



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
15th Year, Vol. 15, No. 57, 2026 pp. 1-16
Received: 20/04/2025 Accepted: 07/10/2025

(Research Paper)

Identification of *Pseudomonas* Causing Leaf Spot and Bacterial Blight in Ornamental Plant Species of the Araceae Family in Iran

Parisa Emami

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
p.emamy@agr.basu.ac.ir

Gholam Khodakaramian 

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
khodakaramian@basu.ac.ir

Abstract

The cultivation of flowers and ornamental plants in greenhouses plays a significant role in the country's economy through income generation and exportation. Bacterial pathogens, particularly leaf spot-causing species, can lead to severe damage, resulting in complete yield loss. Plants of the Araceae family are highly susceptible to these pathogens, yet research on this issue remains limited. Sampling was carried out on Araceae plants exhibiting leaf spot symptoms in various commercial greenhouses. Infected samples were cultured on nutrient agar medium, and 20 bacterial strains were isolated, purified, and preserved for pathogenicity and identification assays. Pathogenicity tests were performed on susceptible hosts, such as *Epipremnum aureum* (Pothos), *Aglaonema treubii*, and *Syngonium podophyllum*, which confirmed the virulence of selected strains. For identification, phenotypic characterizations such as fluorescent pigment production on King's B medium, LOPAT tests (Levan production, Oxidase activity, Potato soft rot, Arginine dihydrolase activity, and Tobacco hypersensitivity), carbon and energy utilization patterns, and sequencing of the 16S rRNA gene and housekeeping genes *rpoD* and *recA* were examined. Phenotypic and molecular data showed that the tested strains belonged to *Pseudomonas aeruginosa*. Based on the available literature, this is the first report of *P. aeruginosa* pathogenicity on plants from the Araceae family in Iran.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Araceae, Ornamental plants, Bacterial leaf spot, Pathogenicity, Molecular identification, Phylogeny, MLSA, Iran.

¹ Corresponding Author
3060-7647/ © 2026 The Authors

Introduction

The Araceae family, encompassing more than 3,700 species in 144 genera, constitutes one of the most important plant families in terms of ecology and economy. In addition to their ecological roles, many members of this family serve as valuable ornamental plants cultivated for aesthetic and commercial purposes. Species such as *Spathiphyllum wallisii*, *Monstera deliciosa*, *Zamioculcas zamiifolia*, *Aglaonema treubii*, *Epipremnum aureum*, *Philodendron* sp., and *Syngonium podophyllum* are among the most popular houseplants worldwide. In Iran, ornamental plant production has expanded significantly, with approximately 7,800 hectares under cultivation and an annual yield exceeding 4 billion cut flowers and 120 million potted plants. This expansion has positioned Iran among the leading producers of ornamental plants in Asia.

However, bacterial diseases constitute a major constraint on the sustainable production of these plants. Among them, species of the genus *Pseudomonas* are particularly destructive. These bacteria, comprising more than 140 recognized species, are capable of causing a wide range of plant diseases such as leaf spot, blight, and soft rot. Previous studies have reported *Pseudomonas cichorii*, *P. marginalis*, and *P. aeruginosa* as causative agents of foliar blight and leaf spot diseases in various ornamental Araceae species. The symptoms typically manifest as necrotic lesions surrounded by chlorotic haloes, which reduce photosynthetic efficiency and, under conducive conditions, lead to extensive tissue necrosis and plant death. Despite their significance, the distribution, pathogenicity, and molecular characterization of *Pseudomonas* spp. infecting ornamental Araceae in Iran remain poorly understood. The present study therefore aimed to isolate, identify, and characterize the causal agents of bacterial leaf spot and blight from symptomatic Araceae species and to confirm their pathogenicity using both phenotypic and molecular approaches.

Materials and Methods

Symptomatic leaves exhibiting bacterial leaf spot or blight were collected between 2019 and 2021 from various commercial greenhouses in Hamedan, Markazi, Khuzestan, Tehran, Golestan, Semnan, and Yazd provinces. Twenty infected samples from different ornamental species were collected and documented with relevant data, including host species, location, and date of collection. Samples were surface sterilized in 1% sodium hypochlorite for 30 seconds, rinsed with sterile distilled water, and sections from the lesion margins were macerated in sterile water for 20 minutes. Suspensions were plated on nutrient agar (NA) and incubated at 28 °C for 48 hours. Colonies exhibiting fluorescent pigmentation under ultraviolet light on King's B agar were selected as putative *Pseudomonas* isolates.

Phenotypic characterization was carried out following standard bacteriological protocols, including the assessment of Gram reaction, oxidase and catalase activities, levan and arginine dihydrolase production, citrate utilization, and carbohydrate fermentation (sorbitol, mannitol, arabinose, and xylose). Growth in different sodium chloride concentrations (3% and 5%), gelatin hydrolysis, H₂S production, and starch degradation were also tested. The hypersensitive response (HR) assay was conducted on tobacco (*Nicotiana tabacum*) and geranium (*Pelargonium* sp.) leaves by injecting bacterial suspensions (10⁸ CFU/mL) into the mesophyll. Localized necrosis observed within 24–48 hours was interpreted as a positive HR reaction.

Pathogenicity tests were performed on healthy specimens of *Epipremnum aureum*, *Aglaonema treubii*, and *Syngonium podophyllum* grown under controlled conditions (25 ± 1 °C, 85% relative humidity, a 12-hour photoperiod). Leaves were infiltrated with bacterial suspensions at a concentration of 10⁸ CFU/mL using an insulin syringe, and sterile water served as a control. Plants were enclosed in polyethylene bags for 48 hours to maintain humidity, and symptom development was monitored for up to 20 days. Re-isolation from symptomatic tissue confirmed fulfillment of Koch's postulates.

Genomic DNA was extracted using the alkaline lysis method. The 16S rRNA, *recA*, and *rpoD* genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. Amplified products were visualized on 1% agarose gels stained with ethidium bromide, and those of expected size were sequenced. Sequences were analyzed using BLASTn and aligned with reference sequences using ClustalW. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA version 7 using the neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replications and the Kimura 2-parameter model.

Discussion of Results & Conclusions

A total of twenty fluorescent, Gram-negative isolates were obtained from diseased Araceae plants collected from different regions of Iran. All isolates produced smooth, mucoid colonies on nutrient agar and fluorescent pigment on King's B agar. They exhibited positive oxidase and catalase activities, levan and arginine dihydrolase production,

and utilized citrate as a sole carbon source. They did not produce H₂S, did not hydrolyze starch, but hydrolyzed gelatin and Tween 20/80. All isolates grew in media containing up to 5% NaCl, confirming moderate halotolerance.

Pathogenicity assays demonstrated typical bacterial leaf spot symptoms on *Epipremnum aureum*, *Aglaonema treubii*, and *Syngonium podophyllum*. Initial water-soaked lesions (1–2 mm) developed within 72 hours of inoculation, enlarging to 5–10 mm necrotic spots with yellow halos by the tenth day. Severe infections resulted in coalescing lesions and widespread necrosis after fifteen days. Control plants remained asymptomatic, confirming that symptom development was caused by the inoculated bacteria.

PCR amplification produced expected amplicons of approximately 1,500 bp for 16S rRNA and 600 bp for each of the *recA* and *rpoD* genes. Sequence analysis revealed 97–99% identity with *Pseudomonas aeruginosa* reference strains available in the NCBI database. Phylogenetic trees constructed for individual and concatenated gene sequences clustered the isolates (PE1, PE2, and PE3) within a robustly supported clade (bootstrap > 99%) of *P. aeruginosa*, confirming their taxonomic identity.

This study provides the first evidence that *Pseudomonas aeruginosa* is responsible for bacterial leaf spot and blight on ornamental Araceae species in Iran. The identification of *P. aeruginosa* expands its known host range and geographic distribution. The isolates' phenotypic profiles were consistent with those of reference *P. aeruginosa* strains, although minor variations in carbohydrate utilization suggest adaptive diversity within the species. Such variability may reflect environmental selection or host-specific interactions.

The application of multilocus sequence analysis (MLSA) based on 16S rRNA, *recA*, and *rpoD* genes proved essential for precise species identification. While 16S rRNA is highly conserved and useful for genus-level classification, it lacks the discriminatory power required to distinguish closely related *Pseudomonas* taxa. The inclusion of housekeeping genes such as *recA* and *rpoD*, which exhibit moderate evolutionary rates, enhances phylogenetic resolution and reduces the risk of misidentification. This approach aligns with recent taxonomic recommendations for accurate identification of fluorescent *Pseudomonads*.

P. aeruginosa exhibits notable ecological plasticity, functioning both as a plant pathogen and as an opportunistic biocontrol agent depending on environmental conditions. Certain strains produce metabolites such as phenazines, siderophores, and biosurfactants that suppress fungal pathogens, yet these same compounds can contribute to phytotoxicity under favorable conditions. Environmental stressors, including excessive nitrogen fertilization, high humidity, and frequent overhead irrigation, exacerbate disease development by weakening host defenses and altering hormonal balance. These findings highlight the complexity of host–pathogen–environment interactions and underscore the importance of environmental management in disease suppression.

Integrated disease management (IDM) strategies incorporating molecular diagnostics, sanitation, environmental control, and biological antagonists are crucial for preventing outbreaks. Advanced molecular tools such as MLSA and real-time PCR facilitate early detection and precise monitoring of pathogenic *Pseudomonas* populations. Furthermore, understanding the genomic diversity of *P. aeruginosa* populations through whole-genome sequencing will aid in identifying virulence determinants, elucidating evolutionary relationships, and developing resistant ornamental cultivars.

The present findings not only establish a new bacterial disease in Iran's ornamental industry but also emphasize the need for continued surveillance and molecular characterization of phytopathogenic bacteria. Given the economic value of ornamental Araceae in domestic and international markets, adopting rigorous phytosanitary standards and quarantine protocols is essential to mitigate potential economic losses.

شناسایی سودوموناس‌های عامل لکه‌برگی و بلایت باکتریایی برخی گونه‌های گیاهان زینتی خانواده آراسه

پریسا امامی

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

p.emamy@agr.basu.ac.ir

غلام خداکرمیان^{ID}

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

khodakaramian@basu.ac.ir

چکیده

پرورش گل‌ها و گیاهان زینتی در گلخانه نقش مهمی در درآمدزایی کشور و صادرات به کشورهای دیگر دارد. عوامل بیماری‌زای باکتریایی، به‌ویژه گونه‌های ایجادکننده لکه‌برگی، قادر به وارد آوردن خسارت شدید به گیاهان هستند و در موارد شدید حتی می‌توانند منجر به از بین رفتن کامل گیاهان شوند. گیاهان خانواده آراسه (Araceae) نیز از این قاعده مستثنی نیستند و تحقیقات کمی در این زمینه انجام شده است. در همین راستا نمونه‌برداری از گیاهان خانواده آراسه مبتلا به لکه‌برگی در گلخانه‌های تولید گل و گیاهان زینتی انجام شد. نمونه‌های آلوده روی محیط آگار غذایی کشت شدند و ۲۰ استرین باکتریایی جدا، تک کلون و برای آزمایش‌های بیماری‌زایی و شناسایی نگهداری شد. آزمون بیماری‌زایی روی میزبان‌های بیمارگر مانند گیاهان پتوس (*Epipremnum aureum*)، آگلونما (*Aglaonema treubii*) و سینگونیم (*Syngonium podophyllum*) انجام شد و نمونه‌های بیماری‌زا برای بررسی بیشتر انتخاب شدند. برای شناسایی، ویژگی‌های فنوتیپی مانند بروز رنگدانه فلورسنت روی محیط King's B، LOPAT، الگوی مصرف منابع کربن و انرژی، سکونس ژن کدکننده *16S rDNA* و ژن‌های خانه‌دار *rpoD* و *recA* بررسی شد. بررسی‌های فنوتیپی و مولکولی نشان داد استرین‌های آزمایش شده مربوط به گونه *Pseudomonas aeruginosa* هستند. براساس بررسی داده‌های منتشرشده، این اولین گزارش از بیماری‌زایی *P. aeruginosa* روی گیاهان خانواده آراسه در ایران است.

واژگان کلیدی: آراسه، لکه‌برگی، LOPAT، فیلوژنتیک، *Pseudomonas aeruginosa*

* نویسنده مسئول مکاتبات

امامی، پریسا، خداکرمیان، غلام. شناسایی سودوموناس‌های عامل لکه‌برگی و بلایت باکتریایی برخی گونه‌های گیاهان زینتی خانواده‌ی آراسه. زیست‌شناسی میکروبی، ۱۴۰۵؛

۱۵(۵۷): ۱-۱۶. doi: 10.22108/bjm.2025.144982.1630

3060-7647/ © 2026 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



مقدمه

خانواده آراسه^۱ با بیش از ۳۷۰۰ گونه و ۱۴۴ جنس، یکی از گروه‌های مهم گیاهی جهان محسوب می‌شود. این خانواده علاوه بر نقش اکولوژیکی در اکوسیستم‌های طبیعی، ارزش اقتصادی و زینتی بالایی دارد. بسیاری از گونه‌های این خانواده به‌عنوان گیاهان شاخص در فضای سبز و محیط‌های آپارتمانی نگهداری می‌شوند. از گونه‌های شناخته‌شده آن می‌توان به اسپاتی‌فیلوم (*Spathiphyllum wallisii*)، برگ انجیری (*Monstera deliciosa*)، زاموفیلوم (*Zamioculcas zamiifolia*)، آگلونما (*Aglaonema treubii*)، پتوس (*Epipremnum aureum*)، فیلودندرون (*Philodendron* sp.)، سینگونوم (*Syngonium podophyllum*) و آنتوریوم (*Anthurium scherzerianum*) اشاره کرد (۱-۳).

اهمیت اقتصادی خانواده آراسه در کشورهای تولیدکننده عمده گل و گیاهان زینتی، از جمله ایران، بیش از پیش آشکار شده است. براساس آمارنامه رسمی وزارت جهاد کشاورزی (۱۴۰۱)، سطح زیرکشت گل و گیاهان زینتی در کشور بالغ بر ۷۸۰۰ هکتار (ترکیبی از گلخانه و فضای باز) است (۴). آمارهای تولید نشان می‌دهند ظرفیت سالانه کشور بیش از ۴ میلیارد شاخه گل بریده و ۱۲۰ میلیون گلدان گل زینتی است که ایران را در جایگاه پنجم تولیدکنندگان آسیایی این محصولات قرار داده است. استان‌های تهران، مرکزی، مازندران و اصفهان به‌دلیل شرایط اقلیمی مساعد، قطب‌های اصلی تولید این محصولات به‌شمار می‌آیند. این جایگاه اقتصادی برجسته، ضرورت مدیریت مؤثر عوامل خسارت‌زا در گیاهان زینتی را بیش‌ازپیش نمایان می‌کند.

در میان عوامل بیماری‌زا، باکتری‌های جنس *Pseudomonas* به‌عنوان یکی از تهدیدهای اصلی شناخته می‌شوند. این جنس بیش از ۱۴۰ گونه شناسایی شده دارد که قادر به ایجاد بیماری‌هایی همچون لکه‌برگی، سوختگی و پوسیدگی در گیاهان مختلف هستند (۵). در خانواده آراسه،

گونه‌هایی نظیر *Pseudomonas cichorii*، *P. marginalis* و *P. aeruginosa* به‌عنوان عوامل ایجادکننده لکه‌برگی و بلایت در جنس‌های دیفن‌باخیا (*Dieffenbachia* sp.) و گل شیپوری (*Zantedeschia* sp.) گزارش شده‌اند (۶-۱۰). این بیماری‌ها معمولاً به‌صورت لکه‌های نکروتیک روی برگ‌ها ظاهر می‌شوند، فتوسنتز را کاهش می‌دهند و در صورت فراهم‌بودن شرایط، می‌توانند کل گیاه را از بین ببرند (۱۱).

با وجود شناسایی و گزارش برخی عوامل بیماری‌زا، اطلاعات مربوط به تنوع، پراکنش جغرافیایی و ویژگی‌های فنوتیپی و ژنتیکی گونه‌های بیماری‌زای *Pseudomonas* در گیاهان زینتی خانواده آراسه در ایران محدود است. این کمبود داده‌ها مانع توسعه روش‌های تشخیص سریع، اعمال تدابیر قرنطینه داخلی و بین‌المللی و اصلاح ارقام مقاوم می‌شود؛ بنابراین، شناسایی و بررسی دقیق این عوامل بیماری‌زا گامی ضروری در جهت حفاظت از صنعت گل و گیاهان زینتی کشور محسوب می‌شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

در بازه زمانی سال ۱۳۹۹-۱۴۰۰، نمونه‌های دارای علائم لکه-برگی و بلایت از گلخانه‌ها و مراکز پرورش و فروش گیاهان زینتی از استان‌های همدان (ملایر، همدان)، مرکزی (محلات)، خوزستان (دزفول، اهواز)، تهران (پاکدشت)، گلستان (گرگان)، سمنان (شاهرود) و یزد (بهباد) جمع‌آوری شدند. گیاهان بررسی‌شده شامل گونه‌های اسپاتی‌فیلوم (*Spathiphyllum wallisii*)، باباآدم (*Alocasia sanderiana*)، آنتوریوم (*Anthurium scherzerianum*)، پتوس (*Epipremnum aureum*)، آگلونما (*Aglaonema treubii*)، برگ انجیری (*Monstera deliciosa*)، سینگونوم (*Syngonium podophyllum*)، دیفن‌باخیا (*Dieffenbachia amoena*)، فیلودندرون (*Philodendron* sp.) و زاموفیلیا

سوسپانسیون باکتریایی با غلظت 10^8 CFU/mL از کشت ۲۴ ساعته در محیط NA، تهیه و به فضای بین سلولی برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته با سرنگ انسولین تزریق شد. ظهور نکروز موضعی در محل تزریق پس از ۲۴-۴۸ ساعت به‌عنوان پاسخ مثبت در نظر گرفته شد.

آزمون بیماری‌زایی

برای ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌های باکتریایی، گیاهان سالم از گونه‌های میزبان در شرایط یکنواخت رشد (بستر پیت: پرلیت ۱:۱) انتخاب شدند. سوسپانسیون باکتریایی (کشت ۲۴ ساعته در محیط کشت LB، غلظت $\approx 10^8$ CFU/mL) آماده شد. تزریق داخل مزوفیل برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته با سرنگ انسولین و حجم ۱۰۰ میکرولیتر در هر نقطه انجام شد (۱۳). برای هر گیاه سه برگ و برای هر برگ دو ناحیه تلقیح شد (در مجموع ۶ نقطه). آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد به روش مشابه تزریق شد. گلدان‌ها به مدت ۲۰ روز در اتاقک رشد با رطوبت نسبی ۸۵ درصد، دمای 1 ± 25 سانتی‌گراد و طول روشنایی ۱۲ ساعت نگهداری شدند. برای القای رطوبت اولیه، هر گیاه پس از تلقیح به مدت ۲۴-۴۸ ساعت با کیسه پلی‌اتیلن پوشانده شد. ظهور و پیشرفت علائم روزانه ثبت و تصویربرداری شد. برای تکمیل اصول کخ، نمونه‌هایی از مرز بافت آلوده-سالم برداشته و پس از ضدعفونی سطحی با اتانول ۷۰ درصد (یک دقیقه) و شست‌وشو با آب مقطر استریل، روی محیط NA کشت داده شدند. جدایه‌های بازجداسازی‌شده از نظر مورفولوژی کلنی و آزمون‌های بیوشیمیایی با جدایه‌های اولیه، مقایسه و همسانی آنها تأیید شد.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی

گونه‌های *Pseudomonas* براساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی (۱۴-۱۸) بررسی شدند. ویژگی‌های ارزیابی‌شده شامل شکل کلنی، تولید رنگدانه فلورسنت روی

(*Zamioculcas zamiifolia*) بودند؛ در نهایت، ۲۰ نمونه از مناطق مختلف جمع‌آوری شد.

برای هر نمونه، برگ‌های حاوی اطلاعات کامل شامل کد نمونه، تاریخ و مختصات جغرافیایی محل جمع‌آوری، گونه گیاه میزبان و بخش آلوده گیاه تهیه شد. برگ‌های آلوده به‌صورت مجزا در کیسه‌های کاغذی قرار داده و تا زمان انتقال به آزمایشگاه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جداسازی و خالص‌سازی

به‌منظور جداسازی باکتری‌های بیماری‌زا، برگ‌های گیاهان آلوده خانواده آراسه با آب جاری، شسته و سپس در شرایط استریل خشک شدند. قطعات ۵ سانتی‌متری از مرز بافت سالم و آلوده، جدا و ضدعفونی سطحی با غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم ۱ درصد (به مدت ۳۰ ثانیه) انجام شد. سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. سوسپانسیون باکتریایی با قراردادن قطعات در آب مقطر استریل به مدت ۲۰ دقیقه و ورتکس کردن آنها تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون روی محیط کشت آگار غذایی (NA)، پخش و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد.

پرگنه‌های با مورفولوژی متفاوت، خالص‌سازی و روی محیط کینگ‌بی (King's B agar) کشت شدند. جدایه‌های دارای فلورسانس زیر نور فرابنفش به‌عنوان کاندیدای سودوموناس، انتخاب و برای تأیید نهایی در مطالعات بعدی استفاده شدند.

آزمون واکنش فوق حساسیت (Hypersensitive response)

آزمون HR روی برگ‌های گیاهان مدل، شمعدانی (*Pelargonium zonale*) و توتون (*Nicotiana tabacum*) مطابق روش (Klement et al (1964) انجام شد (۱۲).

۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (دستگاه نانودراپ) تعیین شد و نمونه‌های با نسبت OD260/OD280 ۱/۸ تا ۲ برای مراحل بعدی انتخاب شدند.

تکثیر قطعات ژنومی *16S rDNA*، *recA* و *rpoD* با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

ژن‌های *16S rDNA*، *recA* و *rpoD* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) و مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تکثیر شدند. ترکیب واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس ۲x (شرکت آمپلیکون^۳، دانمارک)، یک میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ پیکومول)، یک میکرولیتر DNA الگو و ۹/۵ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز بود. برنامه حرارتی در ترموسایکلر (انگلیس، مدل Techne TC_512) به شرح زیر تنظیم شد: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها برای ژن‌های *16S rDNA*، *recA* و *rpoD* به ترتیب در دمای ۶۰، ۵۸ و ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه؛ درنهایت، یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

محیط کشت کینگ بی (King's B agar) و رنگدانه زرد روی محیط YDC^۲، آزمون حساسیت به هیدروکسید پتاسیم ۳ درصد، رشد در شرایط هوازی و بی‌هوازی (O/F)، رشد در غلظت‌های مختلف NaCl، تولید گاز H₂S، آزمون‌های اکسیداز و کاتالاز، استفاده از سیترات، تولید اسید از سوربیتول، آرابینوز، دی‌زایلوز و مانیتول، آزمون متیل رد، هیدرولیز ژلاتین، نشاسته، آسکولین و توین ۸۰ و ۲۰ و تولید لوان از ساکارز بودند. همچنین فعالیت پکتولیتیکی استرین-های باکتریایی روی ورقه‌های سیب‌زمینی سنجش شد (۱۲). برای هر آزمون، شاهد‌هایی برای مقایسه در نظر گرفته شدند.

استخراج DNA و تکثیر قطعات ژنی

جدایه‌های باکتریایی پس از ۲۴ ساعت رشد روی محیط کشت NA، در یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شدند. استخراج DNA با روش لیز قلیایی اصلاح‌شده (۱۹) انجام شد. به هر نمونه ۲۰ میکرولیتر پتاس ۱۰ درصد، اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. نمونه‌ها پس از سرد شدن سریع روی یخ، با سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه رسوب-دهی شدند. مایع رویی حاوی DNA به لوله‌های جدید، منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج‌های

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده‌شده در این پژوهش

Table 1- PCR primer sequences used in this study

نام آغازگر	طول (bp)	Tm (°C)	توالی آغازگر (5'-3')
27F-16S rDNA	۱۹	۵۸C	GTCCGGAAAGAAATCGCTT
1492 R- 16S rDNA (۲۰)	۲۰	۵۸C	GCGGGACTTAACCCAACATC
recA 41F	۲۱	۵۹C	TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG
recA640R (۲۱)	۲۱	۶۰C	ACATSACRCCGATCTTCATGC
rpoD-Rpsc	۲۵	۶۳C	AAGGCGARATCGAAATCGCCAAGCG
rpoD-Fpc (۲۲)	۲۵	۶۳C	GGAACWKGCAGGAAGTCGGCACG

۱۰۰۰ تکرار برای برآورد پایداری شاخه‌ها ساخته شدند. به‌عنوان گروه خارجی^۵ *Pectobacterium brasiliense*_Strain_TS20SJ1 از خانواده Pectobacteriaceae برای ریشه‌دار کردن درختان فیلوژنتیک استفاده شد. پس از تأیید گونه‌ها با استفاده از رسم درخت فیلوژنتیک، توالی‌های نهایی در پایگاه داده NCBI ثبت شدند.

نتایج

جداسازی و شناسایی باکتری‌های عامل بیماری

در این مطالعه، ۲۰ سویه باکتریایی از گیاهان خانواده آراسه با علائم لکه‌برگی و بلایت، از مناطق مختلف ایران جمع-آوری و جداسازی شدند (شکل ۱). براساس آزمون‌های بیوشیمیایی اولیه، تولید رنگدانه فلورسنت در محیط کینگ بی (King's B)، فعالیت اکسیداز و کاتالاز و ویژگی‌های مورفولوژیک، تمامی سویه‌ها به جنس *Pseudomonas* تعلق داشتند. این سویه‌ها شامل ۹ سویه از گیاه آگلونما (*Agloanema treubii*)، ۴ سویه از دیفن باخیا (*Diffenbachia amoena*)، ۵ سویه از پتوس (*Epipremnum aureum*)، یک سویه از سینگونوم (*Syngonium podophyllum*) و یک سویه از برگ انجیری (*M. deliciosa*) بودند.

الکتروفورز محصولات PCR و توالی‌یابی

از هر محصول PCR، سه میکرولیتر در چاهک‌های ژل آگارز یک درصد (تهیه‌شده با بافر TAE) بارگذاری شد و الکتروفورز در ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت. ژل با محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۱۵ دقیقه، رنگ‌آمیزی و با دستگاه ژل داکيومنت تصویربرداری شد (۲۳). محصولات PCR با اندازه و شدت باند مناسب برای تعیین توالی به روش سانگر^۴ به شرکت بایونیر (کره جنوبی) ارسال شد.

رسم درخت فیلوژنتیک

توالی‌های خام دریافتی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit 7.0 (۲۴) ویرایش و اصلاح شدند. مقایسه میزان شباهت توالی‌ها با سویه‌های مرجع موجود در پایگاه داده از طریق ابزار BLASTn انجام گرفت. هم‌ردیفی توالی‌ها با بهره‌گیری از الگوریتم ClustalW صورت پذیرفت. تحلیل‌های فیلوژنتیکی به صورت جداگانه برای ژن *16s rDNA* و به صورت ترکیبی برای ژن‌های *recA* و *rpoD* در نرم‌افزار MEGA نسخه ۷ انجام شد. برای رسم درخت‌های فیلوژنتیک از توالی‌های معتبر متعلق به ژنوم کامل باکتری‌ها استفاده شد. بهترین مدل براساس معیار اطلاعات بیزین (BIC) انتخاب شد و درخت‌ها به روش Neighbor-joining با اجرای آزمون بوت استرپ با



شکل ۱: نمونه‌های جمع‌آوری شده با علائم لکه‌برگی برای جداسازی و شناسایی باکتری‌های عامل بیماری

Figure 1. Collected leaf spot samples to isolate and identify the causal bacterial pathogen

نتایج آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی مطابق با اصول کخ روی گیاهان میزبان سالم از گونه‌های *Epipremnum aureum* (پتوس)، *Syngonium* (آگلونما) و *podophyllum* (سینگونیوم) انجام شد. سوسپانسیون باکتریایی هر سویه با غلظت 10^8 CFU/mL به روش تزریق درون بافتی به برگ‌های جوان تلقیح شد. گیاهان شاهد با آب استریل تلقیح شدند و تحت شرایط کنترل‌شده (دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعته) نگهداری شدند. ۷۲ ساعت پس از تلقیح، لکه‌های آبرسوخته کوچک (قطر ۲-)

۱ میلی‌متر) با حاشیه زاویه‌دار در سطح زیرین برگ‌ها مشاهده شد. در مرحله پیشرفت (۱۰ روز پس از تلقیح)، لکه‌ها به‌طور چشمگیری گسترش یافتند (قطر ۱۰-۵ میلی‌متر) و به رنگ قهوه‌ای تیره با هاله زردرنگ تغییر یافتند. در مرحله نهایی (۱۵ روز بعد) در آلودگی‌های شدید، لکه‌ها به هم پیوستند (شکل ۲) و موجب نکروز کامل برگ‌ها، خشک‌شدگی و ریزش آنها شدند؛ با این حال، هیچ نشانه‌ای از آلودگی سیستمیک مانند پژمردگی آوندی یا تغییر رنگ ساقه در گیاهان آلوده مشاهده نشد.



شکل ۲- آزمون بیماری‌زایی روی گیاهان میزبان a: آگلونما b: سینگونیوم c: پتوس

Figure 2. Pathogenicity test on *Epipremnum aureum* (a), *Syngonium podophyllum* (b), *Aglaonema treubii* (c)

نداشتند و روی نمک خوراکی ۳ و ۵ درصد رشد کردند. آنها از سترات استفاده کردند؛ اما آزمون متیل رد و تولید سولفید هیدروژن از پیتون در آنها منفی بود. این سویه‌ها قادر به متابولیسم کردن دی‌سوربیتول، مانیتول، آرابینوز و دی‌زایلوز بودند. علاوه بر این، توانایی هیدرولیز ژلاتین، توین ۲۰ و توین ۸۰ را داشتند؛ اما نشاسته و اسکولین را هیدرولیز نکردند.

ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های باکتریایی آزمایش‌شده

در مجموع ۲۰ سویه بررسی شده روی محیط کشت King's B تولید رنگ فلورسنت کردند و دارای ظاهر موکوئیدی بودند. این سویه‌ها گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری (دارای تنفس نیتراتی) بودند. فعالیت اکسیداز، کاتالاز، لوان دی‌هیدرولاز و آژنین دی‌هیدرولاز در آنها مثبت بود. توانایی تولید رنگدانه زرد روی محیط کشت آگار گچ‌دار (YDC) در آنها منفی بود. همچنین، این سویه‌ها فعالیت پکتولیتیکی

بررسی‌های مولکولی

مقایسه توالی‌های ژنی در این پژوهش (ژن‌های *I6s rDNA*، *recA* و *rpoD*) با جدایه‌های معتبر در بانک ژن، با استفاده از نرم‌افزار آنالین BLASTn نشان داد تمامی جدایه‌ها بیش از ۹۷ درصد شباهت نوکلئوتیدی با گونه‌های ثبت شده *P. aeruginosa* دارند (جدول ۲). سویه‌های PE1، PE2، PE3 و PE3 در بانک ژن ثبت شدند (جدول ۳) و برای رسم درخت فیلوژنتیکی با توالی‌های مرجع از مقالات معتبر مقایسه شدند.

تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-Joining و با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰ تکرار، برای ژن *16S rDNA* (شکل ۳) و همچنین ترکیبی از ژن‌های *rpoD* و *recA* انجام شد (شکل ۴). نتایج نشان دادند هر سه سویه با ۹۹ درصد شباهت درون خوشه با *P. aeruginosa* قرار گرفتند. این نتایج تأیید می‌کنند جدایه‌های مطالعه متعلق به گونه *P. aeruginosa* هستند.

جدول ۲- درصد تشابه ژن‌های مطالعه‌شده با توالی‌های معتبر در پایگاه داده NCBI

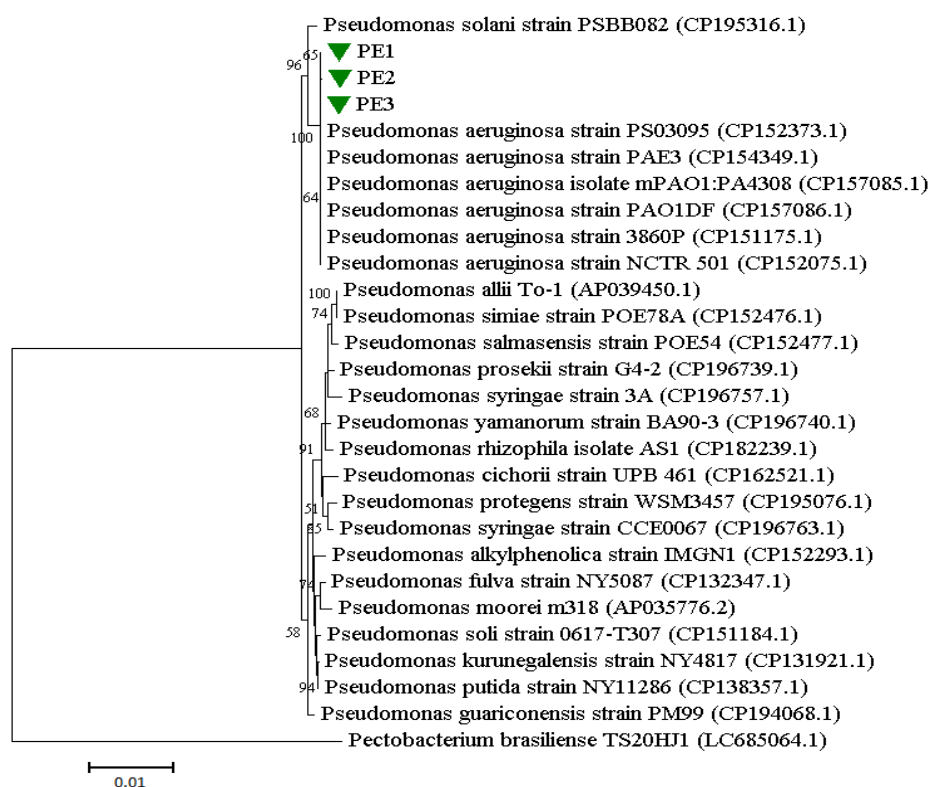
Table 2- Percentage of similarity of the studied genes with reference sequences in the NCBI database

جدایه	<i>I6s rDNA</i> (%)	کد دسترسی	<i>rpoD</i> (%)	کد دسترسی	<i>recA</i> (%)	کد دسترسی
PE1	۹۷٪	MF480357.1	۹۸٪	CP093032.1	۹۹٪	CP111032.1
PE2	۹۷٪	EF510845.1	۹۸٪	LT600948.1	۹۹٪	CP025055.2
PE3	۹۷٪	OP763181.1	۹۹٪	CP142601.1	۹۹٪	CP107042.1

جدول ۳- شماره‌های دسترسی ژن‌های ثبت شده در NCBI و میزبان استرین‌ها

Table 3- Gene Accession Numbers in the NCBI and Host Strain Information

ID استرین	گونه	<i>16s rDNA</i>	میزبان
PE1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PV208048	<i>Epipremnum aureum</i>
PE2	<i>P. aeruginosa</i>	PV200776	<i>Aglaonema treubii</i>
PE3	<i>P. aeruginosa</i>	PV200859	<i>Syngonium podophyllum</i>

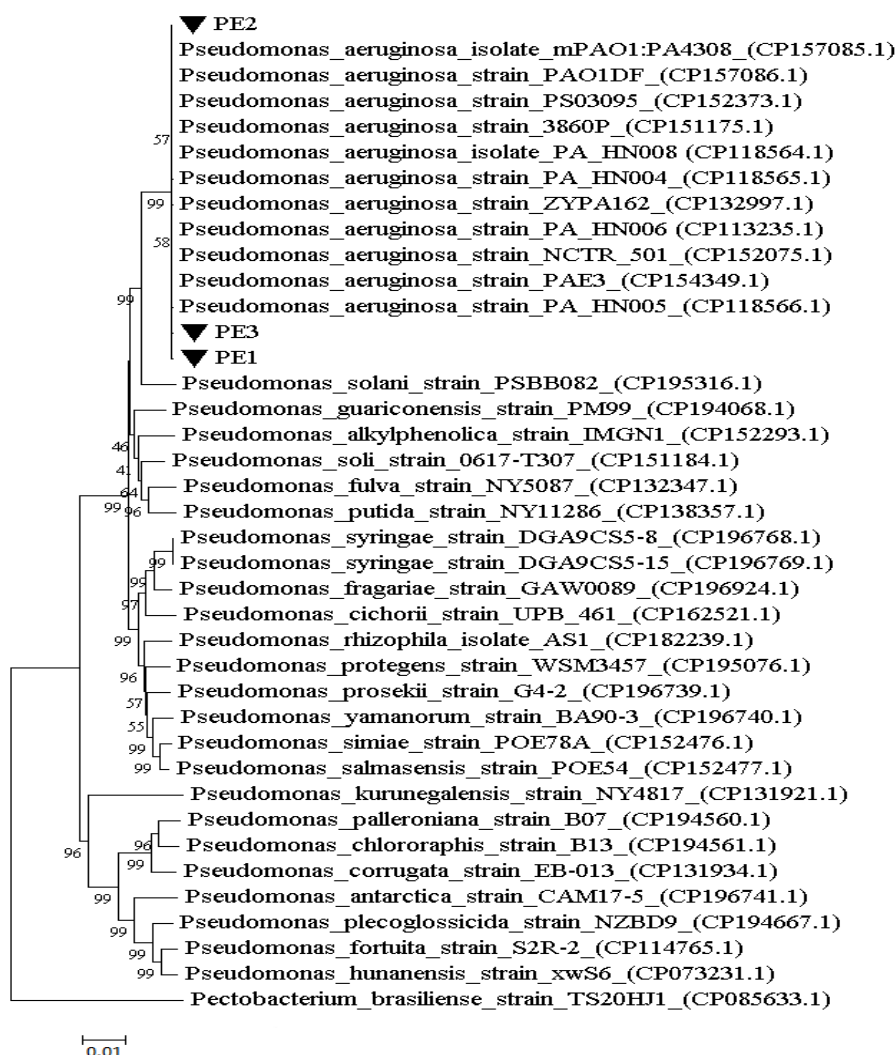


شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی استرین‌های PE1، PE2، PE3 با استفاده از روش همسایگی (neighbor-joining) برای ژن 16S rDNA، مقیاس نشان‌دهنده ۰/۰۱ تغییر در توالی بین استرین‌های مختلف است. اعداد بالای هر شاخه درجه اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. این نمودار درختی نشان می‌دهد سویه‌های PE1، PE2، PE3 ارتباط نزدیکی با هم دارند.

Figure 3- The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method based on 16S rDNA gene sequences. The scale bar represents 0.01 nucleotide substitutions per site. Bootstrap values, calculated from 1000 replicates, are shown above each branch. The tree indicates that strains PE1, PE2, and PE3 are closely related.

نوترکیبی (DNA) به دلیل نرخ تکاملی نسبتاً ثابت، سطح پایین انتقال ژن افقی و حفاظت‌شدگی بالای توالی، به‌عنوان نشانگرهای مولکولی کلیدی برای تمایز گونه‌های این جنس شناخته می‌شوند (۲۵). این ژن‌ها قابلیت تفکیک دقیق تا سطح گونه را فراهم کرده‌اند (۲۶).

برای تحلیل روابط تکاملی، از مدل Kimura 2-parameter همراه با توزیع گامای گسسته (K2+G+I) استفاده شد. انتخاب نشانگرهای ژنتیکی مناسب در مطالعات فیلوژنی سودوموناس‌ها از اهمیت کلیدی برخوردار است. براساس مطالعات فیلوژنتیکی، ژن‌های خانه‌دار (*rpoD*) کدکننده زیرواحد سیگمای RNA پلیمراز و *recA* درگیر در ترمیم



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی استرین‌های PE1، PE2 و PE3 با استفاده از روش neighbor-joining برای دو ژن *rpoD* و *recA* مقیاس نشان‌دهنده ۰/۰۱ تغییر در توالی بین استرین‌های مختلف است. اعداد بالای هر شاخه درجه اعتبار سنجی از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد.

Figure 4- A neighbor-joining phylogenetic tree based on the *rpoD* and *recA* genes, showing the relationships among strains PE1, PE2, and PE3. The scale bar represents 0.5% sequence divergence. Bootstrap values (1000 replicates) are shown above each branch.

۲۷؛ ۲۸). با این حال، شناسایی *P. aeruginosa* در این

پژوهش، گستره میزبانی این باکتری را به گیاهان زینتی آراسه گسترش می‌دهد و نیاز به بازنگری در برنامه‌های مدیریتی را آشکار می‌کند.

ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌های مطالعه‌شده، با مشخصات *P. aeruginosa* سویه مرجع (MTCC 647) همسویی درخور توجهی نشان می‌دهد. با این حال، برخی تست‌های بیوشیمیایی نظیر تولید اسید از D-سوربیتول،

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری‌های لکه‌برگی ناشی از باکتری‌های جنس *Pseudomonas* به‌عنوان یک چالش جدی در کشت گیاهان زینتی شناخته می‌شوند. این مطالعه برای نخستین بار نقش *P. aeruginosa* را به‌عنوان عامل بیماری‌زای گیاهان خانواده آراسه در ایران گزارش می‌کند. پیش از این، گونه‌های *P. aeruginosa* *P. marginalis* و *P. cichorii* به‌عنوان عوامل اصلی لکه‌برگی در این خانواده در دنیا معرفی شده بودند (۸)؛

آنتاگونیستی داشته باشند (۳۴)؛ با این حال، همین سویه‌ها در میزبان‌های حساس یا تحت شرایط استرس، به‌عنوان عامل بیماری‌زای مهاجم عمل می‌کنند (۳۵). این دوگانگی نقش، چالش‌های جدی در مدیریت اکولوژیک این باکتری ایجاد کرده است؛ برای نمونه، *P. aeruginosa* علاوه بر گزارش‌های پیشین به‌عنوان عامل پوسیدگی در محصولات پیاز (۳۶) و جینسنگ (۳۷)، پوسیدگی میوه تیندا (*Praecitrullus fistulosus*) (۳۸)، لکه‌برگی توتون (۳۹) و پوسیدگی طوقه در گل شیپوری (*Zantedeschia elliottiana*) از خانواده آراسه (۷) گزارش شده است. همچنین این مطالعه اولین شواهد از حضور این بیمارگر در گیاهان خانواده آراسه در ایران به شمار می‌رود. در مقابل، گونه‌های نزدیک مانند *P. cichorii* نیز به‌عنوان عامل بیماری‌زای لکه‌برگی آراسه شناخته می‌شوند (۱۰). این اختلاف ممکن است نشان‌دهنده خطاهای تاکسونومیک ناشی از تشابه ژنتیکی بالا در ژن‌های سنتی (مانند *16S rDNA*) یا تنوع در مجموعه ژن‌های پرآزاری باشد. این ناهمگونی‌ها ممکن است نشان‌دهنده وجود تنوع زیرگونه‌ای یا ژنوارهای نوظهور در جمعیت‌های *P. aeruginosa* باشد که پیش از این در مطالعات پیشین کمتر به آن توجه شده است. برای حل این ابهام، استفاده از روش‌های مولکولی پیشرفته نظیر توالی‌یابی ژنوم کامل^۹ و تحلیل ژن‌های مرتبط با پرآزاری ضروری است (۴۰). چنین رویکردی نه تنها مرز بین گونه‌ها را مشخص می‌کند، بلکه امکان شناسایی سویه‌هایی که هم بیمارگر و هم آنتاگونیست هستند در شرایط خاص را فراهم می‌آورد.

شرایط محیطی نامساعد نظیر آبیاری بارانی مکرر و رطوبت نسبی بالا، همراه با مصرف بیش‌ازحد کودهای نیتروژنی، علاوه بر اینکه موجب ایجاد استرس فیزیولوژیک در گیاهان می‌شود، با تضعیف سدهای دفاعی گیاهی (مانند کاهش تولید فیتوالکسین‌ها)، زمینه را برای نفوذ و تکثیر بیمارگرهای باکتریایی فراهم می‌کند (۴۱). مطالعات نشان می‌دهند نیتروژن اضافی با اختلال در توازن هورمونی گیاه (به‌ویژه

مانیتول، آرابینوز و دی‌زایلوز که در سویه‌های معمول *P. aeruginosa* گزارش نشده‌اند، لزوم انجام بررسی‌های تکمیلی ژنومی نظیر توالی‌یابی و آنالیز^۶ MLST را برای تعیین دقیق جایگاه تاکسونومیک این جدایه‌ها نشان می‌دهد.

در این مطالعه، استفاده از روش MLSA مبتنی بر ژن‌های *16S rDNA*، *rpoD* و *recA*، امکان تفکیک دقیق گونه‌های نزدیک به هم در جنس *Pseudomonas* را فراهم کرد. این یافته با پژوهش‌های پیشین همسواست که تأکید دارند تکیه صرف بر ژن *16S rDNA* به دلیل شباهت بالای توالی‌ها (تفاوت نوکلئوتیدی کمتر از ۱ درصد) در برخی گونه‌های این جنس، می‌تواند به خطا در شناسایی منجر شود (۲۹)؛ در مقابل، ژن‌های *rpoD* و *recA* به دلیل نرخ جهش بالاتر، ابزارهای مولکولی کارآمدی برای تمایز درون گونه‌ای هستند (۳۰-۳۲). این نتایج، اهمیت تلفیق داده‌های فنوتیپی با تحلیل‌های چندژنی را در شناسایی دقیق بیمارگرهای باکتریایی برجسته می‌کند.

برخی سویه‌های جنس *Pseudomonas*، از جمله *P. aeruginosa* دارای دوگانگی عملکردی درخور توجهی هستند؛ به طوری که در شرایط مختلف هم به‌عنوان بیمارگر گیاهی و هم به‌عنوان عامل کنترل زیستی گزارش شده‌اند؛ برای مثال، سویه *P. aeruginosa* PNA1 به‌طور همزمان توانایی مهار پوسیدگی ریشه ناشی از *Pythium myriotylum* و ایجاد بیماری در گیاهان حساس را نشان داده است (۳۳). این تناقض ممکن است ناشی از تفاوت در بیان ژن‌های پرآزاری یا تولید متابولیت‌های ثانویه (مانند فنازین‌ها و بیوسورفکتانت‌ها) تحت شرایط محیطی متفاوت باشد. مطالعات اخیر نیز تأیید می‌کنند سویه‌های *P. aeruginosa* (مانند جدایه EU081518) قادرند از طریق مکانیسم‌های مختلفی نظیر انحلال فسفات، تولید سیدروفور، سنتز اکسین (IAA^۷) و انتشار سیانید هیدروژن (HCN^۸)، همزمان هم رشد گیاه را بهبود بخشند و هم علیه بیمارگرهای قارچی فعالیت

مطالعات پیشین نشان می‌دهند MLISA با استفاده همزمان از ژن‌های تکاملی مانند *recA*، *rpoD* و *gyrB*، خطای طبقه‌بندی ناشی از تشابه بالای توالی *16S rDNA* در جنس *Pseudomonas* را تا ۸۵ درصد کاهش می‌دهد (۳۱). این دقت بالا علاوه بر اینکه تفکیک سویه‌های نزدیک به هم (مانند *P. aeruginosa* و *P. putida*) را ممکن می‌کند، امکان ردیابی منشأ آلودگی و طراحی استراتژی‌های کنترل هدفمند (مانند استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی یا سویه‌های آنتاگونیست) را فراهم می‌کند (۲۸). با توجه به ارزش اقتصادی بالای گیاهان زینتی آراسه در بازارهای صادراتی، اتخاذ چنین روش‌هایی هم از خسارات مالی جلوگیری می‌کند و هم پایه علمی مستحکم‌تری برای توسعه دستورالعمل‌های قرنطینه‌ای و استانداردهای بهداشتی فراهم می‌آورد (۴۳).

افزایش اتیلن و کاهش جاسمونات)، مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) را سرکوب و گیاهان را به‌ویژه در برابر بیمارگرهای گرم منفی مانند *Pseudomonas* آسیب‌پذیر می‌کند. در خانواده آراسه، این پدیده به‌وضوح در بروز لکه‌های نکروتیک با حاشیه زردرنگ مشاهده می‌شود (۴۲).

با توجه به تأثیر مخرب بیماری‌های باکتریایی مانند لکه‌برگی ناشی از *Pseudomonas* spp. بر کیفیت ظاهری و بازارپسندی گیاهان زینتی خانواده آراسه (نظیر پوسیدگی برگ‌ها و کاهش عمر گیاهان)، ادغام روش‌های مدیریت تلفیقی بیماری (IDM) در برنامه‌های کشاورزی ضروری است. در این میان، به‌کارگیری تحلیل توالی چندجایگاه (MLSA) به‌عنوان یک ابزار مولکولی پیشرفته، نقش کلیدی در بهبود دقت تشخیص بیمارگرها دارد.

References

- Croat TB. The distribution of the Araceae. *Trop Bot*. 1979;291–308. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573668924927112448>
- Boyce P. Introduction to the family Araceae. *Curtis's Bot Mag*. 1995;12(3): 122–5. Available from: <https://www.jstor.org/stable/45065104>
- Boyce PC, Croat TB. *The Überlist of Araceae, totals for published and estimated number of species in aroid genera* [Internet]. 2011. Available from: <http://www.aroid.org/genera/160330uberlist.pdf> [accessed 1 Jun 2018].
- Ministry of Jihad Agriculture. *Agricultural Statistical Yearbook 2022*. Deputy for Planning and Economics Affairs, Ministry of Jihad Agriculture; 2023 [In Persian]
- Gomila M, Peña A, Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front Microbiol*. 2015;6:214. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00214>
- Choi O, Lee Y, Kang B, Kim S, Kim J. Bacterial blight on *Sansevieria cylindrica* caused by *Pseudomonas* sp. *Australas Plant Dis Notes*. 2021;16(1):23. <https://doi.org/10.1007/s13314-021-00437-9>
- Shanmugam V, Thakur H, Paul S, Bhadwal P, Mahajan S, Mondal KK. First report of collar rot caused by *Pseudomonas aeruginosa* on Calla lily (*Zantedeschia elliottiana*). *Phytopathol Mediterr*. 2016;55(3):427–31. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-18129
- Scortichini M. Leaf spot and blight of *Dieffenbachia amoena* caused by *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*. *Plant Pathol*. 1994;43(5):941–3. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1994.tb01640.x>
- Prior P, Hostachy B, Sunder P, Rott P. Bacterial blight (*X. campestris* pv. *dieffenbachiae*) and bacterial leaf spot (*Pseudomonas* sp.) of *Anthurium* in the French West Indies. *22nd Annual Meeting CFCS*; 1986; Castries, Saint Lucia. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.261350>
- Wehlburg C, Seymour CP, Stall RE. Leaf spot of Araceae caused by *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 1966;79:433-5. https://journals.flvc.org/fshs/article/download/100461/96416?utm_source=chatgpt.com
- Petruzzello M. *Araceae* [Internet]. Encyclopedia Britannica; 2023. Available from: <https://www.britannica.com/plant/Araceae>

- (12) Klement Z. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf. *Phytopathology*. 1964;54: 475–7. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19641102726>
- (13) Schaad LJ, Hess BA. Dewar resonance energy. *Chem Rev*. 2001;101(5):1465–76. <https://doi.org/10.1021/cr9903609>.
- (14) Ayers SH, Rupp P, Johnson WT. *A study of the alkali-forming bacteria found in milk*. Washington (US): US Department of Agriculture; 1919. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.108233>
- (15) Misaghi I, Grogan RG. Nutritional and biochemical comparisons of plant-pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*. 1969;59 (10):1436–50. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19701100924>
- (16) Suslow TV, Schroth MN, Isaka M. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *J Phytopathol*. 1982;72:917–8. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-917>
- (17) Schaad NW. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society; 1988. 164 p. https://scispace.com/papers/laboratory-guide-for-the-identification-of-plant-pathogenic-32u3fjwudu?citations_page=72
- (18) Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Sechler A, Agarkova IV, Stromberg PE, et al. Emended classification of Xanthomonad pathogens on Citrus. *Syst Appl Microbiol*. 2006;29(8):690–5. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.08.001>
- (19) Li R, Mock R, Huang Q, Abad JO, Hartung J, Kinard G. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *J Virol Methods*. 2008;154(1–2):48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.008>.
- (20) Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial *16S rRNA* genes. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(8):2461–70. <https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>
- (21) Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2004;42(5): 2074–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004>
- (22) Sarkar SF, Guttman DS. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(4): 1999–2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1999-2012.2004>
- (23) Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman J. *Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology*. 2nd ed. University of California: Greene Pub. Associates; 1992.
- (24) Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999;41:95–8. <https://B2n.ir/eu1119>
- (25) Mulet M, Sánchez D, Lalucat J, Lee K, García-Valdés E. *Pseudomonas alkylphenolica* sp. nov., a bacterial species able to form special aerial structures when grown on p-cresol. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65(Pt_11):4013–8. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000529>
- (26) Lalucat J, Mulet M, Gomila M, García-Valdés E. Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes (Basel)*. 2020;11(2): 139. <https://doi.org/10.3390/genes11020139>
- (27) Krejzar V, Mertelík J, Pánková I, Kloudová K, Kúdela V. *Pseudomonas marginalis* associated with soft rot of *Zantedeschia* spp. *Plant Protect Sci*. 2008;44(3):85–90. <https://pps.agriculturejournals.cz/pdfs/pps/2008/03/02.pdf>
- (28) Wang F, Tang T, Mao T, Guo X, Duan Y, You J. *Pseudomonas cichorii* causing leaf spot disease on *Banxia (Pinellia ternata)* in China. *Plant Dis*. 2022;106(12):3198. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-22-0060-PDN>
- (29) Mulet M, Gomila M, Scotta C, Sánchez D, Lalucat J, García-Valdés E. Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. *Syst Appl Microbiol*. 2012; 35(7):455–64. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.08.007>

- (30) Mulet M, Bennasar A, Lalucat J, García-Valdés E. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Mol Cell Probes*. 2009;23(3-4):140-7. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.02.001>
- (31) Glaeser SP, Kämpfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiol*. 2015;38 (4):237-45. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>
- (32) Bennasar A, Mullet M, Lalucat J, Garcia E. PseudoMLSA: a database for multigenic sequence analysis of *Pseudomonas* species. *BMC Microbiol*. 2010;10:118. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-118>
- (33) Perneel M, D'hondt L, De Maeyer K, Adiobo A, Rabaey K, Höfte M. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. *Environ Microbiol*. 2008;10(3):778-88. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01501.x>
- (34) Uzair B, Kausar R, Bano SA, Fatima S, Badshah M, Habiba U, Fasim F. Isolation and molecular characterization of a model antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* divulging in vitro plant growth promoting characteristics. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6147380. <https://doi.org/10.1155/2018/6147380>
- (35) Li Y, Hu Y, Chen T, Chen Y, Li Y, Zhou H, Yang D. Advanced detection and sensing strategies of *Pseudomonas aeruginosa* and quorum sensing biomarkers: a review. *Talanta*. 2022;240:123210. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123210>
- (36) Cother EJ, Darbyshire B, Brewer J. *Pseudomonas aeruginosa*: cause of internal brown rot of onion [Bacterial diseases]. *Phytopathology*. 1976;66(7):828. <https://doi.org/10.1094/Phyto-66-828>
- (37) Gao J, Wang Y, Wang CW, Lu BH. First report of bacterial root rot of ginseng caused by *Pseudomonas aeruginosa* in China. *Plant Dis*. 2014;98(11):1577. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-14-0276-PDN>
- (38) Mondal KK, Mani C, Singh J, Dave SR, Tipre DR, Kumar A, Trivedi BM. Fruit rot of Tinda caused by *Pseudomonas aeruginosa*—a new report from India. *Plant Dis*. 2012;96(1):141. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0404>
- (39) Yu L, Qin XY, Du J, Wang AY, Zhao YY, Shen DJ, et al. Bacterial leaf spot of tobacco caused by *Pseudomonas aeruginosa* in China. *Plant Pathol*. 2008;57(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01876.x>
- (40) Glick L, Mayrose I. The effect of methodological considerations on the construction of gene-based plant pan-genomes. *Genome Biol Evol*. 2023;15(7):evad121. <https://doi.org/10.1093/gbe/evad121>
- (41) Khan R, Begum S, Bandhavi RD. Phytoalexins biosynthesis and their crosstalk during stress adaptation in cereals. In: *Advances in Genetics and Plant Breeding*. 2021. p. 53-90.
- (42) Gupta KK, Devi D. Characteristics investigation on biofilm formation and biodegradation activities of *Pseudomonas aeruginosa* strain ISJ14 colonizing low density polyethylene (LDPE) surface. *Heliyon*. 2020;6(7):e04398. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04398>
- (43) Ndondo JT. Review of the Food and Agriculture Organisation (FAO) Strategic Priorities on Food Safety 2023. In: *Food Safety – New Insights* [Internet]. IntechOpen; 2023 Nov 29. <https://doi.org/10.5772/intechopen.106234>

¹ Araceae² Yeast extract-Dextrose-CaCO₃³ Ampliqon Taq DNA Polymerase Master Mix RED1/25(mL, Ampliqon, Denmark)⁴ Sanger⁵ Outgroup⁶ Multi-Locus Sequence Analysis⁷ Indole-3-acetic acid⁸ Hydrogen cyanide⁹ Whole Genome Sequencing