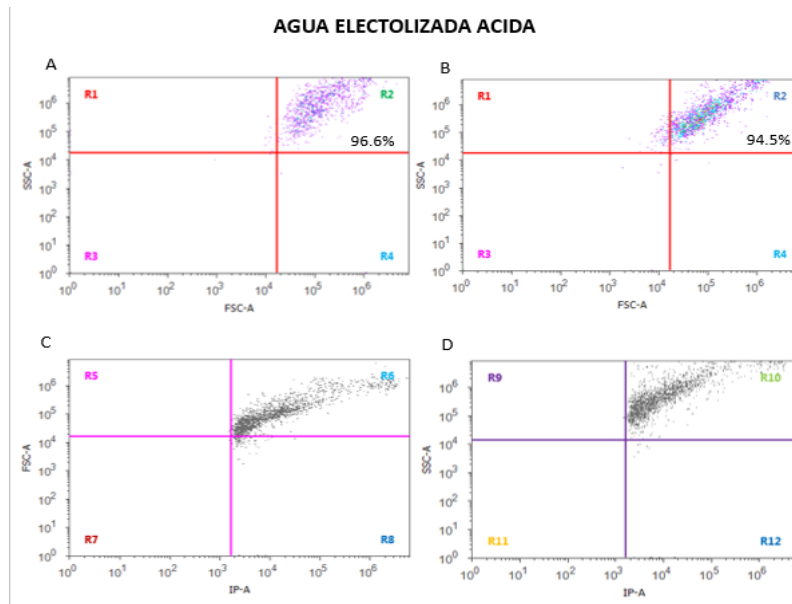


Figura 19. Diagrama de densidad de esporas antes y después de la aplicación de tratamiento, AEAc.

A) SSC-FSC de esporas con tratamiento a las 0 h, B) SSC-FSC de esporas con tratamiento + IP a las 72 h C) FSC-IP de esporas con tratamiento + IP a las 72 h D) SSC-IP de esporas con tratamiento + IP a las 72 h.

Los efectos esporicidas y fungicidas del AE dependen de las características estructurales, fisiológicas y bioquímicas de los hongos (Vázquez et al., 2016). Su pared celular está compuesta en altas proporciones de polisacáridos y proteínas. Los polisacáridos que destacan son la quitina, el glucano y el manano o el galactomanano (Pontón, 2008). Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas principalmente de quitina que constituye una barrera física a factores externos tóxicos para la célula (Vázquez et al., 2016). La sensibilidad de las células fúngicas y bacterianas a los productos químicos depende de la especie y concentración de los polisacáridos en su pared celular.

El AEN ha demostrado tener un alto potencial para el control de hongos y bacterias, su efecto se ha evaluado en *Fusarium oxysporum*, *Galactomyces geotrichum*, y *Alternaria* sp. donde se obtuvo un porcentaje de control favorable, Vázquez et al. (2016) asociaron su control al tiempo de exposición con el tratamiento y a su

concentración de cloro activo de 60 mg litro⁻¹. Xiong et al. (2014) reforzaron estas afirmaciones indicando un control favorable para *Aspergillus flavus* con AEN y AEAc, asociando al HOCl como el responsable de causar la permeabilidad iónica de la membrana celular, lo descrito por estos autores concuerda con este estudio al encontrar al agua electrolizada neutra como el tratamiento con mayor afectación a la viabilidad de esporas.

7 CONCLUSIONES

Con base en la hipótesis planteada, las técnicas de citometría de flujo y microscopia de barrido fueron útiles para confirmar que el agua electrolizada en sus diferentes tipos (oxidante, básica o neutra) tiene la capacidad de afectar la viabilidad de las esporas de cenicilla. Sin embargo, el mejor tratamiento para inhibir o reducir la viabilidad de las esporas de *Erysiphe betae* fue el agua electrolizada neutra.

Es importante tener en cuenta que esta conclusión se basa en los resultados obtenidos en este experimento. No obstante, es necesario considerar que la efectividad del tratamiento con agua electrolizada neutra puede verse influenciada por diversos factores, como los niveles de pH, ORP y la concentración de cloro libre en el momento de la aplicación, así como el tiempo de exposición y las condiciones ambientales.

8 LITERATURA CITADA

- Acosta, J., Siverio, J., Mata, J.F., Uribe, M. & Kanski, A. (1995). Carcinoma diferenciado del tiroides: valor pronóstico del contenido celular de DNA: determinado por citometría de flujo. *Revista Venezolana de Oncología*, 7(2), 78-88.
- Aguilar-Carpio, C., González-Maza, S., Juárez-López P., & Alía-Tejacal I. (2021) Análisis de crecimiento de epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) cultivado en invernadero. *Biotecnia*, 23, 113-119.
- Amano, K. (1986). *Host range and geographical distribution of the powdery mildew fungi*. Japan Scientific Societies Press.

- Ananta, E., Volkert, M., & Knorr D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15(4), 399-409. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.004>
- Barrera, L.M., Drago, M.E., Zamora, A.C., Arroyo, F.G., Sainz, T. D., & Pérez, F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 17(1), 42-55. Recuperado el 18 de mayo de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852004000100007&lng=es&tlng=es
- Barrera, L. M., Ortiz, L.D., Grisales, H., Rojas, M., & Camargo M. (2018). Citometría de flujo en reticulocitos de sangre periférica como indicador de inestabilidad cromosómica en pacientes con gliomas de alto grado. *Biomedica*, 38, 379-387.
- Berlanga-Padilla, A. M., Ayala-Zermeño, M.A., Gallou, A., Serna-Domínguez, M.G., Montesinos-Matías, R. & Arredondo-Bernal, H.C. (2018). Reporte del estado sexual de *Lecanicillium longisporum* en *Melanaphis sacchari*. *Scientia fungorum*, 47, 73-77.
- Boesewinkel, H. J. (1980). The morphology of the imperfect states of Powdery mildews (Erysiphaceae), *The Botanical Review*, 46(2), 167-224.
- Bozzola, J.J., & Russell, L.D. (1999). Electron microscopy. Principles and techniques for biologists. Jones and Bartlett publishers.
- Braun, U., & Cook, R. (2012). Taxonomic manual of the Erysiphales (powdery mildews). Central Bureau voor Schimmelcultures Biodiversity Series.
- Camacho-Tapia, M., Sánchez-Soto, V., Camara-Correia, K., Pastirčáková, K., & Tovar-Pedraza, J. M. (2018). Powdery mildew of california poppy caused by *Erysiphe eschscholziae* in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40, 461-463. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1498807>.
- Castillo, J. L., Kawaguichi, F., Madariaga, J., Venegas, O., Lecannelier, F. Ocampo, S. & Castillo, M. (1999). Aspectos que afectan el análisis de contenido de

- ADN por citometría de flujo. *Revista médica de Chile*, 127(11), 1385-1397.
<https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98871999001100014>
- Corona, T. T., García, V. A., Castillo, G. F., Montero, T. V. & Azpíroz, H. S. (1999). Viabilidad en el contenido de ADN nuclear en Chile (*Capsicum annuum* L. y *C. chinense* Jacq.) de México. *Agricultura Técnica en México*, 25(2), 115-122.
- De los Santos, C. (2018). Estudio de la toxicidad de la Bacilomicina D de *Bacillus amyloliquefaciens* en el crecimiento y viabilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* 09. (No. 13270720) [Tesis de licenciatura, Instituto de Biotecnología de la UNAM] Repositorio Dspace.
- Félix-Gastélum, R., Maldonado-Mendoza, I. E., Beltran-Peña, H. Apodaca-Sánchez, M.A., Espinoza-Matías, S., Martínez-Valenzuela, M. del C., Longoria-Espinoza, R. M., & Olivas-Peraza, N. G. (2017). Las cenicillas en cultivos agrícolas de Sinaloa: Situación actual sobre su identificación y líneas futuras de investigación. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35 (1), 106-129.
- Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F. & Covarrubias, A.A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46(1), 24-46.
- Gadano, A., Gurni, A., & Carballo, M. (2006). Argentine folk medicine: Genotoxic effects of Chenopodiaceae. *Journal of Ethnopharmacol*, 103(2), 246-251. Doi: 10.1016/j.jep.2005.08.043
- Gutiérrez, A. A. (2006). The science behind stable, super-oxidized water. *Wounds: a Compendium of Clinical Research and Practice*, 18 (1), 7-10.
- Gómez, J.R. (2008). Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7 (1), 3-9.
- Gómez-Espinosa, D. & Méndez-Albores, A. (2018, enero-junio). El agua electrolizada: Una alternativa para la desinfección y destoxificación. *Ciencia pa´Todos*, 3, 8-11.

- Gómez-Jaimes, R., Villareal-Barajas, T., Vásquez-López, A., Arteaga-Garibay, R. I., & Osuna-García, J.A. (2017). Actividad esporicida de la solución electrolizada con pH neutro en hongos de importancia poscosecha. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19, 3993-4007.
- Gomilla, J. (2015). Tecnología de electromembrana cerámica para la desinfección de aguas. [Tesis de licenciatura, Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona]. <http://hdl.handle.net/2099.1/25976>
- Heffer, V., Johnson, K.B., Powelson, M.L., & Shishkoff, N. (2015). *Identification of Powdery Mildew Fungi anno 2006*. The Plant Health Instructor. <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/labexercises/Pages/PowderyMildew.aspx>
- Hricova, D., Stephan, R., & Zweifel, C. (2008). Electrolyzed water and its application in the food industry. *Food Protection*, 71 (9), 1934-1947.
- Jardon-Xicotencatl, S., Díaz-Torres, R., Marroquín-Cardona, A., Villarreal-Barajas, T., & Méndez-Albores, A. (2015). Detoxification of aflatoxin-contaminated maize by neutral electrolyzed oxidizing water. *Toxins*, 7, 4294-4314.
- Muñoz, A.L., Jáuregui, J., Meneses, A., Galindo, E., & Serrano, L. (2009). Determinación de la viabilidad y daño celular en esporas de *Trichoderma harzianum* mediante citometría de flujo. [Resumen de la presentación de la conferencia]. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. https://smbb.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_V/CV-26.pdf
- Nativitas, I. (2021). *Mecanismos de resistencia para el manejo de Monilinia fructicola en Prunus pérsica* [Tesis de Doctorado, Colegio de Posgraduados]. Repositorio Dspace.
- Laguado, J. (2007). Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. *Revista MVZ Córdoba*, 12(2), 1077-1095.

- Lozoya, X., & Lozoya, M. (1982). *Flora medicinal de México, plantas indígenas*. Instituto mexicano de seguro social.
- Palomino, G., Martínez, J., & Méndez, I. (2005). Citotipos en *Agave angustifolia* Haw. determinados por citometría de flujo y análisis de sus cariotipos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 21 (1), 49-54.
- Patiño, L. N., & Velázquez, R. (2022). Fundamentos de citometría de flujo. *Mensaje Bioquímico*, 46, 67-77.
- Pontón, J. (2006). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 78-82.
- Rojas-Martínez, R. I., Camacho-Tapia, M., Zavaleta-Mejía, E., & Levy, J. (2016). First report of the presence of haplotypes A y B of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in chili (*Capsicum annuum* L.) in the central region of Mexico. *Journal of Phytopathology*, 98(1), 111-115. Doi: 10.4454/JPP.V98I1.031
- Sampedro, A., Martínez-Nistal, A., Toyos, J. R. (1995). *Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría*. Universidad de Oviedo.
- Serrato-Cruz, M. A., Hernández-Rodríguez, M., Savidan, Y., & Bárcenas-Ortega, N. M. (2000). Contenido de ADN y nivel de ploidía en *Tagetes* spp. utilizando citómetro de flujo. *Agrociencia*, 34(6), 729-734.
- Solano-Báez, A., Kolařík, M., Rodríguez-Mendoza, J., Bravo-Luna, L., Beltrán-Peña, H., & Márquez-Licon, G. (2023). First report of *Erysiphe betae* causing powdery mildew on chard (*Beta vulgaris* var. *cicla*) in Mexico. *Plant Disease*, 107(4). <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-22-1321-PDN>
- Suzuki, T., Noro, T., Kawamura, Y., Fukunaga, K., Watanabe, M., Ohta, M., Sugie, H., Sato, Y., Kohno, M., & Hotta, K., (2002). Decontamination of aflatoxin-forming fungus and elimination of aflatoxin mutagenicity with electrolyzed NaCl anode solution. *Agricultural and food chemistry*, 50(3), 633-641.
- Takamatsu, S. (2013). Origin and evolution of the powdery mildews (Ascomycota, Erysiphales). *Mycoscience*, 54, 75-86. Doi:10.1016/j.myc.2012.08.004

- Tabernero de Paz, M.J., Bodas, R., Bartolomé, D., Posado, R., García, J.J., & Olmedo, S. (2013). Agua electrolizada como higienizante en producción animal: efectos en sanidad y productividad. *Archivos de Zootecnia*, (61), 14-25.
- Vásquez, A., Villareal, T., & Rodríguez, G. (2016). Efectividad del agua electrolizada neutra sobre la incidencia de pudrición fúngica en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Food Protection*, 79(10), 1802-1806. Doi: 10.4315 / 0362-028X.JFP-15-494
- Vázquez-Luna, A., Pérez-Flores, L., & Díaz-Sobac, R. (2007). Biomoléculas con actividad insecticida: una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(4), 306-313.
- Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-ard, J.J., & Blackwell, M. (2012). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, (64), 171-220. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001>
- Wang, L., Xia, Q., Huang, P., & Li, T. (2016) *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*, 95, 57-61. Doi:10.7763/IPCBE.2016.V95.10
- Wattanaphansak, S., Gebhart, C., Olin, M., & Deen, J. (2005). Medición de la viabilidad de *Lawsonia intracellularis*. *National Library of Medicine*, 69(4), 265-271.
- Xiong, K., Li, X., Guo, S., Li, L., & Liu, H. (2014). The antifungal mechanism of electrolyzed oxidizing water against *Aspergillus flavus*. *Food Science and Biotechnology*, 23(2), 661-669. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0090-8>

Apéndice A. Secuencia de ADN, región ITS 4 e ITS 5.

ITS4

GTGGGGATGTCTTAACCTGATTCGAGGTCACCTGTGATCCGTGTGAGTGGACCC
AAATAGGGGTTGTTCTGGCAAGCCACCGGGCGTCACTCTGTCCCGAGAAG
CAAGTTACTACGCGTAGAGCCCACGCCGGGACCGCCCCTGTCTTTAAGG
GCCGCCGCATCGCGACCAGCCCCAACACCGCAACCCCACAACGGCGGCT
GGAGGGGGTGTATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCTCGGAATACCAAG
GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCTATGATTCATTAAATTCTGCAATTCA
CATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCCCGAGCCAAGAGA
TCCGTTGTTGAAAGTTTTATCAATTTTCATTATAAAGCTAAGACGACACAGA
CAACATGAGTTTTTGGTTGGGTCTTTGGCGGGCGCGCTCCAGTCGAAACC
GGTGGGCGGCCGACGCATGTCCAGGCGGACAGCGACTACACAGCCCGG
CCCGCCAAAGCAACTAGATACAAATCGACACGGGTGGGAGGGTCAGGCC
CAGCACGCAACATACGCCTCGACTGAGCCTCGCAATCTGTAATGATCCTT
CCGCAGGTTCAACCCTACCGAAACCTTGTGACAACATTTTACTTTCACGAAA
A

ITS5

TCAGTAAGGCGACTGAGGAGGACATTACAGAGTGCGAGGCTCAATCGTGGCGTC
TGCTGCGTGCTGGGCCGACCCTCCCACCCGTGTGATTTGTATCTTGTTG
CTTTGGCGGGCCGGGCTGCGTCGTCGCTGTCCGCCTGGACATGCGTCGG
CCGCCCACCGGTTTCGACTGGAACGCGCCCGCCTAAGACCCAACCAAAA
ACTCATGTTGTCTGTGTCGTCTTAGCTTTATAATGAAAATTGATAAACTTT
CAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATAA
CACCCCCTCCAGCTGCCGTTGTGTGGCTGCGGTGTTGGGGCTCGTCACG
ATGCGGCGGGCCCTTAAAAACAGTGGGGGTCCCGGCGTGGGCTCTACACG

TAGTAACATGGGCTCTCTAGACAGAATGACACCCGGTGGGGTGCAAGAAC
CACCCCTATTTGAGTCCCCTCACGTGGGTACAAGTTTATATCGAAACTTG
GGAGGGTACACGCCGGAACCTTTGTTACACTTTAGCTACACAAAAAATGA
AATTAATATCACTTTTGTCTTTGGTGATTAATAAATGTTTGTAGAAATTTATT
TGGAAAAAAGTCTATCTATGTGTTCCAACCGTATATGATGGGTGTTTCGTC
TTTTGCCCTTCCGTTGTTAAAAATAAAGTGAAATTAATCCCACCCCTTCCGA
AAATATCGTGTGTGTATTGGAGACTAATATGATAAAGAATGTATGAGAGTG
ATTGTATCTGTCATGCGAATGTGTATCTGTAATGTGGTGTATGTGGTGTG
TTTTGTGGTTGCAGGTCATTCCGGAAAGATGAGTATGTATTGTATATGTAG
CATGGGGAAGCGTCCACCCCCCCCCACCTGGCGATGGTGAAGGAGTTCAG
TCACCTTGAAATATGTGATACAGAAAAAGAATGGTTAAGAGACTTCTCTG
GTTGTTGTGGAGTCAATGAGCGTGAAATCTTCGTATGTTGTGATGATGTAT
GGTCGCCGCCTGCGTGATCTTCTCTATGTTTCCTGTGATGGTGTGAAGTTA
TTGGATTTTATGTAAATGTGATGGTAAGAATTGCAGTTATGTTTGACAGAG
GTGATGAATGATGTGTAGATGATGGTTACGTGATGTGATGATGGAGTGAAA
TGCGATTGAATCGTTGACTTGTATTGTTGGTTTGGTGGATGAAGGAAGTGT
GGAGGATGATGTGCTGAAGTTGTTACGTCTGAGTTAACTGATGCGTGATT
TTGATGTCTGATTAAATTGAAGGTAGATATTGGGTTGAGTTCGTGTGAAAA
TGATGGTGAATTCATTCACCTTTTCGATATGTCGATAGATGGTCGGTGGGTG
GCGGCGAAGATCGATTTCGAAAATGTTTCGTGGTCGTCGGAGCGGTGGAT
GTGATCGGTGGACATTTGTGTCGAACTCGAATCGGCGTTGGAGACGCTGG
CATCGAATTGATGAATT

Apéndice B. Búsqueda de similitud de la secuencia obtenida con BLASTN

BLASTN 2.6.0+

Reference:

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000),
"A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000;
7(1-2):203-14.

Database: Nucleotide collection (nt)
43,634,103 sequences; 150,987,822,336 total letters

Query= H220302-011_F13_I_ITS5 1 1588

Length=1588

Score E
Sequences producing significant alignments:
(Bits) Value

LC009946.1	Erysiphe betae genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S r...	894	0.0
JQ041419.1	Erysiphe betae isolate PE2 internal transcribed space...	893	0.0
KY399969.1	Erysiphe betae isolate Se1 small subunit ribosomal RN...	891	0.0
KX574674.1	Erysiphe betae voucher KUS:F29140 18S ribosomal RNA g...	891	0.0
KP717418.1	Uncultured Erysiphe clone FEPM2014 18S ribosomal RNA ...	891	0.0
KP642002.1	Uncultured Erysiphe isolate WA2014PM32 18S ribosomal ...	891	0.0
KF268348.1	Erysiphe betae isolate ZKEB001A 18S ribosomal RNA gen...	891	0.0
DQ164440.1	Erysiphe betae isolate ONT-4 internal transcribed spa...	891	0.0
DQ164437.1	Erysiphe betae isolate KIM1-6 internal transcribed sp...	891	0.0
DQ164436.1	Erysiphe betae isolate KIM1-1 internal transcribed sp...	891	0.0
DQ164432.1	Erysiphe betae isolate EB1-1 internal transcribed spa...	891	0.0
KT211366.1	Erysiphe heraclei 18S ribosomal RNA gene, partial seq...	889	0.0
KF111807.1	Erysiphe heraclei voucher KUS-F27279 18S ribosomal RN...	887	0.0
DQ164439.1	Erysiphe betae isolate KIM2-7 internal transcribed sp...	885	0.0
DQ164438.1	Erysiphe betae isolate KIM2-2 internal transcribed sp...	885	0.0
DQ164434.1	Erysiphe betae isolate FAR-2 internal transcribed spa...	885	0.0
DQ164433.1	Erysiphe betae isolate WW-14 internal transcribed spa...	885	0.0
KR269918.1	Erysiphe heraclei isolate UACH-111 internal transcrib...	883	0.0
KR048065.1	Erysiphe heraclei strain HMNWAUFU-CF2010265 internal t...	881	0.0
KU201964.1	Erysiphe heraclei culture-collection HMJAU:02287 18S ...	880	0.0
KP055630.1	Erysiphe heraclei 18S ribosomal RNA gene, partial seq...	880	0.0
HF947061.1	Uncultured Erysiphe genomic DNA containing 18S rRNA g...	880	0.0
DQ164435.1	Erysiphe betae isolate FAR-8 internal transcribed spa...	880	0.0
LC010021.1	Erysiphe heraclei genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28...	878	0.0
AB104510.1	Erysiphe heraclei genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28...	878	0.0

Apéndice C. Acceso registrada en el GenBank (OP748254.1)

Erysiphe betae cultivar *Chenopodium ambrosioides* internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: OP748254.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS OP748254 612 bp DNA linear PLN 05-
NOV-2022

DEFINITION *Erysiphe betae* cultivar *Chenopodium ambrosioides* internal
transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA
gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial
sequence.

ACCESSION OP748254

VERSION OP748254.1

KEYWORDS .

SOURCE *Erysiphe betae*

ORGANISM [Erysiphe betae](#)

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
Leotiomycetes; Erysiphales; Erysiphaceae; Erysiphe.

REFERENCE 1 (bases 1 to 612)

AUTHORS Lopez-Hernandez, I.Y., Villanueva-Verduzco, C.,
Villanueva-Sanchez, E. and Camacho-Tapia, M.

TITLE Identificación del agente causal de la Cenicienta del epazote
(*Chenopodium ambrosioides*) y su control con agua

electrolizada

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 612)

AUTHORS Lopez-Hernandez, I.Y., Villanueva-Verduzco, C.,
Villanueva-Sanchez, E. and Camacho-Tapia, M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (31-OCT-2022) Parasitología Agrícola, Universidad
Autónoma Chapingo, km. 38.5 carretera México-Texcoco, Texcoco

```

56230, Mexico
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
           Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
           ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
    source      1..612
                /organism="Erysiphe betae"
                /mol_type="genomic DNA"
                /cultivar="Chenopodium ambrosioides"
                /db_xref="taxon:62706"
    misc_RNA    <1..>612
                /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"
ORIGIN
    1 cattacagag tgcgaggctc aatcgtggcg tctgctgcgt gctgggccga ccctcccacc
    61 cgtgtcgatt tgtatcttgt tgctttggcg ggccgggctg cgtcgtcgct gtccgcctgg
    121 acatgcgtcg gccgcccacc ggtttcgact ggaacgcgcc cgcctaagac ccaacaaaaa
    181 actcatgttg tctgtgtcgt cttagcttta taatgaaaat tgataaaact ttcaacaacg
    241 gatctcttgg ctctggcatc gatgaagaac gcagcgaaat gcgataagta atgtgaattg
    301 cagaatttag tgaatcatcg aatctttgaa cgcacattgc gccccttggg attccgaggg
    361 gcatgcctgt tcgagcgtca taacaccccc tccagctgcc gttgtgtggc tgcggtgttg
    421 gggctcgtca cgatgcggcg gcccttaaaa acagtggggg tcccggcgtg ggctctacac
    481 gtagtaacat gggctctcta gacagaatga caccgggtgg ggtgcaagaa ccaccctat
    541 ttgagtcccc tcacgtgggt tacaagttta tatcgaaact tgggagggta cacgccgga
    601 actttgttac ac
//

```