

Strain of *Pseudomonas syringae* causes bacterial leaf spot in marigold plants (*Tagetes erecta*) in Mexico

Cepa de *Pseudomonas syringae* causante de la mancha bacteriana en cempasúchil (*Tagetes erecta*) en México

Luis David Maldonado-Bonilla, CONACYT-Universidad del Mar, Instituto de Genética, Carretera Vía Sola de Vega S/N, C.P. 71980, Puerto Escondido, Oaxaca, México; **Gustavo Hernández-Guzmán**, Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos, Campus Irapuato-Salamanca, km 9, Carretera Irapuato-Silao, Colonia El Copal, C.P. 36500, Irapuato, Guanajuato, México; **Norma Angélica Martínez-Gallardo, José Luis Hernández-Flores, John Paul Délano-Frier**, CINVESTAV-Unidad Irapuato, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Km 9.6 del Libramiento Norte Carretera Irapuato-León, C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato, México; **José Humberto Valenzuela-Soto***, CONACYT-Centro de Investigación en Química Aplicada, Departamento de Biociencias y Agrotecnología, Boulevard Enrique Reyna Hermosillo 140, C.P. 25294, Saltillo, Coahuila, México. *Autor para correspondencia: humberto.valenzuela@ciqa.edu.mx

Recibido: 25 de Abril, 2021.

Aceptado: 10 de Junio, 2021.

Maldonado-Bonilla LD, Hernández-Guzmán G, Martínez-Gallardo NA, Hernández-Flores JL, Délano-Frier JP and Valenzuela-Soto JH. 2021. Strain of *Pseudomonas syringae* causes bacterial leaf spot in marigold plants (*Tagetes erecta*) in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 39(3).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-5>

Primera publicación DOI: 06 de Julio, 2021.

First DOI publication: July 06, 2021.

Resumen. El cempasúchil (*Tagetes erecta*) es una planta asterácea comúnmente utilizada como flor ornamental y ceremonial durante la temporada de otoño en México. Las plantas de cempasúchil cultivadas en el campo presentaron síntomas de la enfermedad de la mancha foliar bacteriana. Se aisló una cepa bacteriana que potencialmente causa la

Abstract. Marigold (*Tagetes erecta*) is an Asteraceae plant commonly used as an ornamental and ceremonial flower during the fall season in Mexico. Marigold plants cultivated in the field presented bacterial leaf spot disease symptoms. A bacterial strain that potentially causes spot disease was isolated. The main goal of this research was to classify this bacterium and assess its pathogenicity towards marigold and other plant species. The biochemical profiling identified this strain as *Pseudomonas syringae* LF2012. The phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene revealed a close relation with *Pseudomonas* genomospecies. The I-CeuI macro-restriction profile of the chromosomal confirmed its high degree of similarity with distinct *P. syringae* pathovars. *P. syringae* LF2012 causes spot disease when inoculated by spray in marigold leaves. Infection assays towards plants

enfermedad de las manchas. El objetivo principal de esta investigación fue clasificar esta bacteria y evaluar su patogenicidad en cempasúchil y otras especies vegetales. El perfil bioquímico identificó esta cepa como *Pseudomonas syringae* LF2012. El análisis filogenético del gen ARNr 16S reveló una estrecha relación con genomoespecies de *Pseudomonas*. El perfil de macrorestricción I-CeuI del cromosoma confirmó su alto grado de similitud con distintos patovares de *P. syringae*. *P. syringae* LF2012 causa la enfermedad de las manchas cuando se inocula por aspersión en hojas de cempasúchil. Los ensayos de infección de plantas de otras familias (Asteraceae, Brassicaceae, Amaranthaceae, Poaceae y Solanaceae) sugirieron que la enfermedad podría limitarse al cempasúchil. Además, esta cepa provoca respuestas de tipo hipersensible en hojas de *Nicotiana tabacum*.

Palabras clave: bacteria, fitopatógeno, virulencia, respuesta hipersensible, 16S ARNr.

El cempasúchil (*Tagetes erecta*) es una planta anual de la familia de las Asteraceae, originaria de México. Las flores son fuente de pigmentos amarillo-naranjas de carotenoides; especialmente de xantófilas, tales como la luteína (Deineka *et al.*, 2007). Además de pigmentos, el cempasúchil también produce metabolitos con actividad antioxidante, hepatoprotectiva y nematocida (Gopi *et al.*, 2012) y peculiarmente se usa como adorno en los rituales del Día de los muertos en México (Brandes, 1998).

Debido a la importancia del cempasúchil como fuente de metabolitos secundarios y componente del patrimonio cultural mexicano, se requiere información sobre los patógenos microbiales para definir estrategias de protección a los cultivos y prevenir pérdidas económicas, sobre todo para

from other families (Asteraceae, Brassicaceae, Amaranthaceae, Poaceae y Solanaceae) suggested that disease might be limited to marigold plants. Furthermore, this strain causes hypersensitive-like responses in *Nicotiana tabacum* leaves.

Key words: bacteria, phytopathogen, virulence, hypersensitive response, 16S rRNA.

The marigold (*Tagetes erecta*) is an annual plant from the Asteraceae family, native to Mexico. The flowers are a source of carotenoid yellow-orange pigments, mostly xanthophylls such as the lutein (Deineka *et al.*, 2007). Besides pigments, marigold also produces metabolites with antioxidant, hepatoprotective, and nematocidal activity (Gopi *et al.*, 2012), and, peculiarly, it is used as ornament in the rituals of the Day of the Death in Mexico (Brandes, 1998).

Due to the importance of marigold as a source of secondary metabolites and as component of the Mexican cultural heritage, information about microbial pathogens is required to set strategies of crop protection and prevent economical losses, especially in small-scale producers. Marigold seedlings cultivated in the field are susceptible to damping-off caused by the fungal pathogen *Ceratobasidium* sp. (Saroj *et al.*, 2013). Unlike damping-off, diseases caused by bacteria might not prevent flower production if emerge in the late stages of plant development, and the commercialization of diseased plants contributes to the dispersal of disease. Bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* and bacterial leaf spot produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* are among the most damaging bacterial diseases in marigold (Horst, 2013). *P. syringae* pv. *tagetis* was first reported as *Pseudomonas tagetis* (Hellmers, 1955), and causes apical chlorosis in

productores de pequeña escala. Las plántulas de cempasúchil cultivadas en el campo son susceptibles a Damping-off causado por el patógeno fúngico *Ceratobasidium* sp. (Saroj *et al.*, 2013). A diferencia del Damping-off, las enfermedades causadas por bacterias podrían no impedir la producción de flores si emergen en las etapas tardías del desarrollo de la planta, y la comercialización de plantas enfermas contribuye a la propagación de la enfermedad. La marchitez bacterial causada por *Pseudomonas solanacearum*, así como las manchas foliares causadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* están entre las enfermedades bacteriales más dañinas para el cempasúchil (Horst, 2013). *P. syringae* pv. *tagetis* fue reportada por primera vez como *Pseudomonas tagetis* (Hellmers, 1955) y causa clorosis apical en girasol (*Helianthus annuus*) y en la alcachofa de Jerusalén (*Ambrosia tuberosa*) (Gulya *et al.*, 1982; Shane y Baumer, 1984). Además de sus efectos perjudiciales, este patógeno tiene el potencial de ser usado como agente de biocontrol, ya que causa clorosis y necrosis al ser inoculado en hierbas tales como el cardo de Canadá (*Cirsium arvense*) (Gronwald *et al.*, 2002) y en la ambrosia arvense *Ambrosia grayi* (Sheikh *et al.*, 2001). La clorosis quizá sea producida por la tagetitoxina, un inhibidor de la polimerasa de ARN plastidial (Mathews y Durbin, 1990).

Una nueva cepa bacterial que se asemeja a *Pseudomonas syringae* llamada LF2012 inicialmente fue aislada por el Dr. Leopoldo Fucikovsky+ (Colegio de Posgraduados) de plantas de cempasúchil enfermas. Se inocularon 1×10^8 CFU mL⁻¹ por aspersión en tres plantas para demostrar los postulados de Koch. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de luz (aproximadamente $300 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperatura (27 °C), fotoperiodos (16 h luz/8 h oscuridad) y humedad relativa (75%). Este experimento se repitió tres veces. En

sunflower (*Helianthus annuus*) and Jerusalem artichoke (*Ambrosia tuberosa*) (Gulya *et al.*, 1982; Shane and Baumer, 1984). Besides its detrimental effects, this pathogen has the potential to be used as a biocontrol agent as causes chlorosis and necrosis when inoculated in weeds such as the Canada thistle (*Cirsium arvense*) (Gronwald *et al.*, 2002) and wolyleaf bur ragweed (*Ambrosia grayi*) (Sheikh *et al.*, 2001). Chlorosis is likely produced by tagetitoxin, an inhibitor of the plastidial RNA polymerase (Mathews and Durbin, 1990).

A novel bacterial strain that resembles *Pseudomonas syringae* and named LF2012 was initially isolated from diseased marigold plants by Dr. Leopoldo Fucikovsky+ (Colegio de Posgraduados). Spray inoculation of 1×10^8 CFU mL⁻¹ into three plants was performed to prove the Koch's postulates. After inoculation, the plants were maintained in a growth chamber under controlled conditions for light (approximately $300 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperature (27 °C), photoperiod (16 h light/8 h dark), and relative humidity (75 %). This experiment was repeated three times. In this set of experiments, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 was used as reference of causal agent of disease in Arabidopsis and tomato, and *P. syringae* pv. *syringae* 61 was included as non-host strain as it causes no disease in the plant species tested.

Chlorosis, accompanied by a necrotic halo, became visible five days after inoculation in the three plants tested in every experiment (Figure 1). Bacteria were re-isolated from the diseased plant, which confirms this strain is pathogenic towards marigold. Host range assays were performed in plants belonging to five different families, including Asteraceae, Amaranthaceae, Brassicaceae, Poaceae, and Solanaceae (Valenzuela-Soto *et al.*, 2015). Other phytopathogenic strains were included as controls. The results are summarized in Table 1. LF2012 only caused symptoms in marigold plants

este conjunto de experimentos se usó *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 como referencia del agente causal de enfermedades en *Arabidopsis* y tomate, y se incluyó a *P. syringae* pv. *syringae* 61 como una cepa sin huésped, ya que no causa enfermedad en la especie vegetal estudiada.

La clorosis, acompañada de un halo necrótico, se volvió visible cinco días después de su inoculación en las tres plantas examinadas en cada experimento (Figura 1). Las bacterias fueron re-aisladas de la planta enferma, lo que confirma que esta cepa es patogénica hacia el cempasúchil. Se realizaron ensayos de rango de huéspedes en plantas pertenecientes a cinco familias diferentes, incluyendo Asteraceae, Amaranthaceae, Brassicaceae, Poaceae y Solanaceae (Valenzuela-Soto *et al.*, 2015). Otras cepas fitopatogénicas fueron incluidas como testigos. Los resultados se encuentran resumidos en el Cuadro 1. LF2012 solo causó síntomas en plantas de cempasúchil, pero no así en otras plantas,

but did not in other plants, including sunflower (*H. annuus*) “small flower” that also belongs to Asteraceae, and it has been reported as a host of *P. syringae* pv. *tagetis* (Rhodehamel and Durbin, 1985). We tested three different cultivars of sunflower, in any case LF2012 caused disease in sunflower, hence, we ruled out the possibility to name the strain as *P. syringae* pv. *tagetis*.

These results suggest that LH2012 is an adapted pathogen causing disease in marigold, but it is non-adapted to access into the other plant species. Non-adapted pathogens do not cause a reaction when inoculated by spray because they do not access into the plant. But if the pathogen is forced to invade mesophyll, it will be perceived by the plant as hazardous agent, and a strong defense response will be induced. Detection of pathogen-derived molecules triggers the non-host resistance, often characterized by hypersensitive response or cell death at the site of infiltration that restricts



Figura 1. Síntomas de la enfermedad de manchas foliares en cempasúchil (*Tagetes erecta*) causada por *P. syringae* LF2012 (LF2012) cinco días después de inocular con aspersor. Las plantas con tratamientos simulados fueron rociadas con un amortiguador de fosfato (simulacro). Las plantas se mantuvieron bajo un fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad), con luz de aproximadamente 300 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 28 °C y una humedad relativa de 75%.

Figure 1. Disease symptoms of leaf spot disease on marigold (*Tagetes erecta*) caused by *P. syringae* LF2012 (LF2012) five days after spray inoculation. Mock treated plants were sprayed with phosphate buffer (Mock). Plants were kept under a photoperiod (16 h light/8 h dark), light of approximately 300 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 28 °C, and relative humidity of 75%.

Cuadro 1. Determinación del rango de huésped de *Pseudomonas syringae* LF2012. Los ensayos se realizaron al rociar una inoculación de suspensión bacteriana (1×10^8 CFU mL⁻¹) y se roció un amortiguador de fosfato como simulacro. *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 se usó como cepa virulenta de *A. thaliana* y *S. lycopersicum*. *P. syringae* pv. *syringae* 61 se usó como testigo sin huésped.

Table 1. Determination of host range of *Pseudomonas syringae* LF2012. Assays were performed by spray inoculation of bacterial suspensions (1×10^8 CFU mL⁻¹), and phosphate buffer was sprayed as mock control. *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 was used as virulent strain of *A. thaliana* and *S. lycopersicum*. *P. syringae* pv. *syringae* 61 was used as non-host control.

	Experimental host	LF2012	<i>P. s.</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	<i>P. s.</i> pv. <i>syringae</i> 61	Mock
Asteraceae	<i>Tagetes erecta</i>	+	-	-	-
	<i>Helianthus annuus</i> “small flower”	-	-	-	-
Brassicaceae	<i>Brassica oleracea</i> cv. Grandeur	-	-	-	-
	<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	-	+	-	-
Amaranthaceae	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	-	-	-	-
	<i>Amaranthus hybridus</i>	-	-	-	-
Poaceae	<i>Zea mays</i> cv A188	-	-	-	-
	<i>Sorghum bicolor</i>	-	-	-	-
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Río Fuego	-	+	-	-
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi	-	+	-	-

incluyendo girasol (*H. annuus*) “flor pequeña” que también pertenece a Asteraceae, y ha sido reportada como huésped de *P. syringae* pv. *tagetis* (Rhodhamel y Durbin, 1985). Se realizaron ensayos con tres cultivares diferentes de girasol y en cualquier caso LF2012 no causó enfermedades en girasol, por lo que descartamos la posibilidad de nombrar la cepa como *P. syringae* pv. *tagetis*.

Estos resultados sugieren que LH2012 es un patógeno adaptado causante de enfermedades en cempasúchil, pero es no adaptado para el acceso a las demás especies vegetales. Los patógenos no adaptados no causan una reacción cuando son inoculados con aspersión porque no acceden hacia adentro de la planta. Sin embargo, si el patógeno es forzado a invadir la mesófila, será percibido por la planta como un agente de riesgo y se inducirá una fuerte respuesta de defensa. La detección de moléculas derivadas de patógenos dispara la resistencia

the pathogen’s propagation (Lee *et al.*, 2017). To confirm that LH2012 has features of non-adapted pathogen towards other species, we performed infiltrations of 1×10^8 CFU mL⁻¹ of LH2012 into tobacco leaves. LF2012 triggers hypersensitivity reaction (HR) like spots (Figure 2). As expected to this reaction, it was limited to the infiltration site no matter how long the plants were incubated. This result suggests that when LH2012 is recognized as pathogen in a non-host plant when is directly inoculated in mesophyll.

The metabolic profile was performed by the BIOLOG test as a first approach to identify the species of LF2012. LF2012 was inoculated in the Biolog universal growth medium and incubated at 28 °C. The data were acquired and analyzed with the MicroLog version 4.2 data software. The profile as related to *P. syringae* pathovars. Furthermore, the utilization of *myo*-inositol, D-sorbitol, D-mannose,

del no-huésped, que suele caracterizarse por una respuesta hipersensible o la muerte celular en el sitio de infiltración que restringe la propagación del patógeno (Lee *et al.*, 2017). Para confirmar que LH2012 tiene características de patógeno no adaptado hacia otras especies, se realizaron infiltraciones de 1×10^8 CFU mL⁻¹ de LH2012 en hojas de tabaco. LF2012 causó puntos semejantes a una reacción de hipersensibilidad (RH) (Figura 2). Como se esperaba para esta reacción, se limitó al sitio de infiltración, sin importar el tiempo de incubación de las plantas. Este resultado sugiere que se reconoce a LH2012 como un patógeno en una planta no huésped cuando se inocula directamente en la mesófila.

El perfil metabólico se llevó a cabo con la prueba BIOLOG como una primera aproximación para identificar a las especies de LF2012. LF2012 se inoculó en el medio de crecimiento universal Biolog y se incubó a 28 °C. Los datos fueron obtenidos y analizados con el software de datos MicroLog versión 4.2. El perfil se relaciona con patovares de *P. syringae*. Asimismo, el uso de *myo*-inositol, D-sorbitol, D-manosa, D-fructosa, α -D-glucosa, sacarosa, L-fucose y maltosa como fuentes de carbono fueron similares a las fuentes reportadas para *P. syringae* pv. *tagetis* (Rhodehamel y Durbin, 1985). La identificación como *P. syringae* pv. *tagetis* no fue posible, ya que el perfil metabólico de este patovar no está incluido en la base de datos disponible.

La secuencia del gen ARNr 16S es ampliamente usado como un gen codificado y es usado en la construcción de relaciones filogenéticas dentro de las procariotas. Específicamente, en *Pseudomonas* ha sido útil para redistribuir algunas especies de *Pseudomonas* en otros géneros (Mulet *et al.*, 2010). El género de *Pseudomonas* se divide en dos linajes: *aeruginosa* y *fluorescens*. *Pseudomonas syringae* se clasifica en el linaje de *fluorescens* y siete genomoespecies (Gs) dentro de *P. syringae* son

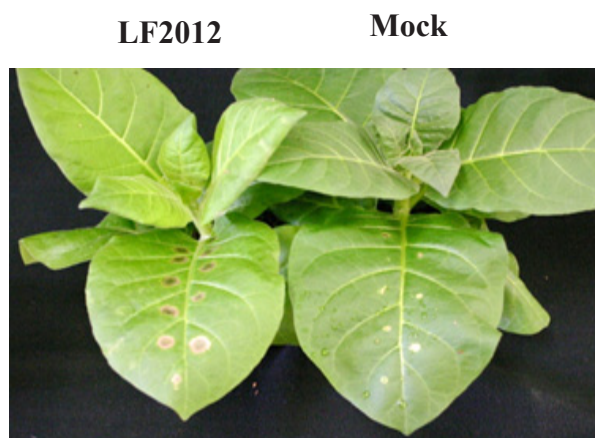


Figura 2. *P. syringae* LF2012 causa una respuesta similar al RH en hojas infiltradas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (LF2012). Las plantas testigo fueron infiltradas con amortiguador de fosfato (simulación). Las plantas en macetas se matuvieron bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Las fotografías de las plantas fueron tomadas 5 días después de infiltrarse.

Figure 2. *P. syringae* LF2012 causes an HR-like response in infiltrated tobacco leaves (*Nicotiana tabacum*) (LF2012). Control plants were infiltrated with phosphate buffer (Mock). Potted plants were kept under controlled conditions of light, temperature, and humidity. Plants were photographed 5 days after infiltration.

D-fructose, α -D-glucose, sucrose, L-fucose, and maltose as carbon sources were similar to the sources reported to *P. syringae* pv. *tagetis* (Rhodehamel and Durbin, 1985). Identification as *P. syringae* pv. *tagetis* was not possible as the metabolic profile of this pathovar is not included in the available database.

The sequence of the 16S rRNA gene is widely used as a barcode gene, and it is used to the construction of phylogenetic relationships within prokaryotes. Specifically, in *Pseudomonas* has been useful to redistribute some *Pseudomonas* species into other genera (Mulet *et al.*, 2010). The *Pseudomonas* genus is divided into two lineages: *aeruginosa* and *fluorescens*. *Pseudomonas*

discernibles por análisis filogenético (Marcelletti y Scortichini, 2014).

El gen ARNr 16S de LF2012 se amplificó y clonó con los siguientes procedimientos experimentales reportados anteriormente por nuestro grupo de trabajo (Valenzuela-Soto *et al.*, 2015). El plásmido purificado fue sujeto a una secuenciación capilar en un Analizador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) usando el promotor T7 y los oligonucleótidos en reversa M13 que coinciden con las secuencias flanqueantes de pCR-XL-TOPO (Invitrogen). La secuencia fue depositada en el GenBank bajo el número de Acceso KP796138.1. La secuencia de ARNr 16S de LF2012 y las secuencias correspondientes de las cepas representativas de ambos linajes de *Pseudomonas* fueron alineadas con el algoritmo ClustalW. Una vez alineados, se creó un árbol filogenético con el método de unión de vecinos. Ambos procedimientos bioinformáticos fueron llevados a cabo en MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). El árbol filogenético muestra que la secuencia de ARNr 16S de LF2012 está agrupada en el linaje de *fluorescens* y tiene una estrecha relación con las genomoespecies Gs3, Gs6, Gs8, Gs9 (Figura 3). Las secuencias del linaje de *aeruginosa* están claramente separadas de *fluorescens*. Las genomoespecies con relación estrecha con LF2012 pertenecen al grupo *P. syringae* (Mulet *et al.*, 2010). La secuencia de referencia de *P. syringae* pv. *tagetis* usada en el presente análisis (AB001449.1) está agrupada con otras cepas fitopatogénicas, pero *P. syringae* LF2012 está excluido de este subárbol. El árbol también muestra que LF2012 tiene menos relación con otros linajes de especies *fluorescens* tales como *P. putida* y *P. savastanoi*. Por lo tanto, clasificamos a esta cepa como *Pseudomonas syringae* LF2012. Se requiere analizar otros marcadores para determinar la relación con *P. syringae* pv. *tagetis* o secuencias de cepas de referencias para las genomoespecies 7, tales como *P. syringae* pv. *helianthi*, que hasta ahora es insuficiente.

syringae is classified into the *fluorescens* lineage, and seven genomospecies (Gs) within *P. syringae* are distinguishable by phylogenetic analysis (Marcelletti and Scortichini, 2014).

The 16S rRNA gene of LF2012 was amplified and cloned by the following experimental procedures reported before by our workgroup (Valenzuela-Soto *et al.*, 2015). The purified plasmid was subject to capillary sequencing in an ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) using the T7 promoter and M13 Reverse oligonucleotides that match flanking sequences of pCR-XL-TOPO (Invitrogen). The sequence was deposited in the GeneBank under the Accession Number KP796138.1. The 16S rRNA sequence of LF2012 and the corresponding sequences from representative strains of the two *Pseudomonas* lineages were aligned by the ClustalW algorithm. After alignment, a phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method. Both bioinformatics procedures were conducted in MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). The phylogenetic tree shows that the 16S rRNA sequence of LF2012 is clustered into the *fluorescens* lineage, and it is closely related to genomospecies Gs3, Gs6, Gs8, Gs9 (Figure 3). The sequences from the *aeruginosa* lineage are clearly separated from *fluorescens*. The genomospecies closely related to LF2012 belong to the *P. syringae* group (Mulet *et al.*, 2010). The reference sequence of *P. syringae* pv. *tagetis* used in our analysis (AB001449.1) is clustered with other phytopathogen strains, but *P. syringae* LF2012 is excluded from this subtree. The tree also shows that LF2012 is less related to other species *fluorescens* lineage such a *P. putida* and *P. savastanoi*. Therefore, we classified this strain as *Pseudomonas syringae* LF2012. Analysis of other markers is necessary to determine the relationship with *P. syringae* pv. *tagetis* or sequences of reference strains for the genomospecies 7, such as *P. syringae* pv. *helianthi*, which so far is lacking.

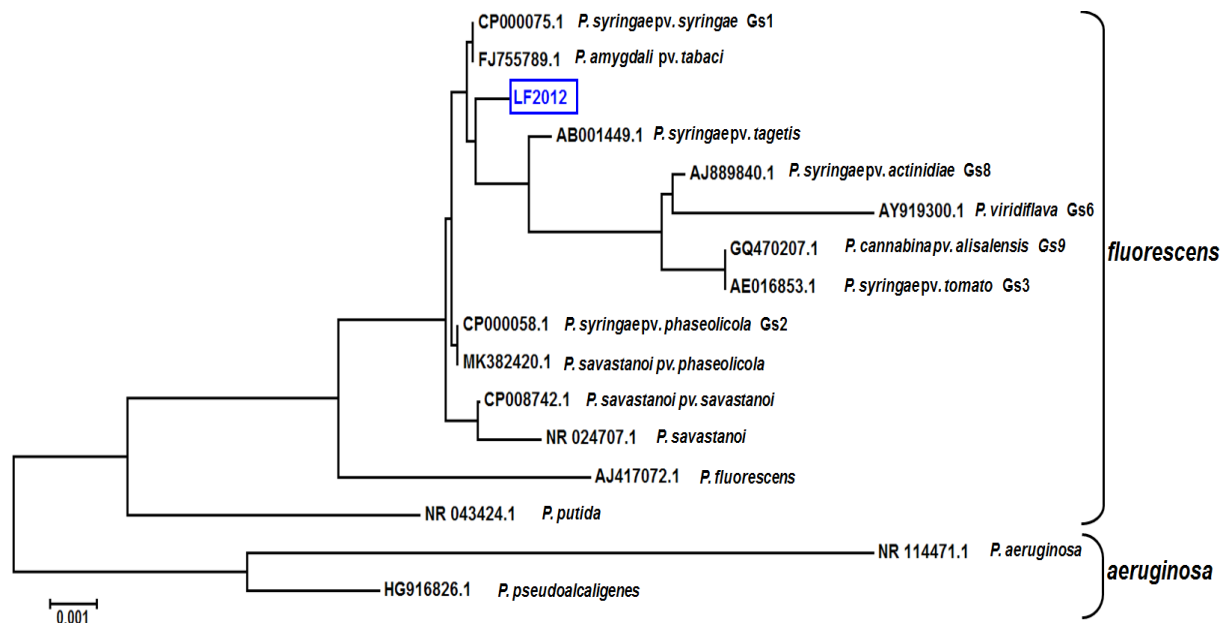


Figura 3. Árbol filogenético que muestra la relación del *Pseudomonas syringae* LF2012 aislado de plantas de cempasúchil con un subconjunto de cepas y especies de relación cercana. El número de acceso de cada secuencia usada está indicado en la rama antes del nombre.

Figure 3. Phylogenetic tree showing the relationship of the *Pseudomonas syringae* LF2012 isolated from marigold plants within a subset of closely related strains and species. The accession number of every sequence used is indicated in the branch before the name.

Se llevó a cabo un perfil de macrorestricción al digerir el ADN genómico de LF2012 y nuestras cepas testigo con I-CeuI. Los productos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés) (Figura 4). El patrón de restricción de LF2012 (línea A, Figura 4) fue como el perfil de *P. syringae* pv. *syringae* 61 del Gs1 (línea B, Figura 4), pero no se detectaron fragmentos comunes entre LF2012 y *P. syringae* pv. *glycinea* (línea C, Figura 4), miembro del grupo *amygdali* dentro del linaje de *fluorescens* (Gomila *et al.*, 2017). Las diferencias y semejanzas en estos patrones de restricción respaldan la clasificación de la cepa como *P. syringae* LF2012.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio para el perfil bioquímico y el análisis molecular permitieron identificar a esta bacteria como *Pseudomonas syringae* LF2012, un

A macro-restriction profile was performed by digesting the genomic DNA of LF2012 and our control strains with I-CeuI. Restriction products were separated by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) (Figure 4). The restriction pattern of LF2012 (line A, Figure 4) was like the profile of *P. syringae* pv. *syringae* 61 from the Gs1 (line B, Figure 4), but no common fragments were detected between LF2012 and *P. syringae* pv. *glycinea* (line C, Figure 4) a member of the *amygdali* group within the *fluorescens* lineage (Gomila *et al.*, 2017). Differences and similarities in these restriction patterns supports the classification of the strain as *P. syringae* LF2012.

In conclusion, results obtained here from biochemical profile and molecular analysis permitted identifying this bacterium as *Pseudomonas syringae* LF2012, a pathogen that

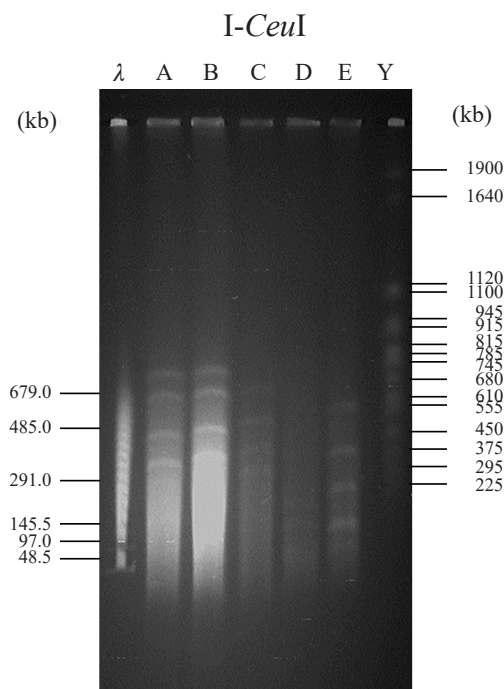


Figura 4. Perfiles de macrorestricción de Electroforesis en gel de campo Pulsado (PFGE) producidos por *P. syringae* LF2012 y otras bacterias fitopatógenas. El ADN cromosómico DNA fue digerido con la endonucleasa de corte raro I-CeuI y luego separado con PFGE. (λ) Marcador de tamaño de escalera Lambda. Patrones de PFGE de: (A) *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* LF2012; (B) *P. syringae* pv. *syringae* 61; (C) *P. syringae* pv. *glycinea* PG4180; (D) *P. syringae* pv. *tomato* DC3000; (E) *Pectobacterium cacticidum* FHLGJ22 y (Y) cromosoma de *Saccharomyces cerevisiae* YPH80; (kb) tamaños en kilo pares de base.

Figure 4. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) macrorestriction profiles produced by *P. syringae* LF2012 and other phytopathogenic bacteria. Chromosomal DNA was digested with the rare-cutting endonuclease I-CeuI and subsequently separated by PFGE. (λ) Lambda ladder size marker. PFGE patterns of: (A) *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* LF2012; (B) *P. syringae* pv. *syringae* 61; (C) *P. syringae* pv. *glycinea* PG4180; (D) *P. syringae* pv. *tomato* DC3000; (E) *Pectobacterium cacticidum* FHLGJ22, and (Y) *Saccharomyces cerevisiae* YPH80 chromosome; (kb) sizes in kilo base-pairs.

patógeno que causa síntomas de la enfermedad de manchas foliares en el cempasúchil. Es avirulenta en otra planta Asteraceae y plantas de otras familias, y dispara reacciones semejantes a HR en hojas de tabaco infiltradas. La secuenciación de genoma completo de esta nueva cepa permitirá determinar la clasificación precisa que ayuda en métodos moleculares de patógenos de cempasúchil y en la identificación de factores de virulencia que ilustran la base molecular de la enfermedad. Debido a la relación con *P. syringae* pv. *tagetis*, su potencial como biocontrol de malezas puede ser explorado.

causes leaf spot disease symptoms in marigold. It is avirulent in another Asteraceae plant and plants from other families and triggers HR-like reaction in infiltrated tobacco leaves. The whole-genome sequencing of this novel strain will help determine the accurate classification that helps in molecular methods of marigold pathogens and the identification of virulence factors that illustrate the molecular basis of the disease. Due to the relation to *P. syringae* pv. *tagetis* its potential as biocontrol of weeds might be explored.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Leopoldo Fucikovsky+ (Colegio de Posgraduados) por la donación de la cepa *P. syringae* LF2012. LDMB y JHVS obtuvieron el apoyo del Programa de Investigación “Cátedras CONACYT”, Becas No. 538 y No. 1333, respectivamente.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Leopoldo Fucikovsky+ (Colegio de Posgraduados) for the donation of the *P. syringae* LF2012 strain. LDMB and JHVS are supported by the “Cátedras CONACYT” Research Program, Grants No. 538, and No. 1333, respectively.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## LITERATURA CITADA

- Brandes S. 1998. The Day of the Dead, Halloween, and the quest for mexican national identity. *The Journal of American Folklore* 111: 359. <https://doi.org/10.2307/541045>.
- Deineka VI, Sorokopudov LA, Deineka LA and Tretyakov MY. 2007. Flowers of marigold (*Tagetes*) species as a source of xanthophylls. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 41:540. <https://doi.org/10.1007/s11094-008-0007-z>.
- Gomila M, Busquets A, Mulet M, García-Valdés E and Lalucat J. 2017. Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Frontiers in Microbiology* 8: 2422. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02422>.
- Gopi G, Elumalai A and Jayasri P. 2012. A concise review on *Tagetes erecta*. *International Journal of Phytopharmacy Research* 3: 16–19.
- Gronwald JW, Plaisance KL, Ide DA and Wyse DL. 2002. Assessment of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* as a biocontrol agent for Canada thistle. *Weed Science* 50(3): 397–404. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0397:aopspt\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0397:aopspt]2.0.co;2).
- Gulya TJ, Urs R and Banttari EE. 1982. Apical chlorosis of sunflower caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*. *Plant Disease* 66: 598–600. <https://doi.org/10.1094/PD-66-598>.
- Hellmers E. 1955. Bacterial leaf spot of african marigold (*Tagetes erecta*) caused by *Pseudomonas tagetis* sp. n. *Acta Agriculturae Scandinavica* 5(1): 185–200. <https://doi.org/10.1080/00015125509441439>.
- Horst RK. 2013. *Field Manual of Diseases on Garden and Greenhouse Flowers*. Springer. Dordrecht. 157p
- Lee HA, Lee HY, Seo E, Lee J, Kim SB, Oh S, Choi E, Choi E, Lee SE and Choi D. 2017. Current understandings of plant nonhost resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30(1): 5–15. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-16-0213-CR>.
- Li Y, Shen J, Pan BH, Guo MX, Wang QX, Ouyang CB, Yan DD and Cao AC. 2014. First report of leaf spot caused by *Alternaria alternata* on marigold (*Tagetes erecta*) in Beijing, China. *Plant Disease* 98(8): 1153. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-1005-PDN>.
- Marcelletti S and Scortichini M. 2014. Definition of plant-pathogenic *Pseudomonas* genomospecies of the *Pseudomonas syringae* complex through multiple comparative approaches. *Phytopathology* 104(2): 1274–1282. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-13-0344-R>.
- Mathews DE and Durbin RD. 1990. Tagetitoxin inhibits RNA synthesis directed by RNA polymerases from chloroplasts and *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 265(1): 493–498. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)40258-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)40258-5).
- Mulet M, Lalucat J and García-Valdés E. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 12(6): 1513–1530. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x>.
- Rhodehamel NH and Durbin RD. 1985. Host range of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*. *Plant Disease* 69(7): 589–591. <https://doi.org/10.1094/PD-69-589>.
- Saroj A, Kumar A, Saeed ST, Samad A and Alam M. 2013. First Report of *Tagetes erecta* damping off caused by *Ceratobasidium* sp. from India. *Plant Disease* 97(9): 1251–1251. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-13-0145-PDN>.
- Shane WW and Baumer JS. 1984. Apical chlorosis and leaf spot of Jerusalem artichoke incited by *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*. *Plant Disease* 68: 257–260. [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n03\\_257.PDF](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n03_257.PDF)
- Sheikh T, Wheeler TA, Dotray PA and Zak JC. 2001. Biological control of woollyleaf bursage (*Ambrosia grayi*) with *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*. *Weed Technology* 15(2): 375–381. [https://doi.org/10.1614/0890-037x\(2001\)015\[0375:bcowba\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1614/0890-037x(2001)015[0375:bcowba]2.0.co;2).
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Valenzuela-Soto H, Maldonado-Bonilla LD, Hernández-Guzmán, G, Rincón-Enríquez G, Martínez-Gallardo NA, Ramírez-Chávez E, Hernández IC, Hernández-Flores JL and Délano-Frier JP. 2015. Infection by a coronatine-producing strain of *Pectobacterium cacticidum* isolated from sunflower plants in Mexico is characterized by soft rot and chlorosis. *Journal of General Plant Pathology* 81: 368–381. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0606-y>.