

# Identification and characterization of microsatellites in isolates of *Peronospora tabacina* collected in tobacco-producing states of Mexico

## Identificación y caracterización de microsatélites en aislados de *Peronospora tabacina* recolectados en estados productores de tabaco de México

Yadira Margarita Ramos-Barraza, Isabel Cruz-Lachica, Juan Manuel Tovar-Pedraza, José Benigno Valdez-Torres, Isidro Márquez-Zequera, Luis Alfredo Osuna-García, Guillermo Gómez-González, Raymundo Saúl García-Estrada\*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, Carr. El Dorado, Km 5.5, Campo El Diez, CP 80110 Culiacán, Sinaloa, México.  
\*Corresponding autor: rsgarcia@ciad.mx

Received: June 16, 2022.

Accepted: March 05, 2023.

Ramos-Barraza YM, Cruz-Lachica I, Tovar-Pedraza JM, Valdez-Torres JB, Márquez-Zequera I, Osuna-García LA, Gómez-González G and García-Estrada RS. 2023. Identification and characterization of microsatellites in isolates of *Peronospora tabacina* collected in tobacco-producing states of Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 41(2).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-5>

First DOI publication: April 05, 2023.

Primera publicación DOI: 05 de Abril, 2023.

**Abstract.** *Peronospora tabacina* is considered the main limiting factor in tobacco production worldwide. In Mexico, information on the genetic diversity of this pathogen is scarce; therefore, the objective of this research was to evaluate 12 microsatellites in 20 isolates collected in the states of Nayarit, Chiapas, and Veracruz. PCR amplification

**Resumen.** *Peronospora tabacina* es considerado el principal factor limitante en la producción de tabaco mundialmente. En México, la información sobre la diversidad genética de este patógeno es escasa; por lo que, el objetivo de esta investigación fue evaluar 12 microsatélites en 20 aislados recolectados en los estados de Nayarit, Chiapas y Veracruz. Se realizó la amplificación por PCR y secuenciación de estos microsatélites; así como el alineamiento y comparación de las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank. Diecinueve aislados mostraron amplificación para los 12 microsatélites evaluados; mientras que, en uno de los aislados no se observó la amplificación de dos microsatélites, pudiéndose determinar que las cepas de *P. tabacina* presentes en México son genéticamente homogéneas. Se observaron regiones de dinucleótidos, la mayoría correspondientes a motivos repetidos (GT)<sub>n</sub> o variaciones (TG)<sub>n</sub>, también se visualizaron motivos (AC)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>

and sequencing of these microsatellites were performed; as well as the alignment and comparison of the sequences deposited in the GenBank database. A total of 19 isolates showed amplification for the 12 microsatellites evaluated, while in one of the isolates, the amplification of two microsatellites was not observed, it being possible to determine that *P. tabacina* isolates present in Nayarit, Chiapas, and Veracruz are genetically homogeneous. Regions of dinucleotides were observed, most corresponding to (GT)<sub>n</sub> repeat motifs or (TG)<sub>n</sub> variations, as well as (AC)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub> and (AG)<sub>n</sub> motifs. The isolates analyzed in this study can be considered products of clonal lines, therefore no genetic diversity was found in these isolates.

**Keywords:** Blue Mold, Oomycetes, PCR, Mildew, SSRs.

*Peronospora tabacina* is a pathogen that causes the disease known as blue mold or tobacco mildew. In the past, it caused significant economic losses in US crops, with estimated losses of \$250 million (Lucas, 1980). This oomycete infects primarily the aerial parts of plants, such as leaves. However, under favorable environmental conditions, it can infect any stage of the crop and cause systemic infections (Milholland *et al.*, 1981; Spurr and Todd, 1982; Caiazza *et al.*, 2006). Its most common reproductive structures are asexual, known as sporangiophores or sporangia, containing multiple diploid nuclei. These sporangia are produced massively and are easily dispersed by wind, being the main means of reproduction and spread of this pathogen (Hall, 1989; Spring *et al.*, 2018). Under optimal environmental conditions, this pathogen can produce over  $10^5$  sporangia/cm<sup>2</sup> in a single lesion (Cohen, 1976).

y (AG)<sub>n</sub>. Los aislados analizados en este estudio, pueden considerarse productos de líneas clonales por lo que no se observó diversidad genética en dichos aislados.

**Palabras clave:** Moho azul, Mildiu, Oomicetes, PCR, SSRs.

*Peronospora tabacina* es un patógeno que causa la enfermedad conocida como moho azul o mildiu del tabaco y que históricamente ocasionó pérdidas económicas importantes como lo acontecido en cultivos de EE. UU. en donde se observaron pérdidas estimadas en \$250 millones de dólares (Lucas, 1980). Éste oomicete infecta principalmente las partes aéreas de las plantas como las hojas, pero si las condiciones ambientales le favorecen también puede afectar cualquier etapa fenológica del cultivo y ocasionar infecciones sistémicas (Milholland *et al.*, 1981; Spurr y Todd, 1982; Caiazza *et al.*, 2006). Sus estructuras de reproducción asexual conocidas como esporangióforos y esporangios que contienen múltiples núcleos diploides son las más comunes. Dichos esporangios se producen masivamente y son fácilmente dispersados por el viento y son el principal medio de reproducción y propagación de éste patógeno (Hall, 1989; Spring *et al.*, 2018). En condiciones ambientales óptimas, éste patógeno es capaz de producir más de  $10^5$  esporangios/cm<sup>2</sup> en una sola lesión (Cohen, 1976).

A pesar de la importancia de éste patógeno, son pocos los estudios realizados para conocer su biología y genética poblacional; lo que puede deberse a la dificultad que representa trabajar con un patógeno parasito obligado y que dificulta también caracterizarlo y obtener un número adecuado de aislados (Derevnina *et al.*, 2015; Nowicki *et al.*, 2022).

Despite its importance, few studies have investigated the biology and population genetics of this pathogen. This may be because it is an obligate parasite, which makes it difficult to characterize and obtain a sufficient number of isolates (Derevnina *et al.*, 2015; Nowicki *et al.*, 2022).

Genetic variation studies in plant pathogen populations have become increasingly important due to the availability of several molecular markers. These studies have applications in detection, diagnosis, taxonomy, epidemiology, and population structure, each requiring different sampling, genetic markers, and analyses (Milgroom, 1997). Moreover, genotypic diversity measurements and patterns within populations can infer clonality or recombination (Milgroom, 1996).

DNA markers are widely used for analyzing plant pathogen population dynamics due to their high precision (Milgroom and Peever, 2003). Microsatellites, also known as Simple Sequence Repeats (SSRs), are one of the available molecular markers that offer significant advantages. They consist of short DNA sequences of 1 to 6 nucleotides, repeated a certain number of times in tandem, and are abundant in the genomes of most eukaryotic organisms (Gupta *et al.*, 1996). Microsatellite analysis uses the PCR technique, requires small amounts of DNA, and its codominant nature makes microsatellites one of the most preferred markers for marker-assisted selection programs and genetic mapping and diversity studies (Gupta *et al.*, 1996; Jarne and Lagoda, 1996). Microsatellites are ideal for obtaining the genetic identification and fingerprinting of many organisms, including fungi and oomycetes, that show high polymorphism.

Several studies have aimed to characterize microsatellites of *Peronospora tabacina*. One such study was conducted by Trigiano *et al.* (2012), in which 10 microsatellite loci were characterized in 44 isolates of this pathogen collected from various

Los estudios de variación genética en poblaciones de patógenos de plantas han aumentado de relevancia en los últimos tiempos, debido a que actualmente existen varios marcadores moleculares disponibles. Algunas de las aplicaciones del estudio de la variación genética en la patología vegetal son la detección, diagnóstico, taxonomía, epidemiología y estructura de la población y cada una de éstas requiere diferentes tipos de muestreo, marcadores genéticos y análisis (Milgroom, 1997). A su vez, la medida y patrones de diversidad genotípica dentro de las poblaciones se pueden utilizar para inferir si las poblaciones son clonales o han experimentado recombinación (Milgroom, 1996).

Los marcadores de ADN son utilizados ampliamente para analizar la dinámica de las poblaciones de los patógenos de plantas debido a sus altos niveles de precisión (Milgroom y Peever, 2003). Entre los marcadores moleculares disponibles, los microsatélites, también llamados secuencias simples repetidas (SSRs, Simple Sequence Repeats), ofrecen apreciables ventajas, ya que son secuencias cortas de ADN de 1 a 6 mono-, di-, tri-, tetra-, o pentanucleótidos, repetidos cierto número de veces o en tandem y se encuentran en abundancia dentro de los genomas de la mayoría de los organismos eucariotas (Gupta *et al.*, 1996). Esta metodología se basa en la técnica de PCR y requiere pequeñas cantidades de ADN y su naturaleza codominante hace de los microsatélites uno de los marcadores más escogidos para los programas de selección asistida por marcadores y para los estudios de mapeo genético y de diversidad (Gupta *et al.*, 1996; Jarne y Lagoda, 1996). Por todo esto, los microsatélites son ideales para obtener la identificación y la huella genética de muchos organismos, incluyendo a los hongos y oomicetes debido a su alto polimorfismo.

Existen algunos estudios que han tenido como objetivo caracterizar microsatélites de *Peronospora tabacina*, tal es el caso del estudio realizado por

regions of the world. The microsatellite loci were found to be polymorphic. Polymorphism is the genetic variation through time in populations, resulting from some type of mutation. The amplification of these microsatellites allows visualizing or indicating the presence of allelic variants, which is essential for distinguishing groups, populations, isolates, species, or higher taxonomic groups, identifying the source of populations, estimating population divergences, and identifying the gene flow between natural banks or seedbeds. Furthermore, seven of the ten microsatellites characterized in the study by Trigiano *et al.* (2012) were evaluated by Nowicki *et al.* (2022), who added two additional microsatellites to their analysis to assess the genetic diversity in 122 *P. tabacina* isolates. Thus, the objective of the present study is to identify and characterize molecular microsatellites in isolates of *Peronospora tabacina* collected from tobacco fields distributed across three producing states in Mexico, using 12 microsatellites.

Leaf samples with blue mold symptoms and pathogen signs were collected from commercial tobacco fields in Nayarit, Chiapas, and Veracruz, Mexico, between 2018 and 2021. Samples were taken to the Phytopathology Laboratory of the Research Center for Food and Development Culiacán Unit, where they were air-dried daily and stored between newspapers.

DNA extraction from each *P. tabacina* isolate was performed using the CTAB method according to the method reported by Voigt *et al.* (1999). The quantification of the obtained DNA was carried out using a Nanodrop One (Thermo Scientific, USA). A polymerase chain reaction (PCR) was initially performed for genotyping and confirmation of the genus and species of *P. tabacina* using the specific oligonucleotides PTAB and ITS4 under specific conditions described by Ristaino *et al.* (2007).

Trigiano *et al.* (2012) en donde se caracterizaron 10 loci de microsatélites en 44 aislados de este patógeno recolectados de diversas regiones del mundo, los cuales fueron polimórficos; es decir, la amplificación de éstos microsatélites permite visualizar o indicar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de mutación establecida en las poblaciones a través del tiempo evolutivo; dicha variación genética detectada es conocida como polimorfismo y es la que permite separar grupos, poblaciones, aislados, especies o grupos taxonómicos mayores, identificar la fuente de las poblaciones, estimar divergencias poblacionales e identificar el flujo genético entre bancos naturales o semilleros. A su vez, siete microsatélites de los 10 caracterizados en el estudio de Trigiano *et al.* (2012) se evaluaron por Nowicki *et al.* (2022) quienes adicionaron a su análisis otros dos microsatélites, con los que evaluaron la diversidad genética en 122 aislados de *P. tabacina*. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue identificar y caracterizar microsatélites moleculares en aislados de *Peronospora tabacina* recolectados en campos con tabaco distribuidos en tres estados productores en México, mediante el uso de 12 microsatélites.

Durante los años de 2018 a 2021, se recolectaron muestras de hojas de tabaco con la presencia de síntomas de moho azul y signos del patógeno, en campos comerciales distribuidos en las regiones tabacaleras de Nayarit, Chiapas y Veracruz, México. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad Culiacán y posteriormente, se preservaron entre papel periódico y se airearon cada 24 h hasta su secado y posterior uso.

La extracción de ADN de cada uno de los aislados de *P. tabacina* se realizó mediante el método de CTAB de acuerdo a la metodología reportada por Voigt *et al.* (1999). La cuantificación del ADN

Subsequently, the amplification and genotyping of 12 microsatellites were performed using the method proposed by Trigiano *et al.* (2012) and Nowicki *et al.* (2022). The PCR was carried out in a 15  $\mu\text{L}$  reaction volume using 7.5  $\mu\text{L}$  of Master Mix, 1  $\mu\text{L}$  of each oligonucleotide, 4.5  $\mu\text{L}$  of water, and 1  $\mu\text{L}$  of DNA (15  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ). The amplification conditions were as described by Trigiano *et al.* (2012). The amplified products were separated in 2% agarose gels stained with Gel Red and run in an electrophoresis chamber (BioRad, USA) at 80 V for 60 min. The expected amplicons were visualized using a Gel Doc™ XR + Imaging System photodocumentor (BioRad, USA). The purification of the amplicons was performed using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, USA) following the manufacturer's instructions.

The purified DNA products were sent for sequencing to the National Laboratory of Agricultural, Medical and Environmental Biotechnology located in San Luis Potosí, S.L.P. The obtained DNA sequences were manually aligned and edited using BioEdit Sequence Alignment Editor Software Version 7.2.5.0 (Hall, 2011). Subsequently, the consensus sequences obtained were compared with the sequences deposited in the GenBank Overview NCBI database.

A total of 20 isolates of *Peronospora tabacina* were collected from different tobacco fields in Nayarit, Veracruz, and Chiapas (Table 1). The PCR technique was used to process the 20 isolates using the specific oligonucleotide pairs PTAB and ITS4 for *P. tabacina*, resulting in a 764 bp fragment in each isolate, which confirmed the identity of the oomycete under study.

According to the analysis of the amplification of the 12 microsatellites evaluated, 19 isolates showed 100% amplification for all microsatellites evaluated. For isolate Pt14Ta from Tantoyuca,

obtenido se llevó a cabo en un Nanodrop One (Thermo Scientific, EE. UU.). En un primer paso, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa para la genotipificación y confirmación del género y especie de *P. tabacina* mediante la utilización de los oligonucleótidos específicos PTAB e ITS4, considerando las condiciones específicas descritas por Ristaino *et al.* (2007). Posteriormente, la amplificación de 12 microsatélites y genotipificación de los mismos se realizó utilizando la metodología propuesta por Trigiano *et al.* (2012) y Nowicki *et al.* (2022). La PCR se realizó en un volumen de reacción de 15  $\mu\text{L}$  utilizando por reacción 7.5  $\mu\text{L}$  de Master Mix, 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido, 4.5  $\mu\text{L}$  de agua y 1  $\mu\text{L}$  de ADN (15  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ). Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Trigiano *et al.* (2012). Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 2% teñidos con Gel Red y se corrieron en una cámara de electroforesis (BioRad, EE. UU) con 80 V durante 60 min. La visualización de los amplicones esperados se realizó en un fotodocumentador Imager Gel Doc™ XR + Imaging Sistem (BioRad, EE. UU.). La purificación de los amplicones se realizó con el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EE. UU.), de acuerdo a las instrucciones sugeridas por el fabricante.

Los productos de ADN purificados se enviaron para su secuenciación al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental, ubicado en San Luis Potosí, S. L. P. Las secuencias de ADN obtenidas se alinearon y editaron manualmente usando el Software BioEdit Sequence Alignment Editor Versión 7.2.5.0 (Hall, 2011). Posteriormente las secuencias consenso obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank Overview NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Se recolectaron un total de 20 aislados de *Peronospora tabacina* de diferentes campos de cultivo

**Table 1. Isolates of *Peronospora tabacina* collected from tobacco plants with the presence of blue mold.**

**Cuadro 1. Aislados de *Peronospora tabacina* recolectados de plantas de tabaco con presencia de moho azul y utilizadas en este estudio.**

ID Aislados	Localización	Coordenadas
Pt1SA	San Andrés, Tuxtla, Ver.	18°25'49"N95°9'14"O
Pt3SA	San Andrés, Tuxtla, Ver.	18°25'17"N95°9'34"O
Pt4SA	San Andrés, Tuxtla, Ver.	18°25'22"N95°9'32"O
Pt5SA	San Andrés, Tuxtla, Ver.	18°25'37"N95°9'27"O
Pt6SA	San Andrés, Tuxtla, Ver.	18°25'25"N95°9'58"O
Pt7SA	San Andrés, Tuxtla, Ver.	18°25'41"N95°9'53"O
Pt8SA	San Andrés, Tuxtla, Ver.	18°25'47"N95°9'2"O
Pt9SA	San Andrés, Tuxtla, Ver.	18°25'35"N95°9'10"O
Pt10SA	San Andrés, Tuxtla, Ver.	21°17'23"N98°17'35"O
Pt11SA	San Andrés, Tuxtla, Ver.	21°17'12"N98°17'40"O
Pt13Ta	Tantoyuca, Ver.	21°18'12"N98°21'54"O
Pt14Ta	Tantoyuca, Ver.	21°18'13"N98°21'56"O
Pt15Ta	Tantoyuca, Ver.	21°18'3"N98°21'24"O
Pt16Na	Santiago Ixcuitla, Nay.	21°43'40"N105°15'13"O
Pt17Na	Santiago Ixcuitla, Nay.	21°43'18"N105°15'35"O
Pt18Na	Santiago Ixcuitla, Nay.	21°43'20"N105°15'20"O
Pt19Na	Acaponeta, Nay.	22°29'21"N105°28'8"O
Pt20Na	Rosamorada, Nay.	21°57'48"N105°13'8"O
Pt21Ch	Congregación Reforma, Tapachula, Chis.	14°47'31"N92°18'3"O
Pt22Ch	El Manzano, Tapachula, Chis.	14°45'40"N92°18'16"O

Veracruz, amplification was not observed for two of the 12 oligonucleotide pairs evaluated (Table 2). The isolate was thus considered a partially clonal strain.

To confirm the results, the 12 microsatellite amplicons were sequenced for isolates Pt7SA and Pt16Na, and the consensus sequences obtained were compared with sequences deposited in GenBank.

The consensus sequences showed identity percentages ranging from 95.83 to 100% (Table 3) compared to the sequences of the *P. tabacina* isolates from the study by Trigiano *et al.* (2012). It should be mentioned that for the oligonucleotide pairs of the microsatellites PT034, PT041, and PT056, poor quality was observed in the obtained sequences even though they were performed in triplicate, so it can be considered that there is some problem with

de tabaco de Nayarit, Veracruz y Chiapas (Cuadro 1). Se realizó la técnica de PCR para procesar los 20 aislados, utilizando los pares de oligonucleótidos específicos PTAB e ITS4 para *P. tabacina*, visualizando un fragmento de 764 pb en cada uno de los aislados, corroborando la identidad del oomicete en estudio.

De acuerdo al análisis de la amplificación de los 12 microsatélites evaluados, 19 aislados mostraron 100% de amplificación para todos los microsatélites evaluados; mientras que, para el aislado Pt14Ta proveniente de Tantoyuca, Veracruz no se observó la amplificación para dos de los 12 pares de oligonucleótidos evaluados (Cuadro 2), considerándose como una cepa parcialmente clonal.

Con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos, los 12 amplicones de los microsatélites

**Table 2. Amplification of 12 microsatellites in 20 isolates of *Peronospora tabacina* collected in Mexico.**  
**Cuadro 2. Amplificación de 12 microsatélites en 20 aislados de *Peronospora tabacina* recolectados en México.**

Oligonucleótidos	Muestras																			
	Pt1 Sa	Pt3 Sa	Pt4 Sa	Pt5 Sa	Pt6 Sa	Pt7 Sa	Pt8 Sa	Pt9 Sa	Pt10 Sa	Pt11 Sa	Pt13 Ta	Pt14 Ta	Pt15 Ta	Pt16 Na	Pt17 Na	Pt18 Na	Pt19 Na	Pt20 Na	Pt21	Pt22
PT034	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PT041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PT002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PT004	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>PT007</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PT014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PT028	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PT032	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>PT047</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PT048	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PT054	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PT056	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

their design. In all the evaluated isolates in this study, the sequences (100%) of the microsatellites comprised dinucleotide regions (Table 4), mostly corresponding to repeated motifs or structures (GT)<sub>n</sub> or variations (TG)<sub>n</sub>. Motifs (AC)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>, and (AG)<sub>n</sub> were also visualized, and these were perfect repetitions since the sequences were not interrupted by non-repeated nucleotides.

With the obtained data, it was determined that the *P. tabacina* isolates present in the tobacco fields of the main producing states in Mexico are genetically homogeneous since the amplification of the reference microsatellites was observed in the 20 isolates evaluated in this study. Likewise, in a study by Edreva *et al.* (1998), it was observed that *P. tabacina* isolates collected in Europe (France and Bulgaria) between 1978 and 1992 were genetically stable. These results were supported by the observation of a high similarity of the isoenzyme patterns of natural populations of the pathogen and the non-significant changes in these patterns. Similarly, Zipper *et al.* (2009) also reported genetic uniformity in European isolates of *P. tabacina*.

evaluados se secuenciaron para los aislados Pt7SA y Pt16Na y las secuencias consenso obtenidas se compararon con secuencias depositadas en el GenBank.

Las secuencias consenso mostraron porcentajes de identidad que van de 95.83 a 100% (Cuadro 3) comparadas con las secuencias de los aislados de *P. tabacina* del estudio de Trigiano *et al.* (2012). Cabe mencionar que, para los pares de oligonucleótidos de los microsatélites PT034, PT041 y PT056, se observó mala calidad en las secuencias obtenidas aun cuando éstas se realizaron por triplicado, por lo que se puede considerar que existe algún problema con el diseño de los mismos.

En el total de los aislados evaluados en este estudio, las secuencias (100%) de los microsatélites comprendían regiones de dinucleótidos (Cuadro 4), la mayoría correspondientes a motivos o estructuras repetidas (GT)<sub>n</sub> o variaciones (TG)<sub>n</sub>, también se visualizaron motivos (AC)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub> y (AG)<sub>n</sub>, observándose que estas eran repeticiones perfectas ya que las secuencias no estaban interrumpidas por nucleótidos no repetidos.

**Table 3. Microsatellite sequences and percentage identity compared with sequences deposited in GenBank.  
Cuadro 3. Secuencias de microsatélites y porcentaje de identidad comparadas con secuencias depositadas en el GenBank.**

Locus	Secuencias consenso	No. de accesoión
PT002	CTGAACCATACGATGACCCCATGGACCGCAGGGCACGTCACGGGCT CTTGACGAAGAAAACGACAATGACTGAAGGACGTCGAGTCGACACG ATGCGTGCCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCCTATGCAGTTGAGTTGTCCCT TTCTAGTGCACGTGGAG	JF261112 100% de identidad
PT004	CAGTGGCTCGGAACCAGCACACACACACACACACACAGTTCC ATAATATTTTCGAAGGTGGCCAGCAGCAGGAAGAGCTTTCTTCGTTGC AGCGA	JF261113 100% de identidad
PT007	AGAAGCAACCAACGGACAGGAAGCGGTTCGGGAAGGAAGAGATGCG AGACACACACACACACACGCGTTTTCTAAGTTGGTTTGTGTATGGACA AGTAAAGAGGGAAATGCGTGCACAGAACGAACGGGTAATGGAGGA GACGAGTGTGGCAGCGCCAGCGGACGCGGTCATGGCGGTGAGC AAGCGCAGCAGAGCATGGCTGGCTGACTTTTGACT	JF261114 95.91% de identidad
PT014	TATTTGTTTTCACTTGTGGCGTGCAGTTCCGATCCGCTTCTTGGGGG ACGTACGATACGGACGCGTTTTCTGTGTGCTATTGAGACTCGTTGCTC TGTCGTTGACTGTACAAATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTGTGTGA CGCTCTTGTGGCGTTTTGTTTT	JF261115 96.89% de identidad
PT028	TCGTTGGACGTTTCATGTATGTGTGTGTGTGTGTGCTTTGTGTAT TGTAGACGATTCTGCACCGCATCTATGGCAAGTCGATGGCATTG CGTTCGTTTATCCGTCGCTCGATCAATGACATGTTCTAC	JF261116 100% de identidad
PT032	GAGTGGCGTCCGAAATTGGCGGTACGTGACGAGCGGCAGTTGCTCGT GCTTGATACGGGGTTTACGGACTGTTTTGATGGTGTGTGTGTGTG	JF261118 98.92% de identidad
PT034	Datos no obtenidos	
PT041	Datos no obtenidos	
PT047	ATACATACCTCGCAACAACCCCCATCCTATAATGCAATAGACACACA CAAATACTTCAAATGAACCATGAAACCACACGCCAATTCTTAGTTC ACTTTAAATACTATGTATACATCATATATATAAAAAATGCATTGCCG GATACATAATAGAATCATAAATGCCTCGTCTGCATCCCTCA	JF261120 100% de identidad
PT048	ACACACACAGAGAGAGAAAGAGAGAGAGACACACACACACACA CACTGGTCATCATCCCGTTTCGAGTGTCTTACCTTGTTCCTCCCA TTTACCGTAGTTTTATTGTTCAATCCAAAATCTAAGTCCAAACC ACGACCCTACATCGTCA	JF261121 99.36% de identidad
PT054	GTCACCTAGCTGCGTCTCACGTCGATTGGCATGCCCCGTGCTGTGCAT GGTGAGCGAGCAGGACGCCTCTACAATCGGCAAAGTGAGCAGCAT TGATTGCGATAAGCAAATTCGATCAGATTGATCGAGCACTGATATG TTTGTGTGTGTGTGTGTGTCTTGTCTGTAAGTGGGCCATGTGTGGTA CGATCATGCTGTTCCGGTA	JF261122 99.02% de identidad
PT056	Datos no obtenidos	

Oomycetes are diploid organisms with both asexual and sexual reproduction in their life cycle. Asexual reproduction tends to exhibit high clonality, whereas sexual reproduction generally

Con los datos obtenidos se determinó que los aislados de *P. tabacina* presentes en los campos de tabaco de los principales estados productores en México son genéticamente homogéneas, ya que se



**Table 4. Microsatellite sequences and different types of microsatellite repeat sequences identified in 20 isolates of *Peronospora tabacina* collected in Mexico.**

**Cuadro 4. Secuencias de microsatélites y diferentes tipos de secuencias repetidas de microsatélites identificadas en 20 aislados de *Peronospora tabacina* recolectados en México.**

Locus	Secuencias consenso	Motivos o estructuras repetidas
PT002	CTGAACCATACGATGACCCCATGGACCGCAGGGCACGTCACGGGC TCTTGACGAAGAAAACGACAATGACTGAAGGACGTCGAGTCGACA CGATGCGTGCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTATGCAGTTGAGTTG TCCCTTTCTAGTGCACGTGGAG	GT GT GT GT GT GT GT GT GT
PT004	CAGTGGCTCGGAACCAGCACACACACACACACACACACAGT TCCATAATATTTGGAAGGTGGCCAGCAGCAGGAAGAGCTTTCTTCG TTGCAGCGA	CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA
PT007	AGAAGCAACCAACGGACAGGAAGCGGTCCGGGAAGGAAGAGATGC GAGACACACACACACACACGCGTTTCTAAGTTGGTTTGTGTATGG PT007 ACAAGTAAAGAGGGAAATGCGTGCAGACAACGAACGGGTAATGG AGGAGACGAGTGTGGCAGCGGCCAGCGGACGCGGTCATGGCGG TGAGCAAGCGGAGCAGAGCATGGCTGGCTGACTTTTTGACT	AC AC AC AC AC AC AC AC
PT014	TATTTGTTTTCACTTGTTCGCGTGCAGTTCCGATCCGCGTTCTTGGGG GACGTACGATACGGACGCGTTTTCTGTGTGCTATTTGAGACTCGTT GCTCTGTGCTTACTGTACAAAATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT TCTGTGTGACGCTCTTGTGGCGTTTTGTTTT	TG TG TG TG TG TG TG TG TG TG TG
PT028	TCGTTGGACGTTTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT AGACGATTCTGCACCGCATCTATGGCAAGTCGATGGCATTGCGTTTCG TTATCCGTCGCTCGATCAATGACATGTTCTAC	TG TG TG TG TG TG TG TG
PT032	GAGTGGCGTCCGAAATTGGCGGTACGTGACGAGCGGCAGTTGCTCGT GCTTGATACGGGGTTTACGGACTGTTTTTGTATGGTGTGTGTGTGTGTGTGT	GT GT GT GT GT GT
PT034	Datos no obtenidos	
PT041	Datos no obtenidos	
PT047	ATACATACCTCGCAACAACCCCCATCCTATACATGCAATAGACACA CACAACTATTCAAATGAACCATGAAACCACACGCCAATTCTTAG TTCACCTTAAATACTATGTATACATCATATATATATAAAAATGCAT TGCCGGATACATAATAGAATCATAAATGCCTCTGTCTGCATCCCTCA	AT AT AT AT AT AT
PT048	ACACACACAGAGAGAGAAAAGAGAGAGAGACACACACACACA CACACTGGTCATCATCCCCGTTTCGAGTGTCTTCACCTTGTTCCCTCC CATTTACCGGTAGTTTTTATTGTTCAATCCAAAATCTAAGTCCAAAC CACGACCCTACATCGTCA	AG AG AG AG AG AG AC AC AC AC AC AC AC AC AC
PT054	GTCACTAGCTGCGTTCTCACGTGCGATTGGCATGCCCGTGCTGTGCA TGGTGAGCGAGCAGGACGCCTCTACAATCGGCAAAGTGAGCAGCAT TGATTGCGATAAGCAAATTCGTATCAGATTGATCGAGCACTGATATGT PT054 TTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTTGTCTGTAAAGTGGGCCATGTGTGGTA CGATCATGCTGTTCCGGTA	TG TG TG TG TG TG TG TG
PT056	Datos no obtenidos	

has a higher degree of genotypic diversity (Chen and McDonald, 1996). Populations that reproduce sexually produce offspring with a high level of genetic diversity, while the variation of asexual populations is limited by mutations that can occur within populations (McDonald, 1997). Notably, *P. tabacina* is a pathogen that mainly reproduces asexually through sporangia and sporangiophores, while oospores, the sexual reproductive structures, are rarely observed (Blanco-Meneses *et al.*, 2017; Nowicki *et al.*, 2022).

These results differ from those reported by Nowicki *et al.* (2022), who observed high genetic diversity and gene flow using nine microsatellite molecular markers evaluated in 122 *P. tabacina* isolates collected on three continents (Central, Southern, and Western Europe, the Middle East, Central and North America, and Australia). However, they reported the presence of partially clonal subpopulations among the isolates they evaluated. Additionally, Nowicki *et al.* (2022) mentioned that the high genetic variation and population structure observed among the evaluated isolates could be explained by continuous gene flow across continents and by the exchange of infected plant material and/or the dispersal of *P. tabacina* sporangia over long distances through wind (LaMondia and Aylor, 2001).

The present study determined that the *Peronospora tabacina* isolates causing the disease known as blue mold of tobacco in the main tobacco-producing states in Mexico are genetically homogeneous.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the financial contribution of CONACYT for the realization of this project and also to the Phytopathology laboratory, technicians and researchers of the Research Center for Food and Development Culiacán Unit. CAADES and AMHPAC.

observó la amplificación de los microsatélites de referencia en los 20 aislados evaluados en este estudio. Así mismo, en un estudio realizado por Edreva *et al.* (1998), se observó que aislados de *P. tabacina* recolectados en Europa (Francia y Bulgaria) entre 1978 y 1992, fueron genéticamente estables, sustentando lo anterior con la observación de una alta similitud de los patrones de isoenzimas de las poblaciones naturales del patógeno, y los cambios no significativos en estos patrones. Similarmente, Zipper *et al.* (2009), también reportaron uniformidad genética en aislados europeos de *P. tabacina*.

Los oomicetes son organismos diploides cuyo ciclo de vida incluye tanto reproducción asexual como sexual. Los organismos que se reproducen asexualmente tienden a exhibir un alto grado de clonalidad, mientras que los organismos que se reproducen sexualmente generalmente tienen un mayor grado de diversidad genotípica (Chen y McDonald, 1996). Por el contrario, las poblaciones que se reproducen sexualmente producen descendencia con un alto nivel de diversidad genética. Por esta razón, las recombinaciones genéticas resultado de la reproducción sexual permiten más combinaciones; mientras que, la variación de las poblaciones asexuales es limitada por la mutación que puede ocurrir dentro de las poblaciones (McDonald, 1997). Cabe mencionar que *P. tabacina* es un patógeno que se reproduce principalmente por vía asexual mediante esporangios y esporangióforos; mientras que, las oosporas que son estructuras de reproducción sexual son raramente observadas (Blanco-Meneses *et al.*, 2017, Nowicki *et al.*, 2022).

Estos resultados difieren de los reportados por Nowicki *et al.* (2022), quienes observaron alta diversidad genética y flujo de genes mediante el uso de nueve marcadores moleculares microsatélites evaluados en 122 aislados de *P. tabacina* recolectados en tres continentes (Europa Central, Meridional

## CITED LITERATURE

- Blanco-Meneses M, Carbone I, and Ristaino JB. 2017. Population structure and migration of the tobacco blue mold pathogen, *Peronospora tabacina*, into North America and Europe. *Molecular Ecology* 27:737-751. <https://doi.org/10.1111/mec.14453>
- Caiazzo R, Tarantino P, Porrone F and Lahoz E. 2006. Detection and early diagnosis of *Peronospora tabacina* Adam in tobacco plant with systemic infection. *Journal of Phytopathology* 154:432-435. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01123.x>
- Chen RS and McDonald BA. 1996. Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Genetic* 142:1119-1127. <https://doi.org/10.1093/genetics/142.4.1119>
- Cohen Y. 1976. Interacting effects of light and temperature on sporulation of *Peronospora tabacina* on tobacco leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 29:281-289. <https://doi.org/10.1071/B19760281>
- Derevnina L, Chin-Wo-Reyes S, Martin F, Wood K, Froenicke L, Spring O and Michelmore R. 2015. Genome sequence and architecture of the tobacco downy mildew pathogen *Peronospora tabacina*. *International Society for Molecular Plant Microbe Interactions* 11:1198-1215. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-05-15-0112-R>
- Edreva A, Delon R, and Coussirat J. 1998. Variability of *Peronospora tabacina* A. an isoenzyme study. *Contributions to Tobacco & Nicotine Research. Beiträge zur Tabakforschung* 18:1. pp. 3-13. <https://doi.org/10.2478/cttr-2013-0663>
- Gupta PK, Balyan HS, Sharma PC and Ramesh B. 1996. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science* 70:1. pp. 45-54. <http://repository.ias.ac.in/74979/>
- Hall G. 1989. *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. CDI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. *Mycopathologia* 106:183-211. <http://dx.doi.org/10.1079/DFB/20056400975>
- Hall T. 2011. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences* 2:1. pp. 60-61. [https://www.researchgate.net/publication/258565830\\_BioEdit\\_An\\_important\\_software\\_for\\_molecular\\_biology](https://www.researchgate.net/publication/258565830_BioEdit_An_important_software_for_molecular_biology)
- Jarne P and Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11:424-429. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5)
- LaMondia JA and Aylor DE. 2001. Epidemiology and management of a periodically introduced pathogen. *Biological Invasions* 3:273-282. <https://doi.org/10.1023/A:1015273512111>
- Lucas GB. The war against blue mold. *Science*. 1980. 210 (4466):147-53. <http://dx.doi.org/10.1126/science.210.4466.147>. PMID: 17741271.

y Occidental, Medio Oriente, América Central y del Norte y Australia); sin embargo, ellos reportaron la presencia de subpoblaciones parcialmente clonales entre los aislados que evaluaron. Adicionalmente, Nowicki *et al.* (2022) mencionaron que la alta variación genética y estructura poblacional observada entre los aislados evaluados podrían explicarse por el flujo continuo de genes que se da a través de los continentes y por el intercambio de material vegetal infectado y/o por la dispersión de los esporangios de *P. tabacina* a largas distancias a través del viento (LaMondia y Aylor, 2001).

En este estudio se determinó que los aislados de *Peronospora tabacina* causantes de la enfermedad conocida como moho azul del tabaco, presentes en los principales estados productores de tabaco en México son genéticamente homogéneas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la contribución económica del CONACYT para la realización de éste proyecto y de igual manera al laboratorio de Fitopatología, técnicos e investigadores del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad Culiacán. CAADES y AMHPAC.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- McDermott JM and McDonald BA. 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review of Phytopathology* 1:353-373. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.002033>
- McDonald BA. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87:448-453. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.4.448>
- Milgroom MG. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* 34:457-477. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.457>
- Milgroom MG. 1997. Genetic variation and the application of genetic markers for studying plant pathogen populations. *Journal of Plant Pathology* 79:1-13. <https://www.jstor.org/stable/41997862>

- Milgroom MG and Peever TL. 2003. Population biology of plant pathogens. The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Disease* 87:608-617. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.6.608>
- Milholland R, Papadopoulou J and Daykin M. 1981. Histopathology of *Peronospora tabacina* in systemically infected burley tobacco. *Phytopathology* 71:73-76. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1981Articles/Phyto71n01\\_73.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1981Articles/Phyto71n01_73.pdf)
- Nowicki M, Hadziabdic D, Trigiano R, Runge F, Thines M, Boggess S, Ristaino J and Spring O. 2022. Microsatellite markers from *Peronospora tabacina*, the cause of blue mold of tobacco, reveal species origin, population structure, and high gene flow. *Phytopathology* 112:422-434. <https://doi.org/10.1094/PHTO-03-21-0092-R>
- Ristaino JB, Johnson A, Blanco-Meneses M and Liu B. 2007. Identification of the tobacco blue mold pathogen, *Peronospora tabacina*, by polymerase chain reaction. *Plant Disease* 91:685-691. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0685>
- Spring O, Gomez-Zeledon J, Hadziabdic D, Trigiano RN, Thines M and Lebeda A. 2018. Biological characteristics and assessment of virulence diversity in pathosystems of economically important biotrophic oomycetes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 37:439-495. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1530848>
- Spurr H and Todd F. 1982. Oospores in blue mold diseased North Carolina burley and flue-cured tobacco. *Tobacco Science* 26:44-46. <https://www.coresta.org/abstracts/oospores-blue-mold-diseased-north-carolina-burley-and-flue-cured-tobacco-35746.html>
- Trigiano RN, Wadl PA, Dean D, Hadziabdic D, Scheffler BE, Runge F, Telle S, Thines M, Ristaino J and Spring O. 2012. Ten polymorphic microsatellite loci identified from a small insert genomic library for *Peronospora tabacina*. *Mycologia* 104:633-640. <https://doi.org/10.3852/11-288>
- Voigt K, Cigelnik E and O'donnell K. 1999. Phylogeny and PCR identification of clinically important Zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Journal of Clinical Microbiology* 12:3957-3964. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.12.3957-3964.1999>
- Zipper R, Hammer TR and Spring O. 2009. PCR-based monitoring of recent isolates of tobacco blue mold from Europe reveals the presence of two genetically distinct phenotypes differing in fungicide sensitivity. *European Journal of Plant Pathology* 123:367-375. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9373-3>