



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y PROCESO INFECTIVO DE
Peronospora tabacina Adam CAUSANTE DEL MOHO AZUL EN
TABACO**

Por:

Yadira Margarita Ramos Barraza

TESIS APROBADA POR LA

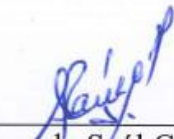
COORDINACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

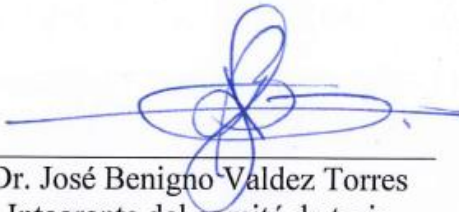
DOCTORA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de MC. Yadira Margarita Ramos Barraza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias.



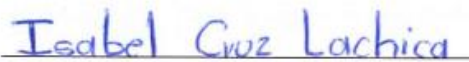
Dr. Raymundo Saúl García Estrada
Director de Tesis



Dr. José Benigno Valdez Torres
Integrante del comité de tesis



Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza
Integrante del comité de tesis



Dra. Isabel Cruz Lachica
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Diversidad Genética y Proceso Infeccioso de *Peronospora tabacina* Adam Causante del Moho Azul en Tabaco" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Yadira Margarita Ramos Barraza, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico brindado a mi persona en forma de beca de manutención para realizar mis estudios de Doctorado en Ciencias.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) subsede Culiacán, por recibirme en sus instalaciones desde la realización de mi servicio social de Licenciatura, hasta este momento en la realización de mis estudios de doctorado.

Al Dr. Raymundo Saúl García Estrada, por aceptarme como su estudiante de doctorado y guiarme en este camino de la investigación, por compartir sus conocimientos hacia mi persona y por su comprensión absoluta.

A los miembros de mi comité de tesis: Dr. José Benigno Valdez Torres, Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza y Dra. Isabel Cruz Lachica por aceptar ser miembros de este proyecto y equipo y por su colaboración y aporte de conocimientos en el tema de la estadística y la fitopatología.

A Isidro Márquez Zequera y Luis Alfredo Osuna García responsable y técnico del laboratorio de Fitopatología del CIAD subsede Culiacán por su apoyo incondicional hacia mi persona, para sacar adelante el trabajo de campo y laboratorio realizado en este proyecto de investigación.

A técnicos, académicos, administrativos y estudiantes compañeros de laboratorio, que de alguna u otra forma me apoyaron para poder concluir mis estudios de doctorado en ciencias. Muchas gracias a todos.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis y todo mi esfuerzo con todo mi cariño y amor profundo y sincero a mi familia. **Mis padres RAUL R. RAMOS y ELIA BARRAZA (qepd)** porque sin su apoyo incondicional yo no podría ser ni siquiera la mitad de la persona que soy hasta este momento. **A mis hermanas Yaha y Yesi, especialmente a Elia Yahaira Ramos** por apoyarme en todo momento en el cuidado de mis hijos principalmente, cuando yo misma no lo he podido hacer al estar realizando mis estudios de posgrado y por sus palabras de apoyo para seguir adelante siempre. **Y dedico esta tesis y todo mi trabajo con negritas sobre negritas a mis hijos ELISA VICTORIA Y HECTOR LEONEL** que con su sola existencia le dan luz a mi vida para poder realizar hasta lo que yo en algún momento llegué a pensar que era imposible lograrlo, los amo con toda mi alma y mi corazón, por supuesto sin Uds saberlo han sido mi motor para culminar este proyecto.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE CUADROS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1. SINOPSIS	12
1.1. Justificación.....	12
1.2. Antecedentes.....	13
1.2.1 Importancia Económica del Cultivo del Tabaco.....	13
1.2.2 Usos y Propiedades del Cultivo del Tabaco	15
1.2.3 Clasificación Taxonómica del Tabaco.....	17
1.2.4 Enfermedades que Afectan al Cultivo de Tabaco.....	17
1.2.5 Importancia de los Oomicetos	18
1.2.6 Clasificación Taxonómica de <i>Peronospora tabacina</i>	19
1.2.7 <i>Peronospora tabacina</i> , causante del Moho Azul del Tabaco	20
1.2.7.1 Síntomas del moho azul del tabaco.....	20
1.2.7.2 Ciclo de la enfermedad.	21
1.2.8 Marcadores Moleculares de ADN	23
1.2.9 Proceso de Infección de <i>Peronospora tabacina</i>	25
1.3. Hipótesis	26
1.4. Objetivo General.....	26
1.5. Objetivos Específicos	26
1.6. Sección Integradora del Trabajo.....	27
1.7. Referencias	28
2. GENETIC DIVERSITY OF <i>Peronospora tabacina</i> ISOLATES COLLECTED IN TOBACCO-PRODUCING STATES OF MEXICO	33
3. HISTOPATHOLOGY OF <i>Peronospora tabacina</i> IN TOBACCO LEAVES	46
4. CONCLUSIONES GENERALES	64
5. RECOMENDACIONES	65

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. La economía del tabaco y su consumo en la India. Informe elaborado para el Banco Mundial, 2007.....	14
2. Proceso de secado o pérdida de agua en hojas de tabaco.	15
3. Nayarit, Veracruz y Chiapas, principales estados productores de tabaco en México.	16
4. Cultivo de tabaco bajo condiciones de campo abierto óptimas para su desarrollo en el estado de Nayarit.	17
5. Ciclo de la enfermedad del moho azul del tabaco causada por el oomiceto <i>Peronospora tabacina</i>	225

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación taxonómica del tabaco.....	17
2. Clasificación taxonómica de <i>P. tabacina</i>	19

RESUMEN

En México, el área de cultivo de tabaco se ha mantenido estable por una década, donde los principales productores son Nayarit, Chiapas y Veracruz. El tabaco es atacado por enfermedades ocasionadas por microorganismos patógenos en donde el moho azul destaca por ser la principal enfermedad de este cultivo. *Peronospora tabacina*, causante del moho azul del tabaco históricamente ha causado pérdidas de millones de dólares a los productores de este cultivo. Es por ello que en la presente investigación se utilizó la técnica de PCR para la amplificación de microsatélites moleculares de ADN para determinar si existe diversidad genética en aislados de *P. tabacina* distribuidas en las principales regiones tabacaleras del país; así como, determinar el proceso de infección de *P. tabacina* en plantas de tabaco, mediante el uso de técnicas histológicas. Se identificó a este oomiceto morfológicamente y molecularmente para el estudio de la diversidad genética. Los aislados fueron analizados mediante PCR utilizando 12 pares de primers para la amplificación de los microsatélites de dichas cepas. Se realizó la secuenciación de los microsatélites amplificados y las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank. En los 20 aislados evaluados en este estudio, las secuencias (100%) de los microsatélites comprendían regiones de dinucleótidos, la mayoría correspondientes a motivos o estructuras repetidas (GT)_n o variaciones (TG)_n, también se visualizaron motivos (AC)_n, (CA)_n, (AT)_n y (AG)_n. 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 observó la amplificación de los microsatélites de referencia en los 20 aislados evaluados en este estudio. Respecto al estudio de histopatología, se observó la presencia de esporangiosporas adheridas a la cutícula de la hoja entre 2 y 48 horas después de la inoculación (hdi); las cuales fueron capaces de germinar a partir de los 4 días. La penetración del patógeno en la parte interna de los tejidos de las hojas, fue directa por medio de apresorios, a las 96 hdi. Las primeras hifas de infección emergieron entre las 96-120 hdi y entre 168 y 192 hdi se desarrollaron hifas intracelulares que colonizaron el interior de los tejidos provocando ruptura celular en parénquimas lagunar y clorofílico; así como en cloroplastos, haces vasculares y células epidérmicas. El patógeno completó su ciclo de infección al producir oosporas y esporangios, considerándose una fuente de inóculo para la infección de nuevos tejidos.

Palabras clave: Microsatélites moleculares, Histopatología, Hifas intracelulares, Esporangiosporas.

ABSTRACT

In Mexico, the tobacco growing area has remained stable for a decade, with Nayarit, Chiapas and Veracruz being the main producers. Tobacco is attacked by diseases caused by pathogenic microorganisms where blue mold stands out as the main disease of this crop. *Peronospora tabacina*, which causes tobacco blue mold, has historically caused losses of millions of dollars to tobacco growers. For this reason, in the present research, the PCR technique was used for the amplification of DNA molecular microsatellites to determine if there is genetic diversity in isolates of *P. tabacina* distributed in the main tobacco growing regions of the country; as well as to determine the infection process of *P. tabacina* in tobacco plants, using histological techniques. This oomycete was identified morphologically and molecularly for the study of genetic diversity. The isolates were analyzed by PCR using 12 pairs of primers for the amplification of microsatellites of these strains. The amplified microsatellites were sequenced and the consensus sequences obtained were compared with the sequences deposited in the GenBank database. In the 20 isolates evaluated in this study, the sequences (100%) of the microsatellites comprised dinucleotide regions, the majority corresponding to motifs or repeated structures (GT)_n or variations (TG)_n, motifs (AC)_n, (CA)_n, (AT)_n and (AG)_n were also visualized. With the data obtained, it was determined that the *P. tabacina* isolates present in the tobacco fields of the main tobacco-producing states in Mexico are genetically homogeneous, since amplification of the reference microsatellites was observed in the 20 isolates evaluated in this study. Regarding the histopathology study, the presence of sporangiospores adhered to the leaf cuticle was observed between 2 and 48 hours after inoculation (hdi); these were able to germinate after 4 days. The penetration of the pathogen into the internal part of the leaf tissues was direct by means of appressoria at 96 hdi. The first hyphae of infection emerged between 96-120 hdi and between 168 and 192 hdi intracellular hyphae developed and colonized the interior of the tissues, causing cellular rupture in the lacunar and chlorophyll parenchyma, as well as in chloroplasts, vascular bundles and epidermal cells. The pathogen completed its infection cycle by producing oospores and sporangia, being considered a source of inoculum for the infection of new tissues.

Key words: Molecular microsatellites, Histopathology, Intracellular hyphae, Sporangiospores.

1. SINOPSIS

1.1. Justificación

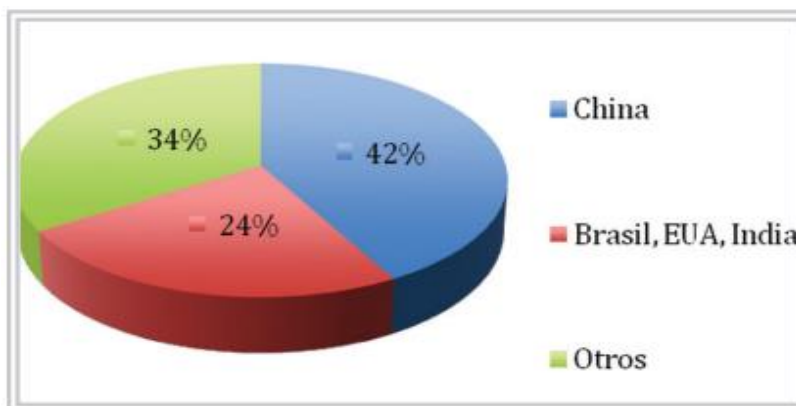
El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) se cultiva en todo el mundo en alrededor de 124 países entre los que podemos mencionar a Brasil, China, Estados Unidos, Canadá, Argentina, Cuba, Guatemala e India; constituyendo una importante fuente de divisas para su economía. El tabaco es un cultivo de gran importancia ya que genera beneficios económicos y sociales por las exportaciones y fuentes de trabajo tanto en el área rural como en la urbana; además, en algunos países de ingresos bajos y medianos, muchos agricultores y funcionarios gubernamentales ven al tabaco como un cultivo comercial que puede generar crecimiento económico. En algunas áreas, los agricultores pueden optar por cultivar tabaco en lugar de alimentos debido a la rentabilidad de este cultivo. El tabaco es considerado como la planta no comestible más cultivada en el mundo y en muchos países constituye un instrumento de gran importancia en términos de política financiera y económica. En México, en el mes de mayo se obtiene la mayor producción de tabaco, con 43% de la producción nacional anual. El área de cultivo se ha mantenido estable por una década representando en promedio el 0.04% del área total de cultivo. En 2008 se sembraron 5,900 hectáreas de tabaco, la cual aumentó a 6,600 en 2018. La producción de tabaco ha ido en aumento ya que en 2018 se obtuvieron 15,181 toneladas, incrementándose en un 32% con respecto al año 2008. En 2018 México ocupó la posición número 7 como productor en América Latina y para 2019, este cultivo tuvo un incremento en producción del 11%. Los principales estados productores de tabaco en México son Nayarit, Chiapas y Veracruz, siendo el primero el estado líder en producción de tabaco, cuyos productores recibieron más de 37 mil 700 pesos por tonelada. Como todo cultivo, el tabaco es atacado por una serie de plagas y enfermedades, siendo la más importante el Moho Azul, enfermedad causada por *Peronospora tabacina* Adam. El moho azul ha sido considerado como una enfermedad potencialmente catastrófica para este cultivo, ya que en 1979 causó pérdidas superiores a los \$240,000,000 en los EE. UU. y Canadá. En 1980, Cuba sufrió graves pérdidas debido a esta enfermedad que destruyó un 90% de las plantaciones, lo que llevó al cierre temporal de fábricas de puros en ese país, dejando sin trabajo a 26,000 personas.

Peronospora tabacina es el oomiceto más destructivo del tabaco a nivel mundial y en México se encuentra ampliamente distribuido; sin embargo, su diversidad genética poblacional a nivel nacional e internacional ha sido poco estudiada; aunado a esto, el proceso infectivo de esta enfermedad solo se ha abordado mínimamente. Por lo anterior, este estudio se planteó determinar la variabilidad genética poblacional de *P. tabacina* con el uso de marcadores moleculares y conocer el proceso de la enfermedad mediante el uso de técnicas histológicas.

1.2. Antecedentes

1.2.1 Importancia Económica del Cultivo del Tabaco

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) se cultiva en aproximadamente 124 países (<http://tobaccoatlas.org/topic/growing/>) y se considera un cultivo comercial importante para la economía agrícola de dichos países. Particularmente, en las naciones en desarrollo de Asia y África (Nowicki *et al.*, 2021) se considera al tabaco el cultivo comercial principal, como parte de una estrategia agrícola diversificada (Monge, 2012). En 2009, China cultivó alrededor del 38-42% del tabaco mundial, mientras que la India, Estados Unidos y Brasil produjeron juntos aproximadamente el 25%, y Turquía, Zimbabue, Indonesia, Italia, Grecia, Malawi y Argentina otro 15%. Grecia, Malawi y Argentina cultivan un 15% más. Estos 11 países producen casi el 80% de la producción mundial de tabaco, con pequeñas cantidades cultivadas en otros 70 países en desarrollo. Brasil es el segundo productor más grande de tabaco a nivel mundial. Colombia y Venezuela también son cultivadores importantes. En el 34% restante, Turquía, Zimbabue y Argentina desempeñan un papel significativo (Monge, 2012). El tabaco, representa beneficios económicos y sociales generados tanto por las exportaciones de las mismas como por la creación de fuentes de trabajo tanto en el área rural como en la urbana. Debido a lo anterior, su producción es una actividad relevante en varias partes del mundo, como Brasil, China, EE. UU. e India (Figura 1).



Distribución del cultivo mundial de Tabaco por países. Tomado de BasheerA. The Economics of Tobacco and its Consumption in India. Report prepared for the World Bank, 2007.

Figura 1. La economía del tabaco y su consumo en la India. Informe elaborado para el Banco Mundial, 2007.

Los países en desarrollo con una balanza comercial de hojas de tabaco positiva (exportadores netos) son: Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Guatemala, India, Kenia, Macedonia, Malawi, México, Mozambique, Tanzania, Tailandia, Turquía y Zimbabue. En estos países, la ganancia bruta del cultivo es significativa (The economics of tobacco use & tobacco control in the developing world. 2003).

En México, en 2008 se dedicaban 5,900 hectáreas para la siembra de tabaco, la cual aumentó a 6,600 hectáreas en 2018 (SIAP, 2023). En ese año, la producción de tabaco fue de 15,181 toneladas, con un incremento de 32% con respecto a 2008, ocupando la posición número 7 entre los principales productores de América, por detrás de Brasil, Estados Unidos, Argentina, Cuba, Guatemala y Canadá.

De acuerdo con información del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en 2019, el tabaco tuvo un incremento en su producción del 11%, resultado de un mayor rendimiento en Nayarit, estado líder en producción de tabaco en México, en donde la mayor producción se obtiene durante el mes de mayo aportando alrededor de 43% de la producción nacional anual, seguido a por Veracruz. En ese año, los agricultores de Nayarit recibieron más de 37 mil 700 pesos por tonelada (<https://www.gob.mx/conasama/documentos/dia-mundial-sin-tabaco-2024?idiom=es>). Por otro lado, en ciertas regiones del país se puede intensificar la siembra de

tabaco debido a que cuentan con las condiciones óptimas para su producción, como en el caso de los estados de Sinaloa, Nuevo León y Tamaulipas. De acuerdo con el Atlas agroalimentario 2012-2018, en México la superficie con plantaciones de tabaco tiene un rendimiento superior al promedio internacional, siendo los meses de marzo a mayo cuando se corta la mayor cantidad de hojas en el país (SIAP).

1.2.2 Usos y Propiedades del Cultivo del Tabaco

El cultivo de tabaco en México tiene una importancia económica y cultural, ya que éste es uno de los productos agrícolas no alimenticios más importantes. Esta planta tiene como principal sustancia activa a la nicotina y la mayor parte de la producción está destinada a la fabricación de cigarros. Las hojas se curan y utilizan para fabricar productos tales como puros y tabaco para pipa o bien tabaco para mascar (Figura 2). Las hojas también se usan en la elaboración de algunos remedios medicinales. Las mejores marcas de puros y cigarros se hacen con tabaco que cumple con características como tamaño, coloración, textura, elasticidad, grosor de la vena principal y aroma. En 2017, México produjo 17.2 mil toneladas de tabaco.



Figura 2. Proceso de secado o pérdida de agua en hojas de tabaco.

El tabaco se cultiva en condiciones climáticas específicas, prefiriendo temperaturas entre 18 y 28°C y prefiere las tierras de francas a sueltas, profundas, que no se encharquen y que sean fértiles, ya que este cultivo es sensible a una humedad elevada en el terreno lo que provocaría un desarrollo pobre del mismo y, en general, es preferible un déficit a un exceso de agua. El pH más apropiado para el cultivo de tabaco es de neutro a ligeramente ácido. Este cultivo genera empleo directo, especialmente en municipios como San Andrés Tuxtla, Veracruz, y Tepic, Nayarit (Figura 3). (<https://www.gob.mx/siap/articulos/tabaco-nicotiana-tabacum-l-usos-y-propiedades?idiom=es>).



Figura 3. Nayarit, Veracruz y Chiapas, principales estados productores de tabaco en México (SIAP, 2023).

La planta en su total desarrollo mide de 1 a 3 m de altura. Su sistema radicular es penetrante, aunque la mayoría de las raíces finas se encuentran en el horizonte más fértil. Produce entre 10 y 20 hojas grandes, las cuales pueden ser lanceoladas, alternas, sentadas o pecioladas. La siembra se realiza por trasplante de forma manual o con máquina trasplantadora a 15 cm entre planta. Las minúsculas semillas de la planta del tabaco se tratan durante 45 días y se plantan en fila recta (Figura 4).



Figura 4. Cultivo de tabaco bajo condiciones de campo abierto en el estado de Nayarit.

1.2.3 Clasificación Taxonómica del Tabaco

El tabaco pertenece a la familia de las solanáceas (Cuadro 1) y su clasificación taxonómica es la siguiente:

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del tabaco.

Clasificación	Nombre
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Nicotiana</i>
Especie	<i>Nicotiana tabacum</i> L.

1.2.4 Enfermedades que Afectan al Cultivo de Tabaco

Al igual que otros cultivos, el tabaco es susceptible al daño causado por enfermedades ocasionadas

por patógenos infecciosos los cuales pueden ser pertenecientes al grupo de los hongos, bacterias, nemátodos, virus y oomicetos. Dos enfermedades inducidas por hongos son: el Virus del mosaico del tabaco (TMV) y la Pudrición negra de la raíz (*Thielaviopsis basicola*). algunos Nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.), la Mancha angular de la hoja (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) y el Moho azul del tabaco (*Peronospora tabacina*), el cual es un patógeno perteneciente al grupo de los oomicetos que afecta principalmente a las hojas, causando manchas amarillas en el haz y esporulación azulada en el envés. Es especialmente problemático en condiciones de alta humedad relativa. Los oomicetos biotróficos de las plantas, como es el caso de *P. tabacina*, causan importantes problemas en la producción, pérdidas económicas en la agricultura moderna, ya que estos presentan una alta variabilidad genética y una rápida adaptación para su sobrevivencia (Latijnhouwers *et al.*, 2003).

1.2.5 Importancia de los Oomicetos

Los oomicetos comprenden más de 2000 especies, con una amplia gama de estilos de vida encontrándose en casi todos los ecosistemas, colonizando eficientemente la materia orgánica en descomposición, así como, en hospedantes vivos y, además juegan importantes roles ecológicos como saprótrofos y patógenos (Thines, 2014). Muchas especies de oomicetos son responsables de enormes pérdidas económicas y representan una gran amenaza para la seguridad alimentaria, éstos son responsables de causar alrededor del 20% de pérdidas anuales a nivel mundial. A diferencia de los hongos, los oomicetos son diploides durante la mayor parte de su ciclo de vida y, por lo tanto, tienen potencial para propagarse como clones heterocigotos. La mayoría de las especies conocidas de oomicetos causan moho suave y tienen estilo de vida como biótros obligados, ya que dependen completamente de su huésped para la supervivencia y utilizan los metabolitos proporcionados por sus hospederos. De este grupo, con más de 800 especies, alrededor de 500 pertenecen al género *Peronospora* (Thines 2014; Thines y Choi 2016).

1.2.6 Clasificación Taxonómica de *Peronospora tabacina*

Los oomicetos se han clasificado tradicionalmente dentro de la micología; sin embargo, datos ultraestructurales, bioquímicos y filogenéticos moleculares demuestran que no están relacionados con los hongos verdaderos (Reino Fungi), sino que pertenecen al Reino Chromista (Straminipila), que también contiene las algas cromistas (heterokont) (Voglmayr, 2008). El agente patógeno del moho azul pertenece a la clase Oomycetes, Orden Peronosporales y Familia Peronosporaceae (Voglmayr, 2008). Las filogenias moleculares que utilizan datos del espaciador transcrito interno (ITS) no solo confirman un concepto de especie bastante limitado en *Peronospora*, sino que también ayudan a aclarar la atribución de especies (Voglmayr, 2008). Este patógeno del mildiú veloso de las solanáceas se describió originalmente a partir de un *Hyoscyamus* sp. en Czechoslovakia en 1859, como *Peronospora effusa* var. *hyoscyami*. En 1863, de Bary la elevó al rango de especie, como *P. hyoscyami* de Bary. En 1933, Adam propuso el nombre de *P. tabacina* para el moho azul de *Nicotiana tabacum* (tabaco) y otras *Nicotiana* spp., pero reconoció que había pocas diferencias morfológicas con respecto a *P. hyoscyami*. El análisis de una muestra más amplia de aislados no reveló diferencias morfológicas entre *P. hyoscyami* y *P. tabacina*, por lo que se consideró a *P. tabacina* como un sinónimo del nombre anterior *P. hyoscyami*. No obstante, el nombre *P. tabacina* ha seguido apareciendo en la literatura (Voglmayr, 2008; Borrás-Hidalgo *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Peronospora tabacina*.

Clasificación	Nombre
Reino	Chromista (Straminipila)
Filo	Oomycota
División	Eumycota
Subdivisión	Mastigomycotin
Clase	Oomycetes
Orden	Peronosporales
Familia	Peronosporaceae
Género	<i>Peronospora</i>
Especie	<i>Peronospora tabacina</i>

1.2.7 *Peronospora tabacina*, causante del Moho Azul del Tabaco

El patógeno *Peronospora tabacina* D. B. Adam es un microorganismo parásito obligado de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L) que causa una enfermedad foliar comúnmente conocida como moho azul, la cual es considerada como una de las enfermedades más destructivas de este cultivo debido a que causa pérdidas por cientos de millones de dólares (Lucas, 1980; Nesmith, 1984) en América, Europa sudoriental y Oriente Medio. Durante los últimos 10 años, las pérdidas por el moho azul del tabaco “Burley”, tan sólo en Kentucky, E.E.U.U., se ha estimado en 350 millones de dólares (Heist *et al.*, 2002). Esta enfermedad se notificó por primera vez en zonas tabacaleras de Australia durante el siglo XIX (Cooke, 1891). Las epidemias de moho azul han causado pérdidas anuales superiores a 200 millones de dólares en Norteamérica (Heist *et al.*, 2002; Lucas, 1980; Nesmith, 1984), mientras que, en Cuba la enfermedad causó graves pérdidas entre 1978 y 1980 (Pérez *et al.*, 2003).

1.2.7.1 Síntomas del moho azul del tabaco. El patógeno es capaz de infectar plantas de tabaco en todo el mundo durante todo el período vegetativo (incluida la producción de plántulas para trasplante) y puede propagarse rápidamente cuando las condiciones climáticas son óptimas o favorables para su desarrollo (Main, 1991). Los climas nublados y frescos favorecen el desarrollo de la enfermedad y ésta puede provocar la destrucción total de la cosecha (Lucas, 1980). Plántulas pequeñas, en semilleros, con hojas de menos de 2 cm de diámetro, que pequeños manchones de plántulas muertas o casi muertas aún con hojas erectas son indicio de la enfermedad (Lucas, 1980; Wolf *et al.*, 1934). Después de 7-10 días, cuando el oomiceto ha producido suficiente inoculo, se puede producir una epidemia general y todo el semillero puede verse afectado. En plantas adultas, las hojas pueden permanecer con apariencia normal durante 1-2 días antes de que estas empiecen a morir. El patógeno suele causar lesiones en las superficies superiores o haz de las hojas infectadas en forma de manchas amarillas, las cuales son bien definidas o localizadas. Estas manchas regularmente se unen para formar áreas necróticas de color marrón claro llegando a destruir las hojas del cultivo por completo. Las plantas más viejas, con hojas de hasta 4 cm, presentan un moho de tono gris a azulado en la superficie inferior o envés de la hoja. Las hojas enfermas pueden

retorcerse o doblarse hacia arriba. En estos casos, el color azulado de las plantas enfermas se vuelve muy llamativo, especialmente en condiciones húmedas, cuando la esporulación es abundante; de ahí el nombre de la enfermedad: moho azul del tabaco. *P. tabacina* es capaz de infectar a la planta sistémicamente, en donde la decoloración vascular en el interior de los tallos es evidente, observándose un retraso parcial o total en el crecimiento de la planta (Lucas, 1980; Reuveni *et al.*, 1986). Si esto ocurre cerca de la base del tallo, las plantas se pueden partir. Este patógeno es capaz de ocasionar enfermedad en cualquier etapa fenológica del cultivo.

La dispersión del patógeno de una planta a otra ocurre por medio de sus esporas asexuales conocidas como esporangiosporas o esporangios, las cuales se producen en la superficie de las hojas infectadas y son arrastradas por el viento (Aylor *et al.*, 1982). La infección resultante de la colonización del patógeno, típicamente se presenta en las plantas como lesiones foliares localizadas, aunque también puede afectar a las plantas en forma sistémica a través del sistema vascular (Lucas, 1980; Reuveni *et al.*, 1985; Reuveni *et al.*, 1986). Las condiciones de humedad relativa superior al 95%, temperatura en un rango de 18 a 23°C y un periodo de oscuridad favorecen la esporulación de *P. tabacina* sobre las hojas infectadas (Wolf, *et al.*, 1934).

1.2.7.2 Ciclo de la enfermedad. El patógeno es un parásito biotrófico obligado y produce tanto esporangióforos como oosporas. Los esporangios o esporangiosporas son hialinos y en forma de limón (15 x 25 µm) y nacen en el esporangióforo. Los esporangióforos son dicotómicamente ramificados, que terminan en curvas y tienen ápices agudos, éstos emergen a través de los estomas en el envés de las hojas en gran número y varían de 400 a 750 µm de longitud, son frágiles y de corta duración ya que son sensibles a la luz ultravioleta y cuando son liberados, la exposición a la luz solar directa puede eliminar a la mayoría en 1 h aproximadamente. Es por esto que en lesiones foliares de más de 72 a 96 h de edad rara vez se encuentran viables (Borrás-Hidalgo., 2010).

Las esporas o esporangiosporas de *P. tabacina* se puede diseminar fácilmente a través del viento (Lucas, 1980), también a través de las personas, por ejemplo, en la ropa o por medio de plántulas de tabaco infectadas. Este patógeno es un prolífico productor de esporas, por ejemplo 500 ha de tabaco muy enfermo pueden producir unas 6.44×10^{13} esporas al día (Aylor, 1982). Este patógeno

es capaz de producir más de 10^3 esporangios/cm² en una sola lesión (Cohen, 1976).

Una vez que los esporangios transportados por el viento se ponen en contacto con la superficie de una hoja, durante las primeras horas de la mañana y en presencia de agua libre, la germinación y la infección pueden producirse en alrededor de 2-4 horas. Los primeros síntomas visibles de la enfermedad se pueden observar de 5 a 7 días (Figura 5). Para que aparezcan los esporangióforos, la humedad relativa debe superar el 95% durante 3 h y la oscuridad debe durar un mínimo de 1.5 h. Las temperaturas óptimas para que una máxima esporulación se produzca son de 15-23 °C. Los esporangióforos y los esporangios emergen nuevamente a través de los estomas de las hojas iniciando así un nuevo ciclo de la enfermedad (Borrás-Hidalgo., 2010).

Las oosporas son esporas sexuales y se han sugerido como otro método de diseminación del patógeno (Hall, 1989). Sin embargo, no está claro si el patógeno es capaz de hibernar en restos infectados, por lo que el papel de las oosporas en la enfermedad no está claro (Ristaino *et al.*, 2007) En ocasiones las oosporas se producen en el mesófilo de las partes muertas de la planta infectada (Lucas, 1975; Milholland *et al.*, 1980).

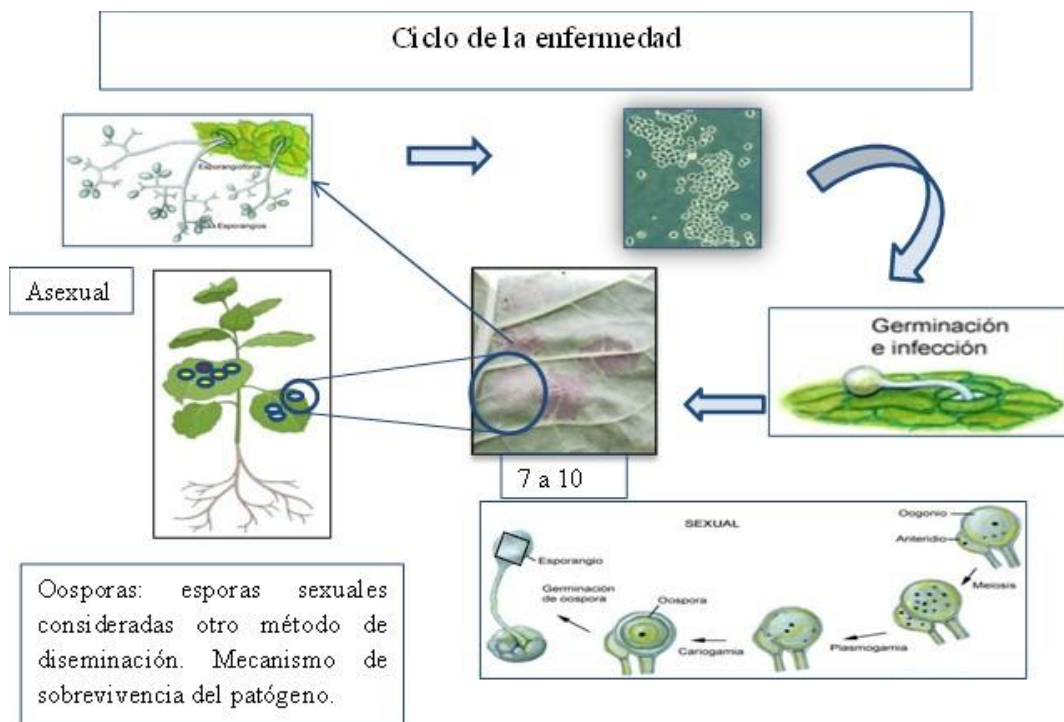


Figura 5. Ciclo de la enfermedad del moho azul del tabaco causada por el oomiceto *Peronospora tabacina* (Borrás-Hidalgo *et al.*, 2010).

1.2.8 Marcadores Moleculares de ADN

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).

Los marcadores de ADN nos permiten analizar la dinámica de las poblaciones de patógenos de las plantas debido a sus altos niveles de precisión (Milgroom y Peever. 2003), son rápidos, altamente específicos y pueden detectarse utilizando una cantidad mínima de ADN (Schaad *et al.*, 2003). Los microsatélites, también conocidos como repeticiones de secuencias simples (SSR) o repeticiones cortas en tándem (STR), son uno de los marcadores genéticos altamente versátiles que han sido ampliamente utilizados para el estudio genético de patógenos de plantas y comprenden secuencias de nucleótidos repetidos en tándem de uno a seis pares de bases de largo (Ellegren, 2004; Tóth *et al.*, 2000; Capote *et al.*, 2012; Owati *et al.*, 2019;). Estas secuencias simples son relativamente abundantes, co-dominantes, ubicuas y exhiben niveles extensos de polimorfismos en genomas procariotas y eucariotas (Moges *et al.*, 2016; Peixoto-Junior *et al.*, 2014; Tóth *et al.*, 2000). Además, los polimorfismos genéticos se encuentran en regiones codificantes y regiones no codificantes (Tóth *et al.*, 2000, Katti *et al.*, 2001; Ellegren, 2004), aunque son más abundantes en regiones no codificantes (Capote *et al.*, 2012; Zane *et al.*, 2012).

El uso de microsatélites permite obtener mayor poder estadístico y discriminación entre genotipos (Halkett *et al.*, 2005). Los altos niveles de polimorfismos observados en los marcadores SSR y la relativa facilidad de detección de estos polimorfismos por amplificación por PCR ha llevado a las amplias aplicaciones de SSR como marcadores genéticos (Karaoglu *et al.*, 2005). Diversas investigaciones han sido realizadas para conocer la diversidad genética de *Peronospora tabacina*, tal es el caso de Sukno *et al.* (2002), quienes analizaron la variabilidad genética y de población en *Peronospora tabacina* utilizando fragmentos de ADN genómico al azar para examinarlos mediante la técnica de RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), a partir de aislamientos del patógeno provenientes de Kentucky y otras regiones productoras de tabaco de los

Estados Unidos. Los autores también incluyeron aislamientos de la especie de tabaco silvestre *Nicotiana repanda* y del tabaco ornamental *N. alata.*, encontrando que la población de *P. tabacina* que infecta el cultivo de tabaco de Kentucky, es genéticamente muy homogénea. Por su parte, Trigiano *et al.* (2012) caracterizaron microsátélites en 44 aislamientos de *Peronospora tabacina* colectadas de plantas de tabaco cultivadas en Europa, Cercano Oriente y América del norte y Sur, desarrollando oligonucleótidos para 63 loci, de los cuales tan sólo 10 de ellos fueron polimórficos.

Blanco-Meneses *et al.* 2017 examinaron la estructura genética de *P. tabacina* para comprender la diversidad genética de sus aislamientos, estructura de la población y patrones de migración. Dos loci nucleares (Igs2 e Ypt1) y un locus mitocondrial (cox2) se amplificaron, clonaron y secuenciaron de cincuenta y cuatro aislamientos de *P. tabacina* provenientes de Estados Unidos, América Central –Caribe- México, Europa y Medio Oriente. Las secuencias de los tres genes mostraron una alta variabilidad genética en todas las poblaciones; sin embargo, en la especie *Peronospora belbahrii* cuyo genoma contiene alrededor del 16% de secuencias simples repetidas se encontró un alto grado de evolución convergente lo que refleja su estilo de vida como parásito obligado (Thines *et al.*, 2020).

La disponibilidad de la secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés) o secuenciación masiva en paralelo permite un análisis económico y fácil de los genomas, lo que lleva a muchos conocimientos importantes sobre la biología de muchos oomicetos (Judelson 2012; Schena *et al.*, 2008). Debido a su importancia económica, la secuenciación de los genomas de algunos mildiús, incluyendo *Peronospora tabacina*, ha sido realizada, encontrando que aproximadamente el 24% del genoma nuclear está constituido por elementos repetitivos, principalmente retrotransposones (Derevnina *et al.*, 2015).

Nowicki *et al.* (2021), investigaron si existía diversidad genética en 122 aislados provenientes de tres continentes: Europa Central, Meridional y Occidental, Medio Oriente, América Central y del Norte y Australia utilizando 9 microsátélites. Estos investigadores encontraron alta diversidad genética y flujo de genes entre las cepas de los 3 continentes.

Al igual que la importancia de conocer si existe diversidad genética entre los aislados de *P.*

tabacina en México, es de suma importancia conocer el proceso y las estrategias que utiliza *P. tabacina* para causar infección en las plantas de tabaco, ya que se sabe que algunas estrategias de ciertos patógenos están correlacionadas con la especificidad en el hospedante (Pring *et al.*, 1995), con lo cual se podría determinar el proceso de infección. Lo antes señalado es de gran importancia, ya que proporcionaría herramientas útiles para un adecuado manejo de la enfermedad, al conocer el periodo en el que se desarrolla el patógeno en el hospedante. Actualmente se conoce poco sobre el proceso de patogénesis de *P. tabacina*, por lo que es importante determinar los cambios histológicos que se presentan durante la infección de *P. tabacina* en plantas de tabaco inoculadas artificialmente.

1.2.9 Proceso de Infección de *Peronospora tabacina*

El proceso de infección de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* comienza con la germinación de esporas en la superficie de la hoja, seguida del desarrollo de un apresorio, el cual depende de una señal de la superficie de la hoja de la planta huésped. La infección inicia cuando el apresorio entra en la hoja a través de una estoma, seguido por el desarrollo de un subestoma, una vesícula subestomática, una hifa de infección, una célula madre haustorial, la penetración de una célula mesófila fotosintética y el establecimiento de un haustorio (Lo Presti *et al.*, 2015). El desarrollo del haustorio es el paso final de la infección en la que la planta huésped desempeña un papel fundamental (Lucas, 1975). El oomiceto patógeno establece relaciones específicas con sus huéspedes formando haustorios, redirigiendo el metabolismo del huésped y suprimiendo las defensas del huésped mediante la producción de proteínas efectoras al citoplasma del mismo (Hahn y Mendgen, 2001; O'Connell y Panstruga, 2006; Voegelé y Mendgen, 2003; Whisson *et al.*, 2007).

Milholland *et al.* 1980, en un estudio de histopatología realizado en Carolina del Norte, observaron hiperplasia en regiones del floema, severa distorsión de los tejidos e hifas gruesas creciendo intercelularmente en plantas de tabaco de la variedad Burley (KY-14). En este caso, el follaje fue infectado en condiciones naturales en campo por el patógeno. En este estudio no se determinó el proceso infectivo de *P. tabacina*, ya que se desconoce el tiempo inicial de infección del oomiceto,

al igual que los tiempos en los que se dieron las demás etapas de infección del patógeno. Por lo que es importante realizar técnicas histopatológicas realizando inoculaciones artificiales en laboratorio y controladas para así determinar dicho proceso de infección por éste importante oomiceto.

1.3. Hipótesis

1. Los aislados de *Peronospora tabacina* provenientes de las diferentes regiones productoras de México no presentan variabilidad genética.
2. El patógeno *P. tabacina* penetra las células de hojas de tabaco intercelularmente e intracelularmente.

1.4. Objetivo General

Determinar la diversidad genética poblacional y el proceso infectivo de cepas de *Peronospora tabacina*, oomiceto causante de la enfermedad del moho azul del tabaco.

1.5. Objetivos Específicos

1. Determinar la prevalencia de *Peronospora tabacina* agente causal de moho azul en diferentes zonas productoras de México.
2. Determinar la diversidad genética poblacional de *Peronospora tabacina* en México con el uso de microsatélites moleculares.
3. Describir la patogénesis de *P. tabacina* en su interacción con plantas de tabaco, mediante el uso de técnicas histológicas.

1.6. Sección Integradora del Trabajo

La información presentada en este manuscrito está dividida en secciones denominadas capítulos. A continuación, se describe el contenido de cada uno de ellos. En el artículo 1 se describe el estudio de la diversidad genética entre aislados del patógeno *Peronospora tabacina* causante de Moho azul o Mildiú veloso del cultivo del tabaco, recolectados en los principales estados productores de este cultivo como lo son Nayarit, Chiapas y Veracruz; evaluados mediante la utilización de 12 microsatélites con la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se realizó la amplificación y secuenciación de estos microsatélites; así como el alineamiento y comparación de las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank, encontrando que las cepas de *P. tabacina* presentes en México son genéticamente homogéneas, pudiéndose considerar productos de líneas clonales. Este artículo se encuentra publicado en la Revista Mexicana de Fitopatología.

En el artículo 2 se describe el proceso de infección del patógeno *Peronospora tabacina* en plantas de tabaco, analizado con la técnica de tinción diferencial de tejidos safranina-verde rápido en plantas inoculadas artificialmente y bajo condiciones de invernadero. Los cortes de tejido se realizaron a diferentes horas después de la inoculación (hdi), determinando que las esporangiosporas adheridas a la cutícula de la hoja se observaron en las primeras 48 hdi; germinaron a partir del 4to día de la presencia del patógeno en la planta. En este artículo también se describe cómo se da la penetración de este oomiceto en las hojas infectadas y el tiempo en el que el patógeno pudo introducirse a los tejidos vegetales de las plantas inoculadas. Se determinó que *P. tabacina* produce hifas de infección las cuales emergen a partir de las 96-120 hdi y que este microorganismo fue capaz de desarrollar hifas intracelulares que colonizaron el interior de los tejidos vegetales. Se determinó que el causante del moho azul del tabaco tiene la capacidad de infectar intercelular e intracelularmente a su hospedante y se confirmó que los síntomas de la enfermedad en las hojas de tabaco aparecen alrededor de los 7 días después de la inoculación; también se observó la presencia de esporangios y oosporas desde las 96 hdi, tiempo en el que por lo general el oomiceto completa su ciclo de vida. Este artículo fue enviado a la Revista Mexicana de Fitopatología para que se considere su publicación.

1.7. Referencias

- Agrios G. W. 1975. Fitopatología. Ed. Limusa. México, D. F.: 820 pp.
- Amos W., Hoffman J. I., Frodsham A. M., Zhang, L., Best S., Hill, A. V. S. 2007. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Mol Ecol Notes*. 7:10-14, doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01560.x
- Aylor, D. 1999. Biophysical scaling and the passive dispersal of fungus spores: relationship to integrated pest management strategies. *Agricultural and Forest Meteorology*, 97(4), 275-292. doi:10.1016/s0168-1923(99)00072-6
- Aylor D. E., Taylor G. S., Raynor G. S. 1982. Long-range transport of tobacco blue mold spores. *Agric. Meteorol.* 27:217-232.
- Blanco-Meneses M., Carbone I., Ristaino J. B. 2018. Population structure and migration of the Tobacco Blue Mold Pathogen, *Peronospora tabacina*, into North America and Europe. *Molecular Ecology*.:1-15. DOI: 10.1111/mec.14453
- Borrás-Hidalgo O, Thomma BPHJ, Silva Y, Chacón O, Pujol M. 2010. Tobacco blue mould disease caused by *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. *Molecular Plant Pathology*, 11(1): 13-18. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00569.x
- Capote N., Pastrana A. M., Aguado A., Sanchez-Torres P. 2012. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In: Cumagun CJ, editor. *Plant pathology*. Rijeka: InTech, Croatia.:151–202.
- Carrieri R., Lahoz E., Tarantino P., Cermola M., Morra L. 2017. DNA analysis of a tobacco herbarium specimen reveals the presence of *Peronospora tabacina* in Italy in 1934. *European Journal of Plant Pathology*. 148:219-221.
- Clayton E. 1945. Resistance of tobacco blue mold (*Peronospora tabacina*). *J. Agric. Res.* 70:79-87.
- 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/BI9760281>
- Davis J. M., Main C. E. 1986. Applying atmospheric trajectory analysis to problems in epidemiology. *Plant Dis.* 70:490-497.
- Derevnina L., Chin-Wo-Reyes S., Martin F., Wood K., Froenicke L., Spring O., Michelmore R. W. 2015. Genome sequence and architecture of the tobacco downy mildew pathogen *Peronospora tabacina*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.:1198-1215.
- Dutech C., Enjalbert J., Fournier E., Delmotte F., Barres B., Carlier J., Tharreau D. Giraud T. 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genet Biol.*: 44: 933-949.
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: Simple Sequences With Complex Evolution. *Nature Reviews, Genetics*.:435-445.
- French R. E., Hebert T. T. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. Instituto Interamericano

de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica.:174-178.

- García A. M. 1967. Enfermedades de las plantas en la República Mexicana. Ed. LIMUSA-Wiley. Mexico.:93.
- Green M. R., Sambrook J. 2012. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Fourth edition. Cold Spring harbor laboratory press.:6.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids. Symposium Series. Oxford University Press. 41:95-98.
- Halkett F., Simon J. Balloux, F. 2005. Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. Trends in Ecology & Evolution. 20(4):194-201. doi:10.1016/j.tree.2005.01.001.
- Hamilton M. B., Pincus E. L., Fiore A. D., Fleischer R. C. 1999. Universal Linker and Ligation Procedures for Construction of Genomic DNA Libraries Enriched for Microsatellites. BioTechniques. 27(3):500-507. doi:10.2144/99273st03.
- Heist E. P., Nesmith W. C., Schardl C. L. 2001. Cocultures of *Peronospora tabacina* and *Nicotiana* species to study host-pathogen interactions. Phytopathology. 91:1224-1230.
- Heist E. P., Nesmith W. C., Schardl C. L. 2002. Interactions of *Peronospora tabacina* with roots of *Nicotiana* spp. In gnotobiotic associations. Phytopathology. 92:400-405.
- Judelson H. S. 2012. Dynamics and Innovations within Oomycete Genomes: Insights into Biology, Pathology, and Evolution. Eukaryotic Cell.: 1304-1312.
- Judelson H. S. 2017. Metabolic Diversity and Novelty in the Oomycetes. Annu. Rev. Microbiol. 71:21-39.
- Karaoglu H., Lee C. M. Y., Meyer W. 2005. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. Mol Biol Evol. 22:639-649.
- Katti M. V., Ranjekar P. K., Gupta V. S. 2001. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. Mol Biol Evol. 18:1161-1167.
- Korbie D. J., Mattick J. S. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nature Protocols. 3(9):1452-1456. doi:10.1038/nprot.2008.133
- Latijnhouwers M, de Wit P. J. G. M., Govers F. 2003. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. Trends in Microbiology. 11(10): 462-469. doi:10.1016/j.tim.2003.08.002
- Liou J. T., Shieh B. H., Chen S. W., Li C. 1999. An Improved Alkaline Lysis Method for Miniprep of Plasmid Dna. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 29(1): 49-54. doi:10.1080/10826069908544692
- Liu K., Muse S. V. 2005. PowerMarker: integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics. 21:2128-2129. doi:10.1093/bioinformatics/bti282
- Lo Presti L., Lanver D., Schweizer G., Tanaka S., Liang L., Tollot M., Zuccaro A., Reissmann S., Kahmann R. 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. Annu Rev Plant Biol 66:513-545. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114623
- Lucas G. B. 1980. Blue mold. En: Diseases of tobacco. Biological Consulting Associates, Raleigh,

NC.:235-266.

- Milgroom M. G., Peever T. L. 2003. Population biology of plant pathogens.; The Synthesis of Plant Disease Epidemiology and Population Genetics. *Plant Disease*. 87(6):608-617.
- Milholland R. D., Papadopoulou J., Daykin M. 1980. Histopathology of *Peronospora tabacina* in systemically infected burley tobacco. *Phytopathology*. 71:73-76.
- Moges A. D., Admassu B., Belew D., Yesuf M., Njuguna J., Kyalo M. Ghimire S. R. 2016. Development of Microsatellite Markers and Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of *Colletotrichum gloeosporioides* from Ethiopia. *PLoS ONE* 11(3):1-18. e0151257. doi:10.1371/journal.pone.0151257.
- Monge Bonilla M. C. 2012. Economía del tabaco. *Acta méd. costarric* (online). vol.54, n.1, pp.8-14. ISSN 0001-6002. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0001-60022012000100003&script=sci_abstract&tlng=es
- Nesmith W. C. 1984. The North American blue mold warning system. *Plant Dis*. 68:933-936.
- Owati A., Agindotan B., Burrows M. 2019. First microsatellite markers developed and applied for the genetic diversity study and population structure of *Didymella pisi* associated with ascochyta blight of dry pea in Montana. *Fungal Biology*. 123:384-392.
- Perez, L., Rodriguez, M. E., Rodriguez, F., Roson, C. 2003. Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. *Crop Protection*. 22(2), 405–413. doi:10.1016/s0261-2194(02)00198-9
- Peixoto-Junior R. F., Creste S., Landell M. G. A., Nunes D. S., Sanguino A., Campos M. F., Vencovsky R., Tambarussi E. V. Figueira A. 2014. Genetic diversity among *Puccinia melanocephala* isolates from Brazil assessed using simple sequence repeat markers. *Genet Mol Res*. 13:7852-7863.
- Reuveni M., Tuzum S., Cole J. S., Siegel M. R., Kuc J. 1985. The effects of plant age and leaf position on the susceptibility of tobacco to blue mold caused by *Peronospora tabacina*. *Phytopathology*. 76:455-458.
- Reuveni M., Nesmith W. C., Siegel M. R. 1986. Symptom development and disease severity in *Nicotiana tabacum* and *N. repanda* caused by *Peronospora tabacina*. *Plant Dis*. 70:727-729.
- Ristaino J. B., Johnson A., Blanco-Meneses M., Liu B. 2007. Identification of the tobacco blue mold pathogen, *Peronospora tabacina*, by polymerase chain reaction. *Plant Disease*. 91:685-691.
- Romero C. S. 1983. Hongos fitopatógenos. Ed. LIMUSA. México, D.F. 476.
- Rozen S., Skaletsky H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, eds. *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Totowa, New Jersey: Humana Press.:365–386.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Planeación agrícola nacional. 2017-2030. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257072/Potencial-Chiles_y_Pimientos-parte_uno.pdf

- SIAP. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/832805/tabaco.pdf>
- Schaad N. W., Frederick R. D., Shaw J., Schneider W. L., Hickson R., Petrillo M. D., Luster D. G. 2003. Advances in molecular based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu Rev Phytopathol.* 41:305-324.
- Schena L., Cardle L. EL Cooke D. 2008. Use of genome sequence data in the design and testing of SSR markers for *Phytophthora* species. *BMC Genomics.* 9(620):1-23. doi:10.1186/1471-2164-9-620
- Shipton W. A., Brown J. F. 1962. A whole-leaf clearing and staining technique to demonstrate host-pathogen relationships of wheat stem rust. *Phytopathology.* 52:1313.
- Spring O., Hammer T. R., Zipper R., Billenkamp N. 2013. Population dynamics in tobacco blue mold incidences as a consequence of pathogen control and virulence performance of *Peronospora tabacina* phenotypes. *Crop Protection.* 45:76-82. doi:10.1016/j.cropro.2012.11.009
- Sukno S. A., Taylor A. M., Farman M. L. 2002. Genetic Uniformity Among Isolates of *Peronospora tabacina*, the Tobacco Blue Mold Pathogen. *Phytopathology.* 92(11):1236-1244. doi:10.1094/phyto.2002.92.11.1236
- The economics of tobacco use & tobacco control in the developing world. 2003. https://ec.europa.eu/health/archive/ph_determinants/life_style/tobacco/documents/world_bank_en.pdf
- Thines M. 2014. Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes-a global overview. *European Journal of Plant Pathology.* 138(3):431-447.
- Thines M., Choi Y-J. 2016. Evolution, diversity, and taxonomy of the Peronosporaceae, with focus on the genus *Peronospora*. *Phytopathology.* 106:6-18.
- Thines M., Sharma R., Sander Y. Rodenburg A., Gogleva A., Judelson H. S., Xia X., Hoogen J V., Kitner M., Klein J., Neilen M., Ridder D., Seidl M. F., Ackerveken G. V., Govers F., Schornack S., Studholme D. J. 2020. The genome of *Peronospora belbahrii* reveals high heterozygosity, a low number of canonical effectors and CT-rich promoters. *ResearchGate.*:1-34. doi: <https://doi.org/10.1101/721027>
- Tóth G., Gáspári Z. Jurka J. 2000. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research.* 10(7):967-981.
- Trigiano R. N., Wadl P. A., Dean D. Hadziabdic D. 2012. Ten polymorphic microsatellite loci identified from a small insert genomic library for *Peronospora tabacina*. *Mycologia.*:633-640.
- Tuzun S., Kuc J. 1985. A modified technique for inducing systemic resistance to blue mold and increasing growth in tobacco. *Phytopathology.* 75:1127-1129.
- Tuzum S., Nesmith W., Ferriss R. S., Kuc J. 1986. Effect of stem injections with *Peronospora tabacina* on growth of tobacco and protection against blue mold in the field. *Phytopathology.* 76:938-941.
- Voglmayr, H. 2008. Progress and challenges in systematics of downy mildews and white blister rusts: new insights from genes and morphology. *The Downy Mildews - Genetics, Molecular Biology and Control*, 3–18. doi:10.1007/978-1-4020-8973-2_2

- Wang X. W., Trigiano R. N., Windham M. T., Devries R. E., Scheffler B. E., Rinehart T. A. Spiers J. M. 2006. A simple PCR procedure for discovering microsatellites from small insert libraries. *Molecular Ecology Notes*. 7(4):558-561. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01655.x
- White T., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetic. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J (Eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego. Academic Press.: 315-322.
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol*.11:1-16.
- Zipper, R., Hammer, T. R., Spring, O. 2008. 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(3):367-375. doi:10.1007/s10658-008-9373-3

**2. GENETIC DIVERSITY OF *Peronospora tabacina* ISOLATES COLLECTED IN
TOBACCO-PRODUCING STATES OF MEXICO**

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE 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

Artículo publicado:

5 de abril de 2023

En la revista:

Mexican Journal of PHYTOPATHOLOGY

Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA

DOI:

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

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): 229-240.

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)_n o variaciones (TG)_n, también se visualizaron motivos (AC)_n, (CA)_n, (AT)_n

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)_n repeat motifs or (TG)_n variations, as well as (AC)_n, (CA)_n, (AT)_n and (AG)_n 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/cm² in a single lesion (Cohen, 1976).

y (AG)_n. 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/cm² 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 parásito 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 μL reaction volume using 7.5 μL of Master Mix, 1 μL of each oligonucleotide, 4.5 μL of water, and 1 μL 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 μL utilizando por reacción 7.5 μL de Master Mix, 1 μL de cada oligonucleótido, 4.5 μL de agua y 1 μL 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	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PT007	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PT014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PT028	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PT032	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PT047	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
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)_n or variations (TG)_n. Motifs (AC)_n, (CA)_n, (AT)_n, and (AG)_n 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 Trigliano *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)_n o variaciones (TG)_n, también se visualizaron motivos (AC)_n, (CA)_n, (AT)_n y (AG)_n, 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 accesión
PT002	CTGAACCATACGATGACCCCCATGGACCGCAGGGCACGTACGGGCT CTTGACGAAGAAAACGACAATGACTGAAGGACGTCGAGTCGACACG ATGCGTGCGTGTGTGTGTGTGTCTATGCAGTTGAGTTGTCCT TTCTAGTGCACGTGGAG	JF261112 100% de identidad
PT004	CAGTGGCTCGGAACCAGCACACACACACACACACAGTTCC ATAATATTTGGAAGGTGGCCAGCAGCAGGAAGAGCTTCTTCGTTGC AGCGA	JF261113 100% de identidad
PT007	AGAAGCAACCAACGGACAGGAAGCGGTGGGAAGGAAGAGATGCG AGACACACACACACACACGCGTTTCTAAGTTGGTTTGTGTATGGACA AGTAAAGAGGGAAATGCGTGCAGACAGAACGAACGGGTAATGGAGGA GACGAGTGTGGCAGCGCCAGCGGACGCGGGTCATGGCGGTGAGC AAGCGGAGCAGAGCATGGCTGGCTGACTTTTGACT	JF261114 95.91% de identidad
PT014	TATTTGTTTTCACTTGTGGCGTGCAGTTCCGATCCGCGTCTTGGGGG ACGTACGATACGGACGCGTTTTCTGTGTGCTATTTGAGACTCGTTGCTC TGTCGTTGACTGTACAAATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTA CGCTCTTGTGGCGTTTTGTTTT	JF261115 96.89% de identidad
PT028	TCGTTGGACGTTTCATGTATGTGTGTGTGTGTGCTTTGTGTAT TGTAGACGATTCTGCACCGCATCTATGGCAAGTCGATGGCATTG CGTTTCGTTTATCCGTCGCTCGATCAATGACATGTTCTAC	JF261116 100% de identidad
PT032	GAGTGGCGTCCGAAATTGGCGGTACGTGACGAGCGGCAGTTGCTCGT GCTTGATACGGGTTTACGGACTGTTTTGATGGTGTGTGTGTGTG	JF261118 98.92% de identidad
PT034	Datos no obtenidos	
PT041	Datos no obtenidos	
PT047	ATACATACCTCGCAACAACCCCCATCCTATACATGCAATAGACACACA CAAACATTCAAATGAACCATGAAACCACACGCCAATTCTTAGTTC ACTTTAAATACTATGTATACATCATATATATATAAAAAATGCATTGCCG GATACATAATAGAATCATAAATGCCTCGTCTGCATCCCTCA	JF261120 100% de identidad
PT048	ACACACACAGAGAGAGAAAGAGAGAGAGACACACACACACACA CACTGGTCATCATCCCGTTTTGAGTGTCTTACCTTGTTCCTCCCA TTTACCGGTAGTTTTATTGTTCAATCCAAAAATCTAAGTCCAAACC ACGACCCTACATCGTCA	JF261121 99.36% de identidad
PT054	GTCAGTAGCTGCGTTCTCAGTGCATTGGCATGCCCGTGTGTGCAT GGTGAGCGAGCAGGACGCTCTACAATCGGCAAAGTGAGCAGCAT TGATTGCGATAAGCAAATTCGATCAGATTGATCGAGCACTGATATG TTTGTGTGTGTGTGTGTGTCTGTCTGTAAAGTGGGCCATGTGTGGTA 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 CGATGCGTGCG TGTGTGTGTGTGTGTGTGT CTATGCAGTTGAGTTG TCCCTTTCTAGTGCACGTGGAG	GT GT GT GT GT GT GT GT GT
PT004	CAGTGGCTCGGAACCAGC CACACACACACACACACACAC AGT TCCATAATATTTGAAGGTGGCCAGCAGCAGGAAGAGCTTTCTTCG TTGCAGCGA	CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA
PT007	AGAAGCAACCAACGGACAGGAAGCGGTCGGGAAGGAAGAGATGC GAG CACACACACACACAC CGTTTCTAAGTTGGTTTGTGTATGG ACAAGTAAAGAGGGAAATGCGTGCAGACAAGCAACGGGTAATGG AGGAGACGAGTGTGGCAGCGGCCAGCGGACGCGCGGTTCATGGCGG TGAGCAAGCGGAGCAGAGCATGGCTGGCTGACTTTTACT	AC AC AC AC AC AC AC AC
PT014	TATTTGTTTTCACTTGTGGTGCAGTTCGGATCCGCGTTCTTGGGG GACGTACGATACGGACGCGTTTTCTGTGTGCTATTCGAGACTCGTT GCTCTGTCGTTGACTGTACAAAT TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT TCTGTGTGACGCTCTTGTGGCGTTTTGTTTT	TG TG TG TG TG TG TG TG TG TG TG
PT028	TCGTTGGACGTTTCATGTAT TGTGTGTGTGTGTGTGT GCTTTGTGTATTGT AGACGATTCTGCACCGCATCTATGGCAAGTCGATGGCATTGCGTTCGT TTATCCGTCGCTCGATCAATGACATGTTCTAC	TG TG TG TG TG TG TG TG
PT032	GAGTGGCGTCCGAAATTGGCGGTACGTGACGAGCGGCAGTTGCTCGT GCTTGATACGGGGTTTACGGACTGTTTTTGTATGG TGTGTGTGTGTGT	GT GT GT GT GT GT
PT034	Datos no obtenidos	
PT041	Datos no obtenidos	
PT047	ATACATACCTCGCAACAACCCCCATCCTATACATGCAATAGACACA CACAAACTATTCAAATGAACCATGAAACCACACGCCAATTCTTAG TTCACHTTAAATACTATGTATACAT CATATATATATATA AAAATGCAT TGCCGGATACATAATAGAATCATAAATGCCTCTGTCTGCATCCCTCA	AT AT AT AT AT AT
PT048	ACACACACAGAGAGAGAAA GAGAGAGAGACACACACACACA CACACT GGTCATCATCCCCGTTTCGAGTGTCTTCACCTTGTTCCTCC CATTTACCGGTAGTTTTTATTGTTCAATCCAAAATCTAAGTCCAAAC CACGACCTACATCGTCA	AG AG AG AG AG AG AC AC AC AC AC AC AC AC AC
PT054	GTCCTAGCTGCGTTCTCACGTGCGATTGGCATGCCCCGTGCTGTGCA TGGTGAGCGAGCAGGACGCCTCTACAATCGGCAAAGTGAGCAGCAT TGATTGCGATAAGCAAATTCGTATCAGATTGATCGAGCACTGATATGT TGTGTGTGTGTGTGT TCTTGTCTGTAAAGTGGGCCATGTGTGGTA CGATCATGCTGTTCCGTA	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>
- Caiazza 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/BI9760281>
- 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>
- Edeeva 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
- Jame 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>

### 3. HISTOPATHOLOGY OF *Peronospora tabacina* IN TOBACCO LEAVES

#### HISTOPATOLOGÍA DE *Peronospora tabacina* EN HOJAS DE TABACO

**Yadira Margarita Ramos-Barraza**, Laboratorio de Fitopatología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Subsede Culiacán, Carretera a El Dorado, Km 5.5, Campo El Diez, C.P. 80110, Culiacán, Sinaloa, México<sup>1</sup>. yadiramosbarraza@gmail.com; **Isabel Cruz-Lachica**<sup>1</sup> isabelcruzlachica@gmail.com; **Juan Manuel Tovar-Pedraza**<sup>1</sup> juan.tovar@ciad.mx; **José Benigno Valdez-Torres**<sup>1</sup> jvaldez@ciad.mx; **Raymundo Saúl García-Estrada**<sup>1\*</sup>. \*Autor de correspondencia: rsgarcia@ciad.mx

Artículo enviado a:

*Mexican Journal of PHYTOPATHOLOGY*

*Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA*

Fecha de envío:

27 de noviembre de 2024

**De:** Garcia Estrada, Raymundo S.

<rsgarcia@ciad.mx>

**Enviado:** miércoles, 27 de noviembre de 2024  
13:29

**Para:** Gustavo MA

**Cc:** Yadira Margarita Ramos Barraza

**Asunto:** Envío manuscrito para consideración

Buenas tardes Dr. Gustavo Mora  
Aguilera

Pongo a consideración del comité  
editorial de la RMF el siguiente  
manuscrito.

Saludos cordiales

URGENTE : rev ejecutiva  
manuscrito RMF Garcia E

28nov24 Externo Recibidos



Gustavo Mora... 28/11/2024



para Garcia, Gustavo, mí ▾

Estimado Raymundo

Recibimos su contribución  
titulada *Histopathology of  
Peronospora tabacina in tobacco  
leaves*

En una revisión ejecutiva su  
documento tiene el perfil para  
posible publicación en la RMF.

## **Histopathology of *Peronospora tabacina* in tobacco leaves**

## **Histopatología de *Peronospora tabacina* en hojas de tabaco**

**Yadira Margarita Ramos-Barraza**, Laboratorio de Fitopatología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Subsele Culiacán, Carretera a El Dorado, Km 5.5, Campo El Diez, C.P. 80110, Culiacán, Sinaloa, México<sup>1</sup>. yadiramosbarraza@gmail.com; **Isabel Cruz-Lachica**<sup>1</sup> isabelcruzlachica@gmail.com; **Juan Manuel Tovar-Pedraza**<sup>1</sup> juan.tovar@ciad.mx; **José Benigno Valdez-Torres**<sup>1</sup> jvaldez@ciad.mx; **Raymundo Saúl García-Estrada**<sup>1\*</sup>. \*Autor de correspondencia: rsgarcia@ciad.mx

**Resumen.** *Peronospora tabacina* es un oomiceto causante de moho azul en tabaco. Debido a la escasa información del proceso de infección del patógeno en plantas de tabaco, en este estudio se describe dicho proceso analizado con tinción diferencial de tejidos con safranina-verde rápido en plantas inoculadas y bajo condiciones de invernadero. Los cortes de tejido se realizaron a las 2, 4, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 148, 172, 196 y 220 horas después de la inoculación (hdi). La presencia de esporangiosporas adheridas a la cutícula de la hoja se observó entre 2 y 48 hdi; las cuales germinaron a partir de las 96 hdi. La penetración del patógeno en las hojas ocurrió de manera directa por medio de apresorios 96 hdi. Las primeras hifas de infección emergieron a partir de 96-120 hdi y entre 168 y 192 hdi se desarrollaron hifas intracelulares que colonizaron el interior de los tejidos provocando ruptura celular en parénquimas lagunar y clorofílico; así como en cloroplastos, haces vasculares y células epidérmicas. El patógeno completó su ciclo de infección al producir oosporas y esporangios a las 192 hpi, considerándose una fuente de inóculo para la infección de nuevos tejidos.

**Palabras clave:** Patógeno intracelular, Patógeno intercelular, oosporas, patogénesis, oomiceto, biótrofo.

**Abstract.** *Peronospora tabacina* is an oomycete that causes blue mold in tobacco. Due to the scarce information on the infection process of the pathogen in tobacco plants, this study describes this process analyzed with differential staining of tissues with safranin-fast green in inoculated plants and under greenhouse conditions. Tissue sections were made at 2, 4, 6, 9, 12, 12, 18, 18, 20,



24, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 148, 172, 196 and 220 hours after inoculation (hdi). The presence of sporangiospores attached to the leaf cuticle was observed between 2 and 48 hdi; they germinated after 96 hdi. Penetration of the pathogen into the leaves occurred directly by appressoria 96 hdi. The first hyphae of infection emerged from 96-120 hdi and between 168 and 192 hdi intracellular hyphae developed and colonized the interior of the tissues causing cellular rupture in lagunar and chlorophyll parenchyma, as well as in chloroplasts, vascular bundles and epidermal cells. The pathogen completed its infection cycle by producing oospores and sporangia at 192 hpi, being considered a source of inoculum for the infection of new tissues.

**Keywords:** Intracellular pathogen, Intercellular pathogen, Oospores, Pathogenesis, Oomycete, Biotroph.

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) se cultiva en 124 países (<http://tobaccoatlas.org/topic/growing/>) y se considera un cultivo comercial importante para la economía agrícola de dichos países, particularmente en las naciones en desarrollo de Asia y África (Nowicki *et al.*, 2021). Derivado de su uso principal que es la fabricación de cigarrillos y puros; entre otros, el cultivo de esta planta representa beneficios económicos y sociales generados tanto por las exportaciones de las mismas como por la creación de fuentes de trabajo tanto en el área rural como en la urbana. Debido a lo anterior, su producción es una actividad relevante en varias partes del mundo, como Brasil, China, EE. UU. e India.

En México, el área de cultivo de tabaco se ha mantenido estable por una década. En el año 2008, se dedicaban 5,900 hectáreas para la siembra de este cultivo, el cual aumentó a 6,600 en el año 2018 (SIAP, 2023). En ese año, la producción de tabaco fue de 15,181 toneladas, incrementando en un 32% con respecto al año 2008 y ocupó la posición número 7 entre los principales productores de América, por detrás de Brasil, Estados Unidos, Argentina, Cuba, Guatemala y Canadá.

En 2019, el tabaco tuvo un incremento en su producción del 11%, resultado de mayor rendimiento por parte de Nayarit, el estado líder en producción de tabaco en México, en donde la mayor producción se obtiene durante el mes de mayo aportando alrededor de 43% de la producción nacional anual. Cabe mencionar que, los agricultores en esta entidad, recibieron más de 37 mil 700

pesos por tonelada (<https://www.gob.mx/conasama/documentos/dia-mundial-sin-tabaco-2024?idiom=es>).

Al igual que otros cultivos, el tabaco es susceptible al daño por enfermedades causadas por patógenos infecciosos pertenecientes al grupo de los hongos y oomicetos. En este sentido, los oomicetos biotróficos de las plantas causan importantes problemas en la producción, pérdidas económicas en la agricultura moderna, ya que estos presentan una alta variabilidad genética y una rápida adaptación para su sobrevivencia (Latijnhouwers *et al.*, 2003).

*Peronospora* spp. normalmente se limitan a hospedantes específicos o a un número de hospedantes relacionados y son capaces de causar daños graves. Se han reportado pérdidas económicas en cultivos ornamentales y cultivos alimenticios a nivel mundial y la enfermedad del mildiú vellosa causada por este fitopatógeno se considera una de las enfermedades más importantes de este cultivo, ya que puede provocar graves pérdidas económicas. En Estados Unidos, la *P. tabacina* incluso ha sido clasificada como una potencial arma biológica, ya que su presencia podría afectar gravemente la economía de este país en lo que respecta a la industria del tabaco (Thines y Choi, 2016). Entre los seis oomicetos biotróficos más importantes se menciona a *Peronospora tabacina*, causante moho azul del tabaco. Este oomiceto es un biótrofo obligado que requiere de un tejido vivo del hospedante para completar su ciclo de vida (Perfect *et al.*, 1999, Webster y Weber, 2007). El moho azul del tabaco es una enfermedad policíclica y en condiciones favorables para su desarrollo, el patógeno puede completar su ciclo de vida en 10 días o menos (Heist *et al.*, 2002). El inóculo primario y secundario de *P. tabacina* consiste en esporangios asexuales, que normalmente son producidos en las hojas y tallos de plantas infectadas, observándose una esporulación activa en tejido foliar de hasta un millón de esporangios/cm<sup>2</sup>, siendo este un factor importante que puede contribuir a la devastación completa de los cultivos de tabaco infectados. Los esporangios de este patógeno tienen la capacidad de viajar largas distancias y causar enfermedades a varios cientos de kilómetros de su lugar de origen (Hall, 1989; Heist *et al.*, 2004; Spring *et al.*, 2018).

Los síntomas que ocasiona *P. tabacina* comúnmente son lesiones o manchas amarillas en las hojas de tabaco que aparecen individualmente o en grupos, y en muchas ocasiones se fusionan para formar áreas necróticas de color marrón claro. Algunas de las hojas presentan un moho vellosa de color gris azulado en el haz de estas. Las hojas enfermas pueden deformarse hacia arriba. En tales

casos, el color azulado de las plantas enfermas se vuelve bastante llamativo, especialmente en presencia de alta humedad relativa cuando la esporulación es abundante, de ahí el nombre de la enfermedad: moho azul del tabaco (Borrás-Hidalgo *et al.*, 2010). Para una identificación rápida y confiable de posibles fenotipos de virulencia de *P. tabacina* se sugiere el monitoreo intensivo del mismo, lo que sería fundamental para prevenir epidemias y las pérdidas económicas en la agricultura, para esto se requiere la identificación de los caracteres del patógeno que se correlacionan con el comportamiento de la infección.

Conocer el proceso y las estrategias que utiliza *P. tabacina* para causar infección en las plantas de tabaco es de suma importancia, ya que se sabe que algunas estrategias de ciertos patógenos están correlacionadas con la especificidad en el hospedante (Pring *et al.*, 1995), con lo cual se podría determinar el proceso de infección, lo que proporcionaría herramientas útiles para un adecuado manejo de la enfermedad, al conocer el periodo en el que se desarrolla el patógeno en el hospedante. Actualmente se conoce poco sobre el proceso de patogénesis de *P. tabacina*, por lo que el objetivo de este estudio fue describir los cambios histológicos que se presentan durante la infección de *P. tabacina* en plantas de tabaco inoculadas artificialmente.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizaron plantas sanas de tabaco de tres meses de edad y se utilizó como inóculo el aislado Pt1SA de *P. tabacina* proveniente de San Andrés, Tuxtla, Veracruz, México y caracterizado molecularmente con los oligonucleótidos específicos PTAB e ITS4 para *P. tabacina* (Ramos-Barraza *et al.*, 2023). La suspensión de esporangios se preparó a partir hojas de tabaco con esporulación activa del oomiceto, recolectando los esporangios con un pincel y ajustando a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporangiosporas/mL mediante el conteo de las esporas en una cámara de Neubauer.

La superficie del envés de 15 plantas de tabaco se desinfectó con etanol al 70 % por 1 min, se lavó con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se inocularon Se seleccionaron diez sitios por hoja en cada planta de  $1 \text{ cm}^2$  que fueron inoculados con 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión de esporangiosporas. Como tratamiento testigo, se colocaron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril en cinco plantas de tabaco. Tanto las plantas de tabaco inoculadas como las plantas de tabaco testigo se colocaron en un invernadero tipo malla sombra a temperatura ambiente

que varió en un rango de 15 a 17°C y una alta humedad relativa (95-100%), condiciones que se consideran propicias para el desarrollo de la enfermedad.

De las plantas de tabaco, se realizaron 5 cortes de tejido (cada uno de 1 cm<sup>2</sup>), de los sitios inoculados a las 2, 4, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 148, 172, 196 y 220 horas después de la inoculación (hdi), y se colocaron en casetes de plástico para su fijación. Las muestras se sumergieron en solución fijadora FAA (10 % formaldehído, 5 % ácido acético glacial, 50 % etanol al 96%) durante al menos 24 h. Los tejidos se lavaron tres veces en etanol a 50% durante 15 min cada uno, luego se deshidrataron gradualmente en una serie de etanol (50, 70, 96 y 100%), transfiriéndose posteriormente a alcohol absoluto-xileno (1:1), dos cambios de xileno y dos cambios en parafina Paraplast (3 horas por cada paso de deshidratación). La inclusión de los tejidos consistió en embeber las muestras en moldes metálicos con parafina fundida orientándose longitudinal o transversalmente para posteriormente realizar cortes en un micrótopo (Rojo-Báez *et al.* 2016; Cruz-Lachica *et al.*, 2018).

Se cortaron secciones longitudinales y transversales de 10 µm de espesor en un microtomo rotatorio Leica RM2125 RT (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania) y estos fueron adheridos en portaobjetos previamente preparados con adhesivo Haupt y agua en un calentador de portaobjetos (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), a una temperatura de 40 °C durante 24 h para su secado. Posteriormente, se inició con la eliminación de parafina de los cortes mediante tres cambios de xileno (3 min en cada uno), después se hidrataron con una serie gradual de alcohol etílico (100, 96, 70 y 50 %) por 3 min cada uno. La tinción en safranina al 1 % (preparada en alcohol etílico a 50 %) se realizó por 3 h. Después los cortes, se deshidrataron en una serie de alcohol etílico a 50, 70 y 96 % (3 min en cada uno) y tiñeron con verde rápido (Técnica Química®, México) al 1 % (preparada en alcohol etílico al 96 %) por 30s. Enseguida se lavaron y deshidrataron pasándolos por alcohol etílico al 96 y 100 %, por 3 min en cada uno. Finalmente, las secciones teñidas se pasaron por tres cambios de xileno (3 min en cada uno), se cubrieron con resina Entellan y los cubreobjetos se dejaron secar durante 24 h (Fierro-Corrales *et al.*, 2015). Las secciones teñidas fueron observadas en un microscopio óptico marca Carl Zeiss Imager A2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con cámara integrada, para visualizar los daños en los tejidos en objetivos de 10, 20 y 40X.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron esporangios de *P. tabacina* sin germinar, adheridos en la superficie de la hoja entre las 2 y 48 hdi (Figura 1C y 1D). La adhesión de las esporas a las plantas hospedantes es esencial para el inicio de la enfermedad en las interacciones patógeno-planta (Perfect *et al.*, 1999). El inicio de la germinación de los esporangios se observó a partir de las 96 hdi (Figura 2E) y el patógeno mostró la capacidad de formar apresorios melanizados en el extremo apical de los tubos germinativos de los esporangios de color café oscuro, de forma globosa a irregular (Figura 2 E-1), mediante los cuales el patógeno se adhirió y penetró por aberturas naturales como lo son los estomas de las hojas (Figura 2E). La adhesión de los tubos germinativos y los apresorios a las superficies suele ser más fuerte que la de las esporas. La adhesión de los apresorios es particularmente fuerte para proporcionar una base firme para la penetración, lo que fue señalado por Pain *et al.* (1996), quienes indican que los fragmentos de la pared celular de los apresorios permanecen adheridos al sustrato después de la sonicación o agitación (Pain *et al.*, 1996). La germinación directa de los esporangios ha evolucionado de forma independiente en varios géneros (por ejemplo, *Peronospora*). El modo de penetración del patógeno es tan diverso como el comportamiento del esporangio. Mientras que, los oomicetos parásitos de las raíces suelen formar apresorios para invadir los tejidos internos penetrando directamente en las células rizodérmicas o apretándose entre la lámina media de las células (por ejemplo, *Pythium*, *Aphanomyces*, etc.), otras especies que atacan las hojas de forma similar (por ejemplo, *Peronospora* y *Bremia*) utilizan los estomas como puntos de entrada (Spring *et al.*, 2018).

Después de la formación de los apresorios, se observó el desarrollo de las primeras hifas de infección; las cuales se observaron a partir de las 96-120 hdi (Figura 2F). En el lapso de 96-120 hdi se determinó la presencia de hifas secundarias invadiendo en forma intracelular los tejidos de la hoja-(Figura 2-E2), lo cual coincidió con lo reportado por Milholland *et al.* (1981) quienes mencionaron que, aunque *P. tabacina* se propaga intercelularmente por todo el tejido vascular, también se observan hifas intracelulares en algunos vasos del xilema y células del parénquima.

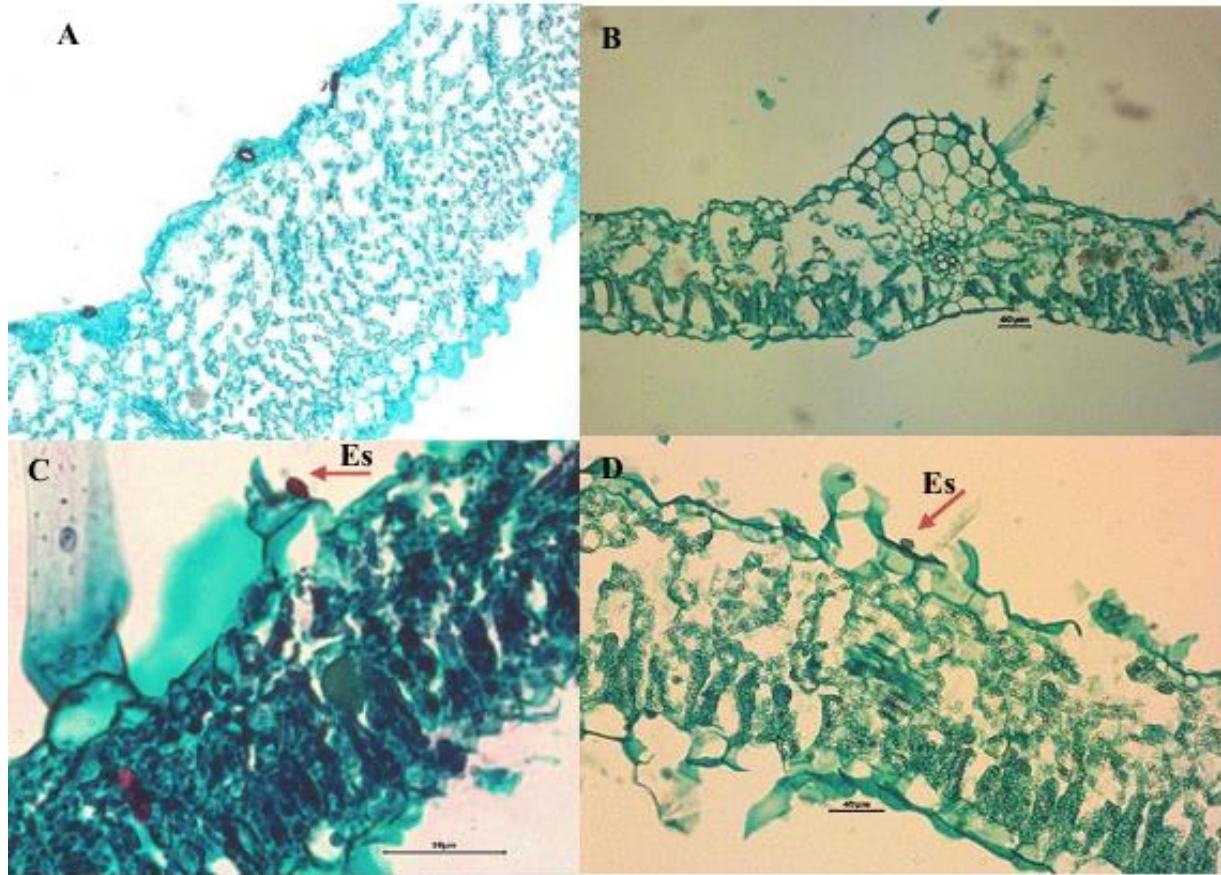


Figura 1. Etapas del proceso de infección de *P. tabacina* en hojas de tabaco inoculadas artificialmente. A) Corte transversal de hoja sana de tabaco mostrando epidermis adaxial y abaxial, B) Corte longitudinal de hoja sana de tabaco mostrando epidermis adaxial y abaxial, Barra = 40  $\mu$ m). C) Corte longitudinal de hoja de tabaco a las 24 hdi, observación de esporangio (Es) en la base de un tricoma. D) Corte longitudinal de hoja de tabaco a las 48 hdi, observación de esporangio en la epidermis.



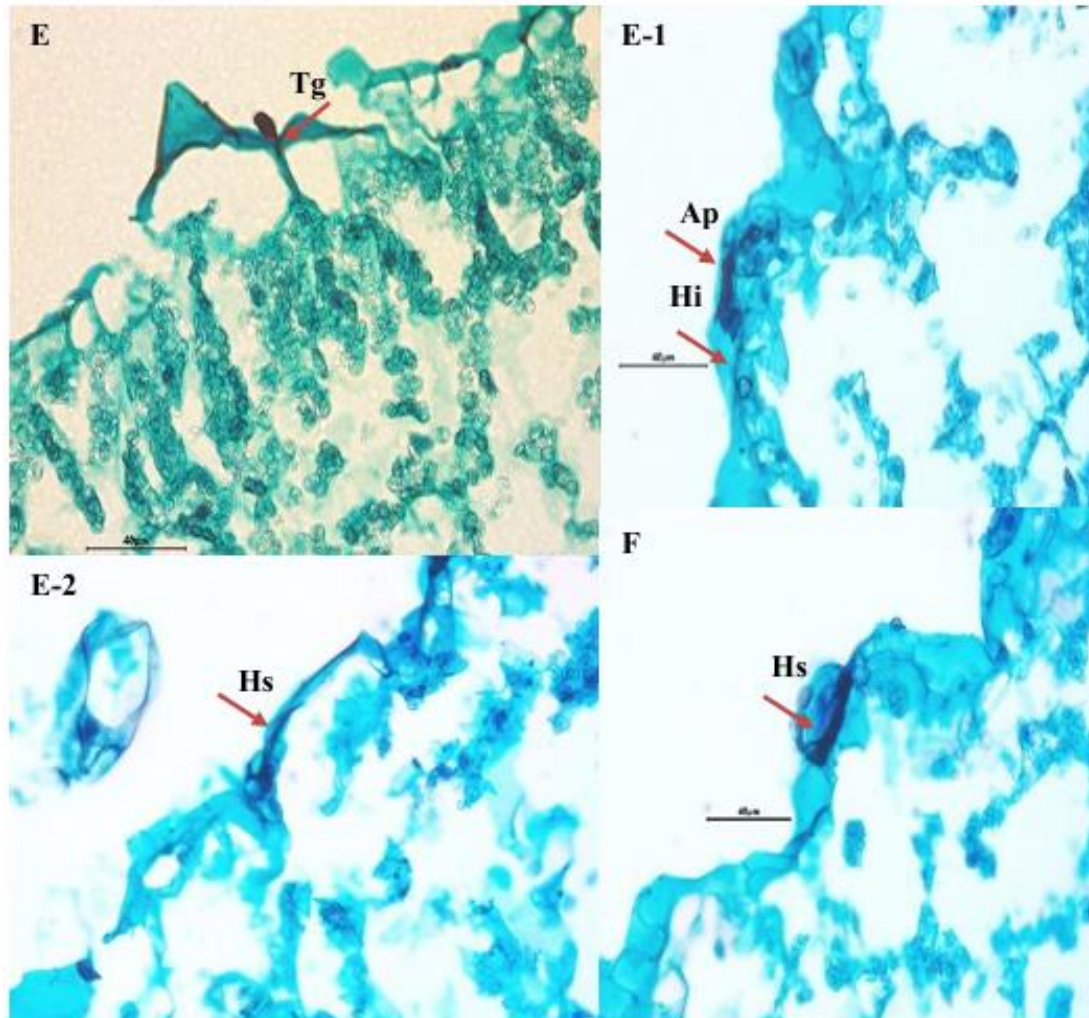


Figura 2. E) Corte longitudinal de hoja a las 96 hdi con observación de tubo germinativo emergiendo de un esporangio. Barra = 40  $\mu$ m. E-1) Corte longitudinal de hoja a las 96 hdi con observación de hifas de penetración (Hp) emergiendo del apesorio (Ap), Barra = 40  $\mu$ m. E-2) Corte longitudinal de hoja a las 96 hdi con presencia de hifas infectivas secundarias (Hs) invadiendo intracelularmente. F) Corte longitudinal de la hoja a las 120 hdi con observación de hifas de infección (Hi) emergiendo de apesorio e invadiendo tejidos intracelularmente, Barra = 40  $\mu$ m.

Entre las 168 y 192 hdi se observó el desarrollo de hifas primarias intracelulares (Fig. 3-F1) e hifas secundarias cenocíticas colonizando el interior de los tejidos y provocando desorden celular y destrucción del parénquima lagunar, parénquima clorofílico y cloroplastos, haces vasculares y células epidérmicas de la hoja (Fig. 3G-G-6). Durante la colonización de plantas hospedantes, los oomicetos patógenos presentan dos modos principales de nutrición: biotrofia, en la que los

nutrientes se obtienen de las células hospedantes vivas, y necrotrofia, en la que los nutrientes se obtienen de las células hospedantes muertas que han sido atacadas por el oomiceto (Perfect *et al.*, 1999). Dentro de la familia Peronosporaceae se han desarrollado haustorios como una estructura celular especializada que penetra en la pared celular del hospedante, pero no altera el plasmalema. De este modo, las células vegetales afectadas permanecen vivas y su metabolismo apoya continuamente al patógeno. Este tipo de interacción es típico de los biótros como los mildius (Spring *et al.*, 2018).

La destrucción de los tejidos epidérmicos (Figura 3-G1) se asocia con la coloración oscura en la superficie de las plantas de tabaco en contraste con las hojas de las plantas testigo, en las cuales no se observaron los síntomas de la enfermedad (Figuras 4C y 4D). Entre las 192 y 216 hdi, el patógeno completó su ciclo de vida al producir oosporas y esporangios (Figura 3-G1), los cuales son la fuente de inóculo para infecciones en nuevos tejidos. Las oosporas se producen en el interior de los tejidos de la hoja afectada, cuando se encuentra en contacto con el suelo. Las oosporas al madurar no germinan de inmediato, sino hasta después de que la hoja se haya caído al suelo. Estas permanecen en el suelo y germinan en el momento adecuado para iniciar la infección en plantas jóvenes. La formación de oosporas varía, en algunos casos es extensa y en otros casos su presencia es casi indetectable. Lo antes señalado es probablemente debido a cambios ambientales adversos. Algunos autores han demostrado que las oosporas pueden sobrevivir hasta 4 años. Otros investigadores demostraron que la infectividad de las oosporas a niveles bajos puede ser de hasta 50 meses en suelos. También se ha demostrado que la morfología de las oosporas difiere según los distintos aislados del patógeno (LaMondia, 2010; Spurr y Todd, 1982). La infección puede iniciarse a partir de oosporas diploides formadas sexualmente o con frecuencia, a partir de esporangios diploides asexuados, que se producen para la propagación masiva y normalmente se distribuyen por el viento (Spring *et al.*, 2018). Un aspecto importante del proceso de patogénesis es la estrategia de infección empleada por el patógeno (Perfect *et al.*, 1999). El daño celular y la producción de oosporas y esporangios se asociaron con la aparición de lesiones amarillentas de forma irregular, las cuales con el paso del tiempo se vuelven de color café oscuro a negro, aproximadamente al noveno día después de la inoculación (Figuras 4C y 4D), en contraste con la hoja testigo (Figuras 4A y 4B).



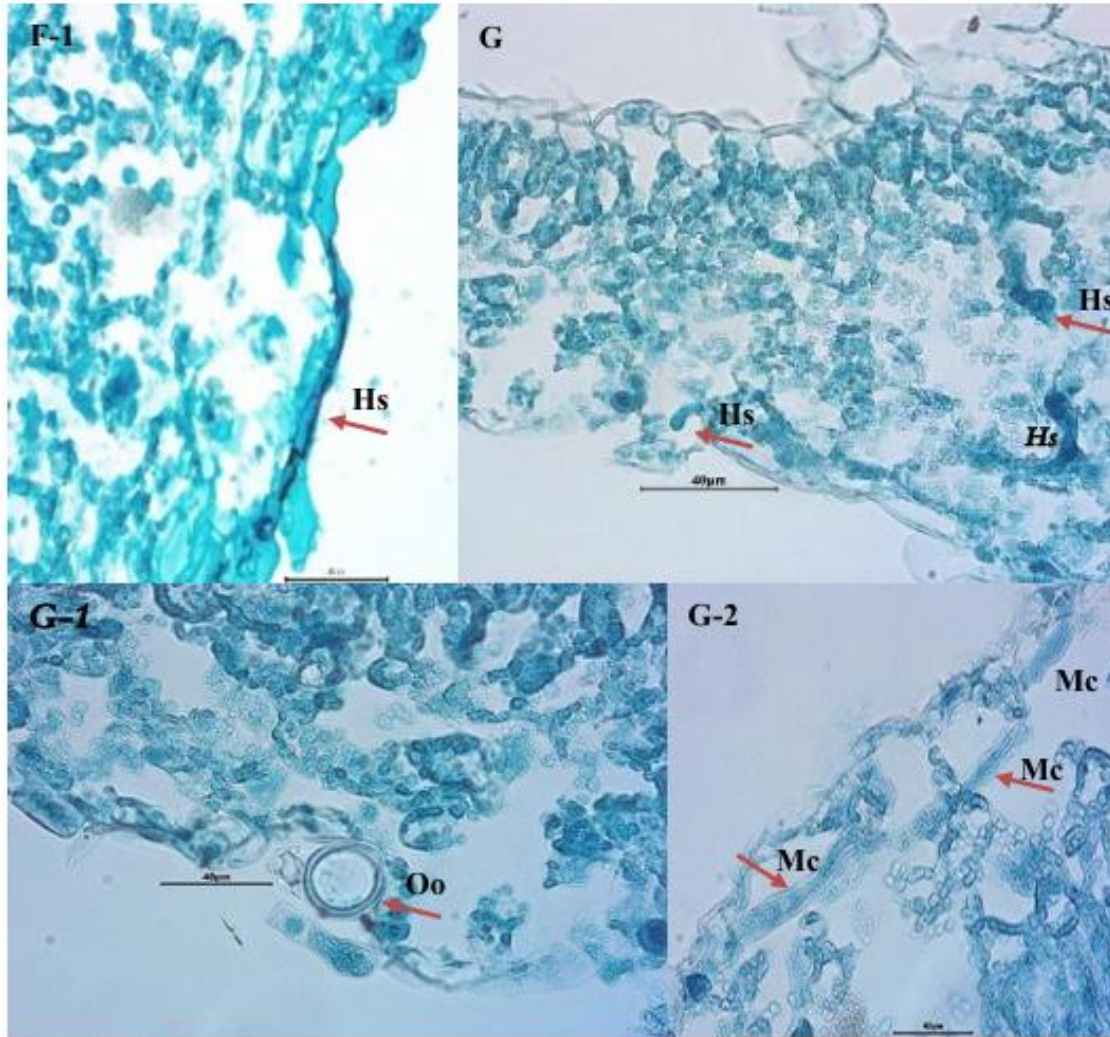


Figura 3. F-1) Corte longitudinal de hoja a las 120 hdi con presencia de hifas secundarias (Hs) de infección invadiendo intracelularmente, G) Corte longitudinal de hoja a las 192 hdi mostrando crecimiento de hifas secundarias cenocíticas creciendo intracelularmente, G-1) Corte longitudinal de hoja a las 192 hdi mostrando formación de oosporas (Oo) y esporangio, G-2) Corte longitudinal de hoja a las 192 hdi con presencia de micelio cenocítico (Mc), provocando desorden celular, destruyendo parénquima lagunar, parénquima clorofílico y cloroplastos, haces vasculares y células epidérmicas de la hoja.



Figura 4. Síntomas de moho azul ocasionados por el aislado PtISA de *P. tabacina* en tabaco. A) plantas sanas de tabaco utilizadas para la inoculación con el patógeno. B) Plantas sin inocular utilizadas como testigos. C) y D) Hojas de tabaco con síntomas en superficie adaxial y abaxial observados a partir de las 168 hdi.

En los cortes que se realizaron en plantas con síntomas visibles de la enfermedad a través de toda la hoja provocados por la presencia del patógeno *P. tabacina*, se observó destrucción masiva de las células de las plantas de tabaco, tanto en epidermis (abaxial y adaxial), como en el mesófilo y en los haces vasculares (Figura 6, H1-H3). Lo anterior coincide con los resultados y hallazgos observados por Milholland *et al.* (1981), quienes encontraron hifas intercelulares e intracelulares de *P. tabacina* en el xilema de plantas de tabaco infectadas sistémicamente.



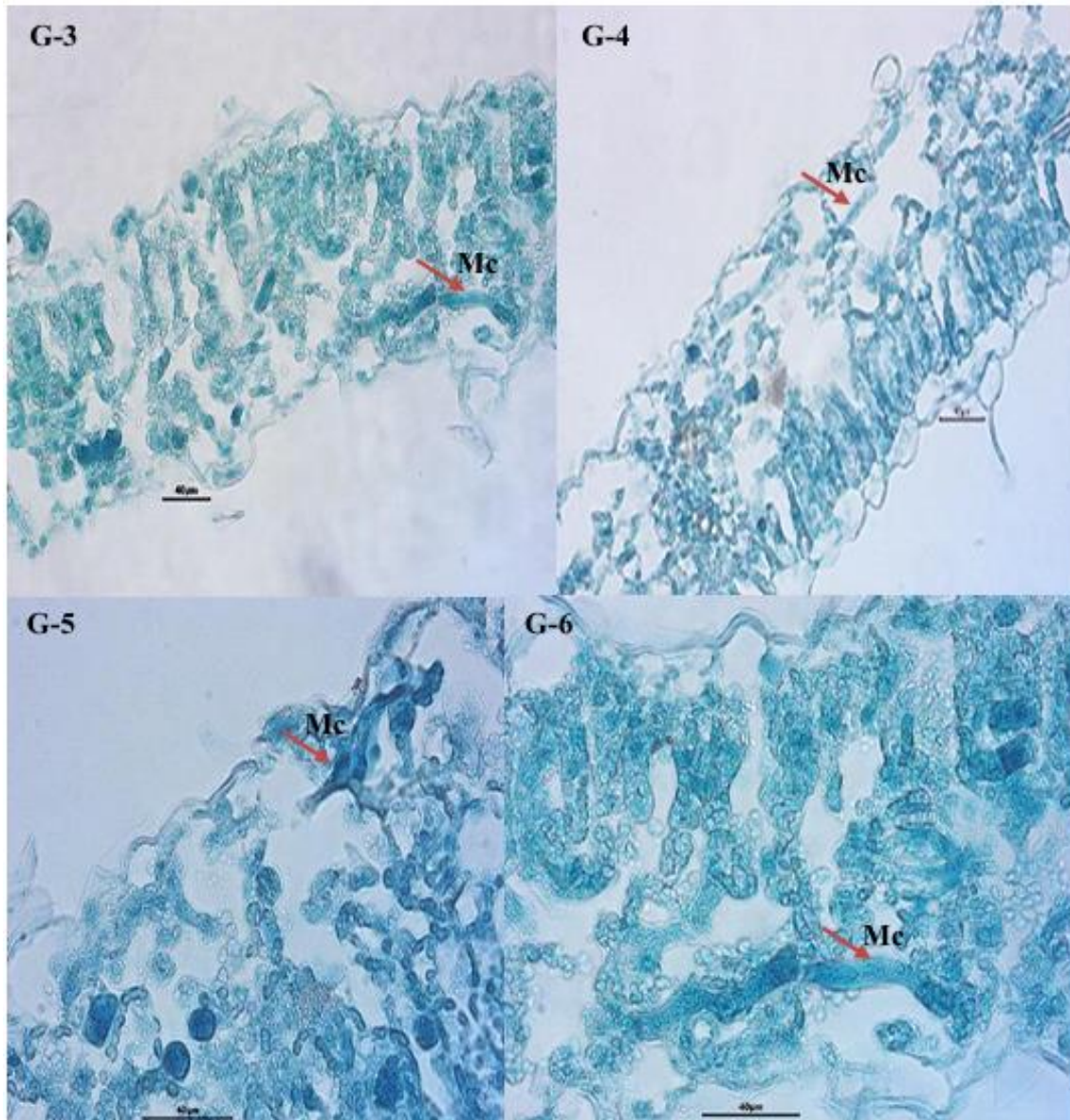


Figura 5. G-3, 4, 5, 6) Corte longitudinal de hoja a las 192 hdi mostrando crecimiento de abundante micelio cenocítico invadiendo intracelularmente los tejidos y destruyendo los tejidos vegetales de la hoja de tabaco.



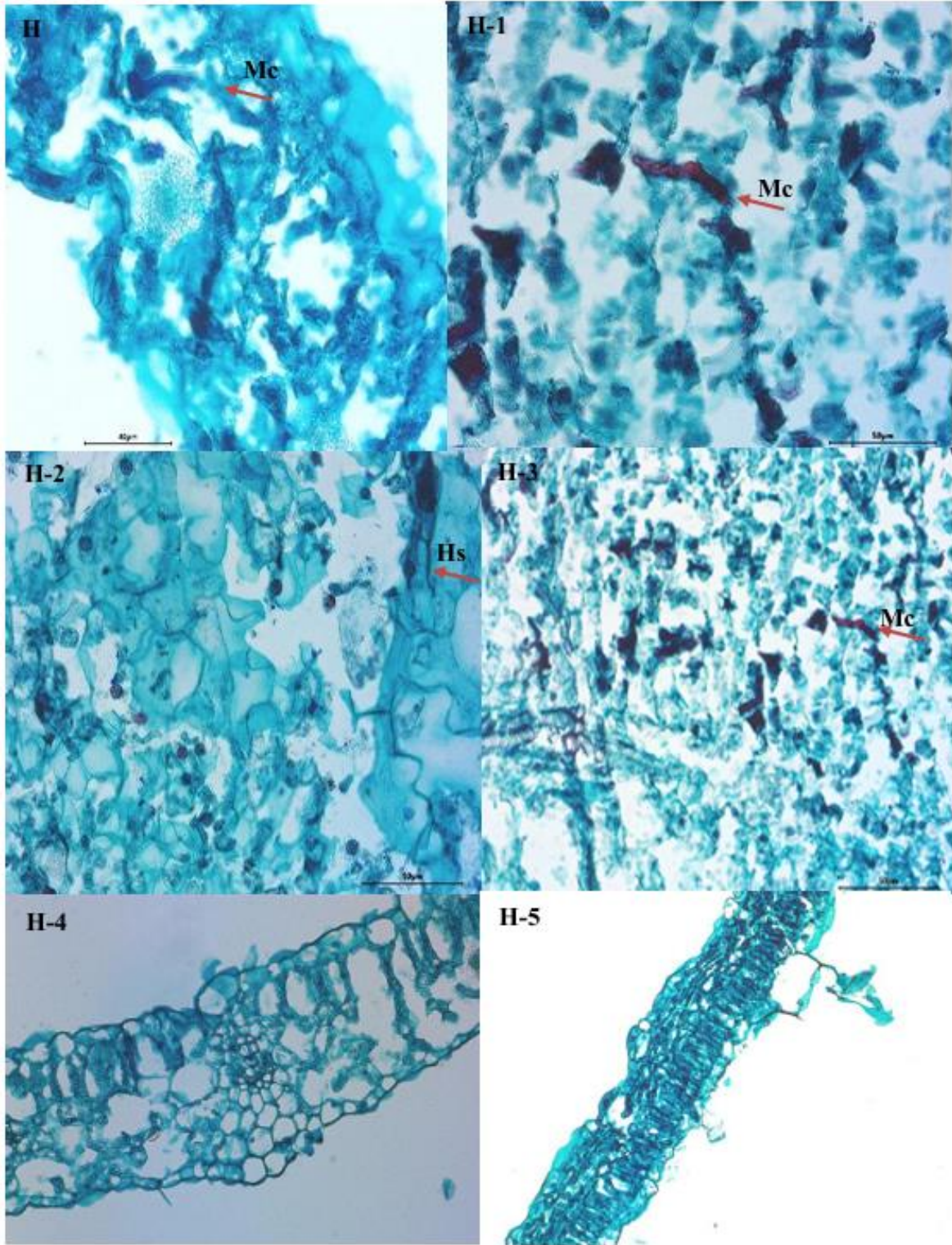


Figura 6. H, H1-H3) Corte longitudinal de hoja a las 216 hdi mostrando hifas secundarias, micelio cenocítico, colonizando por completo el interior de los tejidos provocando desorden celular y así

destruyendo parénquima lagunar, parénquima clorofílico y cloroplastos, haces vasculares y células epidérmicas de la hoja, también se observan hifas secundarias, invadiendo los tejidos celulares intercelular e intracelularmente, H4-H5 Corte longitudinal de hoja sana de tabaco mostrando epidermis adaxial y abaxial.

## CONCLUSIONES

*P. tabacina* tiene la capacidad de infectar intercelular e intracelularmente a su hospedante y causó síntomas en hojas de tabaco a las 168 h después de la inoculación. Este patógeno es capaz de producir esporangios y oosporas desde las 96 h después de la inoculación, tiempo en el que por lo general completa su ciclo de vida. Estos resultados contribuyen a comprender el proceso de infección en el ciclo de la enfermedad causada por *P. tabacina* en plantas de tabaco y son útiles para emplear estrategias en el manejo de la enfermedad.

## Agradecimientos

Los autores agradecen la contribución económica del CONAHCYT para la realización de este proyecto y de igual manera al laboratorio de Fitopatología, técnicos e investigadores del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Subsede Culiacán.

## LITERATURA CITADA

Borrás-Hidalgo O, Thomma BPHJ, Silva Y, Chacón O, & Pujol M. 2010. Tobacco blue mould disease caused by *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. *Molecular Plant Pathology*, 11(1): 13-18. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00569.x

Cruz-Lachica I, Marquez-Zequera I, Allende-Molar R, Leon-Felix J, Sañudo-Barajas JA, Ley-Lopez N, & García-Estrada RS. 2018. Infection process of *Gilbertella persicaria* in papaya (*Carica papaya* L.) fruits. *Journal of General Plant Pathology*. doi:10.1007/s10327-018-0798-z

Ficha técnica para la conmemoración del día mundial sin tabaco. 2023. <https://www.gob.mx/conasama/documentos/dia-mundial-sin-tabaco-2024?idiom=es>

Fierro-Corrales D, Apodaca-Sánchez MA, Quintero-Benítez JA, Leyva-Mir SG, Flores-Sánchez JL, & Tovar-Pedraza JM. 2015. Morphological characterization and histopathology of

*Peronospora ciceris* in chickpea (*Cicer arietinum* L.) leaves and seeds. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 21(1): 81-92. doi: 10.5154/r.rchsh.2014.02.010

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>

Heist EP, Zaitlin D, Funnell DL, Nesmith WC and Schardl CL. 2004. Necrotic lesion resistance induced by *Peronospora tabacina* on leaves of *Nicotiana obtusifolia*. *Phytopathology*. 94:1178-1188. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1178>

Heist EP, Nesmith WC & Schardl CL. 2002. Interactions of *Peronospora tabacina* with roots of *Nicotiana* spp. in gnotobiotic association. *Phytopathology*, 92, 400-405. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.4.400>

LaMondia JA. 2010. January temperatures predict tobacco blue mold severity: Evidence for local source and long-distance transport of inoculum in Connecticut. *Plant Dis*. 94:119-124. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0119>

Latijnhouwers M, de Wit PJGM & Govers F. 2003. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology*. 11(10): 462-469. doi:10.1016/j.tim.2003.08.002

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/PHYTO-03-21-0092-R>

Pain NA, Green JR, Jones GL and O'Connell RJ. 1996. Composition and organization of extracellular matrices around germ tubes and appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Protoplasma* 190: 119-130. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01281311>

Perfect SE, Hughes HB, O'Connell RJ & Green JR. 1999. *Colletotrichum*: A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal–Plant Interactions. *Fungal Genetics and Biology*. 27(2-3): 186-198. doi:10.1006/fgbi.1999.1143

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): 229-240. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-5>

Rojo-Báez I, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar R. 2016. Histopatología del proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en hojas de papaya y chícharo. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 34: 316-325. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1604-3

Spring O, Gomez-Zeledon J, Hadziabdic D, Trigiano RN, Thines M & Lebeda A. 2018. Biological Characteristics and Assessment of Virulence Diversity in Pathosystems of Economically Important Biotrophic Oomycetes, *Critical Reviews in Plant Sciences*. 37(6): 439-495. doi: 10.1080/07352689.2018.1530848

Spurr HW Jr and Todd FA. 1982. Oospores in blue mold diseased North Carolina burley and flue-cured tobacco. *Tob. Sci.* 26:44-46. [https://www.coresta.org/sites/default/files/abstracts/Tobacco\\_Science\\_1982\\_26-13\\_p.\\_44-46\\_ISSN.\\_0082-4523.pdf](https://www.coresta.org/sites/default/files/abstracts/Tobacco_Science_1982_26-13_p._44-46_ISSN._0082-4523.pdf)

Thines M and Choi YJ. 2016. Evolution, Diversity, and Taxonomy of the Peronosporaceae, with Focus on the Genus *Peronospora*. *Phytopathology*. 106(1): 6-18. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-15-0127-RVW>

Webster J & Weber R. 2007. Introduction to fungi (Vol. Tercera edición): Cambridge University Press. 875 pág. <http://deskuenvis.nic.in/pdf/WEBSTER30521807395.pdf>

#### 4. CONCLUSIONES GENERALES

Mediante la técnica de PCR y la utilización de microsatélites moleculares de ADN 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. Así mismo, se determinó que *P. tabacina* tiene la capacidad de infectar los tejidos de las hojas de tabaco intercelular e intracelularmente causando síntomas de la enfermedad en las plantas a las 168 h después de la inoculación. Este oomiceto es capaz de producir esporangios y oosporas desde las 96 h después de la inoculación, tiempo en el que por lo general completa su ciclo de vida. Estos resultados contribuyen a comprender el proceso de infección en el ciclo de la enfermedad causada por *P. tabacina* en plantas de tabaco y son útiles para emplear estrategias en el manejo de la enfermedad.



## 5. RECOMENDACIONES

Debido a qué, se desconoce el papel que juegan algunas moléculas efectoras producidas por *Peronospora tabacina* para causar infección en su planta huésped, se recomienda realizar más investigación acerca de la expresión de ciertos genes como lo son los péptidos inductores de necrosis y etileno (Necrosis- and Ethylene-inducing peptide 1-like proteins) o NLPs por sus siglas en inglés, ya que existen antecedentes de que se encuentran ampliamente distribuidos en genomas bacterianos, fúngicos; así como, en oomycetes fitopatógenos incluyendo a *P. tabacina*; además de que, se conoce que desencadenan la respuesta inmune de la planta con subsecuente muerte celular, por lo que su análisis a lo largo del proceso de infección podría generar un conocimiento más profundo para mejorar nuestro entendimiento sobre este importante patógeno.