



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**Diversidade de espécies de *Burkholderia* causadoras de podridão em bulbos de cebolas no semiárido brasileiro**

**Ana Dulce Botelho Baia**

**Recife – PE**

**2019**

**ANA DULCE BOTELHO BAIA**

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Burkholderia* CAUSADORAS DE PODRIDÃO EM  
BULBOS DE CEBOLAS NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Elineide Barbosa de Souza

Coorientador: Dr. Adriano Marcio Freire Silva

**RECIFE-PE**

**FEVEREIRO – 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Centra, Recife-PE, Brasil

B152d Baia, Ana Dulce Botelho  
Diversidade de espécies de Burkholderia causadoras de podridão  
em bulbos de cebolas no semiárido brasileiro / Ana Dulce Botelho  
Baia. – 2019.  
111 f.: il.

Orientador: Marco Aurélio Siqueira da Gama.

Coorientadores: Elineide Barbosa de Souza e Adriano Márcio  
Freire Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências.

1. Podridão 2. Cebola - Doenças e pragas 3. Bactérias gram-  
negativas 4. Doenças bacterianas das plantas I. Gama, Marco Aurélio  
Siqueira da, orient. II. Souza, Elineide Barbosa de, coorient.  
III. Silva, Adriano Márcio Freire, coorient. IV. Título

CDD 632

**Diversidade de espécies de *Burkholderia* causadoras de podridão em bulbos de cebolas  
no semiárido brasileiro**

**Ana Dulce Botelho Baia**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 25/02/2019

**ORIENTADOR:**

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama**

**EXAMINADORES:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anna Carolina Soares Almeida**

---

**Prof. Dr. Jonas Alberto Rios**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Blawid**

---

**Prof. Dr. Wilson José da Silva Júnior**

**RECIFE - PE**

**FEVEREIRO – 2019**

*A minha família por todo apoio e amor incondicional.*

**DEDICO**

*A Deus que sempre esteve ao meu lado.*

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as oportunidades que tem me proporcionado e por todo amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama, pela orientação, dedicação, ensinamentos, apoio e amizade.

À minha mãe que é uma guerreira e que nunca mediu esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos.

À minha família que é a minha base e que sempre me apoiou.

Ao meu namorado Ezequias Teófilo, pelo carinho, compreensão, amizade e por se fazer presente em todos os momentos.

Aos meus amigos do Laboratório da Fitobacteriologia Alba Suaste, Ana Karolina, Bárbara Ribeiro, Beatriz Cruz, Bruno Alves, Claudeana Sousa, Emanuel Feitosa, Jéssica Rodrigues, Joelma Resende, Géssyca Rodrigues, Greecy Mirian, Leandro Silva, Leandro Velez, Lucas Lucena, Pedro Henrique, Rayanne Moraes e Walkiria Alves pelo apoio científico e momentos de felicidade. Somos realmente uma família, a família LAFIBAC.

Às professoras Dra. Rosa Mariano e Dra. Elineide Barbosa, pela amizade, confiança e colaboração para o andamento desta pesquisa.

Ao meu coorientador e grande amigo Adriano Silva, por todo apoio, compreensão, contribuições científicas e momentos de descontração.

Aos meus *roommates* Josiene Veloso e Paulo Barbosa por me receber e me amparar em vários sentidos nesses quatro anos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado.

À UFRPE, a todos os membros, profissionais e professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia que contribuíram para a minha formação acadêmica e profissional.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para desenvolvimento dessa pesquisa científica, o meu muito obrigada!!!!

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	v
RESUMO GERAL .....	vii
ABSTRACT .....	viii
CAPÍTULO I: Introdução geral.....	11
1. A cultura da cebola .....	11
2. Podridão das escamas da cebola.....	13
3. Características do complexo <i>Burkholderia cepacia</i> .....	15
4. Características de <i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> .....	17
5. Identificação e classificação de espécies <i>Burkholderia</i> .....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23
CAPÍTULO II: Caracterização polifásica de isolados de <i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> , agente causal da podridão escorregadia da cebola .....	38
Resumo .....	38
Abstract.....	39
Materiais e Métodos .....	41
Resultados.....	45
Discussão .....	48
Agradecimentos .....	50
Literatura citada.....	51
CAPÍTULO III: Caracterização polifásica de isolados do complexo <i>Burkholderia cepacia</i> associados a podridão das escamas de cebola no semiárido brasileiro .....	68
Resumo .....	68
Materiais e Métodos .....	71
Resultados.....	75
Discussão .....	78
Agradecimentos .....	81
Literatura citada.....	82
CONCLUSÕES GERAIS .....	106

## RESUMO GERAL

A podridão das escamas da cebola é uma das mais importantes doenças bacterianas da cebola. Esta doença está presente em muitas áreas de cultivo de cebola no mundo, causando danos de até 50% da produção. Isolados patogênicos a cebola, tais como aqueles pertencentes ao complexo *B. cepacia* e *B. gladioli* pv. *alliicola* foram recentemente detectados no semiárido brasileiro, tornando os bulbos impróprios para a comercialização. Todavia, estudos envolvendo técnicas confiáveis ainda não foram realizados para melhor compreensão da diversidade e variabilidade de isolados obtidos nessa região. Portanto, a presente pesquisa teve como objetivo identificar e caracterizar isolados causadores de podridão das escamas da cebola (termo usado para designar bulbos de cebola com sintomas de podridão bacteriana das escamas e podridão escorregadia) nas principais regiões produtoras do semiárido brasileiro. Para isso, 31 isolados de *B. gladioli* obtidos de bulbos de cebola com podridão escorregadia foram analisados com base em uma análise polifásica, envolvendo genotipagem por rep-PCR, sequenciamento do gene *recA*, análise da sequência multilocos (MLSA) e características bioquímicas, morfológicas e patogênicas, e 84 isolados do complexo *B. cepacia* obtidos de bulbos de cebola com podridão bacteriana da escama foram analisados por meio dessas ferramentas e da tipagem da sequência multilocos (MLST). Entre os isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* foram observadas colônias pigmentadas e não pigmentadas. Vinte e oito isolados apresentaram reação de PCR-positiva com os *primers* específicos para *B. gladioli* (CMG-23-1 e G-23-2). A análise por rep-PCR evidenciou uma elevada variabilidade genética entre os isolados. A análise de inferência Bayesiana (IB) realizada com o gene *recA* e 16 isolados selecionados com base em rep-PCR permitiu o agrupamento dos mesmos junto com o isolado tipo de *B. gladioli*. No entanto, 11 isolados foram mais relacionados a *B. gladioli* pv. *alliicola* e 5 foram mais relacionados a *B. gladioli* pv. *gladioli*. A MLSA realizada por meio de IB com os genes *recA*, *gyrB*, *lepA* e *trpB*, confirmou os resultados observados pelo gene *recA*. Os isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* e *B. gladioli* pv. *gladioli* utilizaram 12 compostos bioquímicos não utilizados pelo isolado tipo de *B. gladioli* pv. *alliicola*. Foram observadas diferenças estatísticas significativas entre a severidade da doença provocada por isolados pigmentados e não pigmentados. Considerando os isolados do CBC, a análise de rep-PCR evidenciou uma elevada variabilidade genética entre os isolados. A análise de inferência Bayesiana (IB) realizada com o gene *recA* permitiu o agrupamento de 50 isolados selecionados com base em rep-PCR em quatro clados: clado I formado por 29 isolados que se agruparam com os isolados tipo de *B. cenocepacia* linhagem IIIB, o clado II formado por 11 isolados que se agruparam com o isolado tipo de *B. cenocepacia* linhagem IIIA, o clado III composto por um isolado (CCRMBC51) que não se agrupou com nenhuma espécie conhecida, e o clado IV formado por 10 isolados que também não se agruparam com nenhuma espécie conhecida. A MLSA realizada por meio de IB com os genes *recA*, *gyrB*, *atpD*, *gltB*, *lepA*, *trpB* e *phaC*, confirmou os resultados observados com o gene *recA*. A análise por MLST permitiu a detecção de oito sequências tipos, destas sete foram sequências novas. Os isolados do estudo utilizaram 15 compostos bioquímicos não utilizados pelo isolado tipo de *B. cepacia*. Foram observadas diferenças significativas entre a severidade da doença, sendo observados 5 grupos de severidade. Com base nos resultados obtidos, foi observada uma alta diversidade de espécies de *Burkholderia* causando a podridão das escamas no semiárido brasileiro. Por sua vez, as espécies prevalentes, *B. cenocepacia* e *B. gladioli*, também apresentaram elevada variabilidade genética. Esses parâmetros devem ser levados em consideração em programas de melhoramento genético visando a resistência a doença.

**Palavras-chave:** podridão em cebola, complexo *B. cepacia*, *B. gladioli* pv. *alliicola*

## ABSTRACT

The sour skin is one of the most important bacterial diseases of onion worldwide. This disease is present in many, if not all, of the onion production areas in the world, causing several damages to onion crop with losses of up to 50% of the production. Isolated pathogenic onion, such as those belonging to the *B. cepacia* complex and *B. gladioli* pv. *alliicola* were recently detected in the Brazilian semiarid, making the bulbs unsuitable for commercialization. However, studies involving reliable techniques have not yet been performed to better understand the diversity and variability of isolates obtained in this region. Therefore, the present research had as objective to identify and characterize isolates that cause sour skin of onion (the term used to design onion bulbs with symptoms of bacterial rotting of scales and slippery rot) in the main producing regions of Brazilian semiarid. For this, 31 isolates of *B. gladioli* obtained from onion bulbs with slippery rot were analyzed based on a polyphase analysis, involving rep-PCR genotyping, *recA* gene sequencing, multilocus sequence analysis (MLSA), and biochemical, morphological characteristics and pathogenic bacteria, and 84 isolates of the *B. cepacia* complex obtained from onion bulbs with bacterial sour skin of onion were analyzed using these tools and MLST. Among the isolates of *B. gladioli* pv. *alliicola* were observed pigmented and non-pigmented colonies. Twenty-eight isolates showed PCR-positive reaction with primers CMG-23-1 and G-23-2. Rep-PCR analysis showed high genetic variability among the isolates. The Bayesian inference (IB) analysis performed with the *recA* gene and 16 isolates selected on the basis of rep-PCR enabled them to be grouped together with the *B. gladioli* type isolate. However, 11 isolates were more related to *B. gladioli* pv. *alliicola* and 5 were more related to *B. gladioli* pv. *gladioli*. The MLSA performed by means of IB with the *recA*, *gyrB*, *lepA* and *trpB* genes, confirmed the results observed by the *recA* gene. The isolates of *B. gladioli* pv. *alliicola* and *B. gladioli* pv. *gladioli* used 12 biochemical compounds not used by the isolated type of *B. gladioli* pv. *alliicola*. Significant differences were observed between the severity of the disease caused by pigmented and non-pigmented isolates. Considering the CBC isolates, rep-PCR analysis showed high genetic variability among the isolates. The Bayesian inference (IB) analysis performed with the *recA* gene allowed the grouping of 50 isolates selected on the basis of rep-PCR in four clades: clade I composed of 29 isolates that were grouped with the isolates of *B. cenocepacia* lineage IIIB, the clade II consisted of 11 isolates that were grouped with the isolated *B. cenocepacia* lineage IIIA, clade III composed of one isolate (CCRMBC51) that was not clustered with any known species, and the clade IV consisted of 10 isolates that also were not grouped with any known species. The MLSA performed by means of IB with the *recA*, *gyrB*, *atpD*, *gltB*, *lepA*, *trpB* and *phaC* genes, confirmed the results observed with the *recA* gene. MLST analysis allowed the detection of eight sequence types, of these seven were sequences not yet determined. The isolates of the study used 15 biochemical compounds not used by the isolated type of *B. cepacia*. Significant differences were observed between the severity of the disease, and 5 severity groups were observed. Based on the results obtained, a high diversity of *Burkholderia* species was observed, causing the sour skin of onion in the Brazilian semiarid. On the other hand, the prevalent species, *B. cenocepacia* and *B. gladioli*, also presented high genetic variability. These parameters should be taken into account in breeding programs aiming at resistance to disease.

**Key words:** onion sour skin, *B. cepacia* complex, *B. gladioli* pv. *alliicola*

**CAPÍTULO I**  
**Introdução Geral**

---

# DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Burkholderia* CAUSADORAS DE PODRIDÃO EM BULBOS DE CEBOLAS NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. A cultura da cebola

Dentre as várias espécies cultivadas pertencentes ao gênero *Allium*, a cebola (*Allium cepa* L.) é a mais importante quanto ao volume de produção e valor econômico (RESENDE; COSTA, 2007). É a terceira hortaliça mais consumida no mundo (KUNZ et al., 2009; QUARTIERO et al., 2014), ficando atrás apenas do tomate e da batata (EL BALLA et al., 2013).

No Brasil, devido ao volume produzido e a renda gerada, a cebolicultura também apresenta elevado destaque (LEITE, 2014). Nesse contexto, a produção nacional em 2018 foi de aproximadamente 1.660.060 toneladas de cebola, destacando-se os estados de Santa Catarina, Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Goiás, Paraná, Pernambuco, Distrito Federal e Espírito Santo como os principais estados produtores (IBGE, 2018).

A cebola pertence à família *Alliaceae*, classe *Monocotyledones*, ordem *Asparagales* (BOITEUX; MELO, 2016). Até o presente momento persistem dúvidas quanto ao centro de origem dessa hortaliça, pois não foram encontradas espécies selvagens de *A. cepa*. Todavia, a maioria dos botânicos aponta a Ásia Central, que compreende um território relativamente pequeno do Noroeste da Índia (Punjab, Cachemira), todo o Afeganistão, as ex-Repúblicas Soviéticas de Tadjiquistão e de Uzbequistão, e a parte ocidental de Tian-Shan, como o seu provável centro de origem ou primário (KIILL et al., 2007).

Trata-se de uma planta constituída de folhas tubulares ocas, cerosas ou não, pseudocaule, caule subterrâneo e raízes fasciculadas (CHEMELLO, 2005; COSTA; ANDREOTTI, 2002; LISBÃO, 1993). O bulbo, que é a parte da planta que possui valor econômico, é tunicado e formado por folhas bulbares recobertas exteriormente por escamas secas que, dependendo da cultivar, pode apresentar coloração amarela, roxa, vermelha ou branca (LISBÃO, 1993; WASUM; BORDIN e SINIGAGLIA, 2007).

Devido à diversidade climática das diversas regiões do Brasil, a produção de cebola ocorre ao longo de todos os meses do ano, com maior ou menor intensidade, dependendo do estado produtor (TRANI et al., 2014). A região Nordeste tem a vantagem de ser a única região brasileira com condições de ofertar o produto durante todos os meses do ano devido às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da cultura, como temperatura e

fotoperíodo elevados. Isso permite que os produtores programem suas safras para os meses de menor oferta do produto no mercado interno pelas regiões Sul e Sudeste, e conseqüentemente, o produto atinja preços mais elevados devido à menor oferta por essas regiões (ARAÚJO; CORREIA, 2007).

A cebola foi introduzida no final da década de 40 no Nordeste brasileiro, sendo predominantemente produzida no Vale do São Francisco, onde é cultivada durante todo o ano (COSTA et al., 2002). Nessa região, a produção ocorre nos municípios pernambucanos de Belém do São Francisco, Cabrobó, Itacuruba, Floresta, Lagoa Grande, Orocó, Parnamirim, Petrolândia, Petrolina, Salgueiro, Santa Maria da Boa Vista e Terra Nova, e nos municípios baianos de Abaré, Casa Nova, Curaçá, Itaguaçu, Juazeiro e Sento Sé. Fora do Vale do São Francisco, a cebola é produzida no município baiano de Irecê (RESENDE; COSTA, 2007; OLIVEIRA et al., 2016).

A escolha da cultivar a ser utilizada está primariamente condicionada aos requerimentos de fotoperíodo e temperatura necessária ao processo de bulbificação, típicos de cada genótipo e característicos de cada região produtora (MENEZES JUNIOR et al., 2012). Por ter sido amplamente cultivada há bastante tempo em diferentes regiões, existe atualmente uma grande diversidade de cultivares que foram desenvolvidas para atender as preferências regionais (BREWSTER, 2004). Nesse contexto, as cultivares disponíveis no Brasil visam atender às exigências do consumidor brasileiro, que prefere bulbos de tamanho médio (50-90 mm de diâmetro), de formato globular, de catafilos externos de coloração amarela e internos de coloração branca (MELO; BOITEUX, 2001).

No Nordeste, tradicionalmente recomenda-se o plantio das cultivares amarelas Valeouro IPA-11, Pêra IPA-4, Texas Grano 502 PRR, Granex 429, Alfa Tropical e Roxa Franciscana IPA-10 (CANDEIA; SILVA; MENEZES, 2008). No entanto, a adoção de cultivares híbridas associada ao uso de alta tecnologia de produção tem sido responsável pelo aumento de produtividade, especialmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste e em parte do Nordeste (LEITE et al., 2009).

Apesar dessa elevada produção, o Brasil não é autossuficiente e o alto consumo, associado às menores safras em algumas regiões em determinados períodos do ano torna essencial a importação de cebola, principalmente da Argentina, Espanha e Holanda (SCHMITT, 2010). Além disso, a cultura da cebola está sujeita a uma série de doenças que podem causar grandes perdas, tornando-se fatores limitantes ao cultivo se medidas de controle adequadas não forem adotadas (GAVA; TAVARES, 2007).

## 2. Podridão das escamas em cebola

Dentre as doenças que acometem a cebola, as provocadas por bactérias causam grande preocupação econômica (BEER et al., 2012). Nesse contexto, a podridão das escamas causada por diferentes gêneros e espécies de bactérias destaca-se devido aos sérios prejuízos causados (GAVA; TAVARES, 2007). Caracteriza-se como uma doença de ocorrência generalizada, que ocorre tanto no campo quanto na fase de pós-colheita, podendo causar até 50% de danos na produção (WORDELL FILHO; BOFF, 2006).

As diferentes bactérias envolvidas com a doença são *Burkholderia cenocepaea* Vandamme et al. (OLIVEIRA et al., 2017), *B. cepacea* (Palleroni & Holmes) Yabuuchi et al., *B. gladioli* pv. *alliicola* (Burkholder) Young et al., *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (WORDELL FILHO; BOFF, 2006) e *Serratia marcescens* Bizio (MARQUES et al., 1994).

As espécies do gênero *Burkholderia* destacam-se devido elevada diversidade específica que compreende um complexo abrigando diferentes espécies estreitamente relacionadas que são referidas como complexo *B. cepacia* (EBERL; VANDAMME, 2016). Recentemente, Oliveira (2016) relatou que a podridão das escamas no semiárido brasileiro está associada, em sua grande maioria, a espécies do complexo *B. cepacia* ainda não identificadas, *B. gladioli* pv. *alliicola* e *P. aeruginosa*. Adicionalmente, *B. cenocepacia* linhagem IIIB, foi relatada pelo mesmo autor causando a doença na região (OLIVEIRA et al., 2017). Contudo, nenhum estudo sobre a diversidade e prevalência dessas espécies foram realizados.

A sintomatologia da podridão bacteriana pode variar em função da bactéria envolvida. Quando associado a bactérias do complexo *B. cepacia* a doença é chamada de podridão bacteriana das escamas ou camisa d'água, pois está associada às camadas mais externas dos bulbos, com as camadas mais internas permanecendo intactas (MOHAN, 1995). Em inglês, a doença é conhecida como "sour skin" (BURKHOLDER, 1950). Os sintomas causados caracterizam-se como uma podridão viscosa, porém firme, de coloração amarelada a marrom claro, podendo haver a quebra de uma ou poucas escamas internas do bulbo (MOHAN, 1995). As escamas adjacentes às infectadas podem permanecer firme e, embora sejam observadas podridões nas escamas individualmente, todo o bulbo é comprometido (DAVIS et al., 2014; ROBERTS, 2013). Embora externamente os bulbos pareçam saudáveis, a região do pescoço pode

amolecer depois das folhas entrarem em colapso. Em estágios avançados da doença, as escamas saudáveis podem se soltar durante o manuseio (MOHAN, 1995).

Quando a infecção é causada por *B. gladioli* pv. *alliicola* a doença é chamada de podridão escorregadia, pois ocorre nas escamas mais internas ou no centro do bulbo, os quais mostram-se amolecidos e exalam odor sulfuroso. Em inglês, a doença é conhecida como “slippery skin” (VITANOV, 1976). A podridão causada por *B. gladioli* pv. *alliicola* se inicia em uma ou duas escamas mais internas, as quais se mostram amolecidas e com aspecto encharcado. A doença incide sobre o pescoço da cebola e avança para a porção basal do bulbo, sem comprometer as camadas adjacentes. Nos primeiros estágios da doença, os bulbos aparecem normais, porém, quando a base é pressionada, a porção central adoecida é ejetada. Esse sintoma é denominado de pele escorregadia. Posteriormente, as camadas doentes secam e o bulbo encolhe ou apodrece por completo devido à invasão de outras bactérias oportunistas. Os sintomas nas folhas são em forma de mancha necrótica (WORDELL FILHO; BOFF, 2006). Na presente pesquisa, o termo podridão das escamas é utilizado como uma forma generalista para abranger a podridão bacteriana das escamas, causada por espécies do complexo *B. cepacia*, e a podridão escorregadia, causada por *B. gladioli* pv. *alliicola*.

Perdas devido a podridão das escamas em cebola podem ocorrer no armazenamento, mas a infecção geralmente ocorre no campo após a formação do bulbo. O patógeno, presente no solo ou na água de irrigação, invade o tecido do bulbo através de feridas feitas pela remoção dos topos na colheita, ou é lavado das folhas para as escamas do bulbo (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001). Em condições de campo é difícil identificar quem está causando a doença e, em um contexto geral, as podridões das escamas caracterizam-se como uma podridão viscosa de coloração amarelada a marrom claro, firme, podendo haver a quebra de uma ou poucas escamas internas do bulbo (MOHAN, 1995; JACCOUD et al., 1987).

O manejo da podridão das escamas em cebola deve ser realizado de forma preventiva (REIS; HENZ; LOPES, 2015). Por ser um patógeno que penetra por meio de ferimentos, deve-se ter o máximo cuidado nos tratamentos culturais durante o ciclo da cultura e no manuseio de bulbos durante a colheita e no armazenamento, evitando-se qualquer choque que possa comprometer a integridade das escamas ou ferir as folhas próximo ao pescoço (WORDELL FILHO; BOFF, 2006). Também é importante realizar a eliminação de plantas com sintomas no campo, descartar bulbos colhidos que pareçam infectados, colher os bulbos somente no estágio de maturação correto e armazenar os bulbos em baixas temperaturas, com baixa umidade do ar e em locais aerados (ROMEIRO et al., 1993; REIS; HENZ; LOPES, 2015).

### 3. Características do complexo *Burkholderia cepacia*

*Burkholderia cepacia* foi descrita pela primeira vez em 1950 por Burkholder causando podridão bacteriana em escamas de cebola no estado de Nova York, sendo classificada inicialmente como *Pseudomonas cepacia*. Contudo, o epíteto *P. cepacia* perdeu a sua validade após ter sido excluído da “Approved Lists of Bacterial Names” em 1980 (SKERMAN et al., 1980), sendo revivido no ano seguinte por Palleroni e Holmes (1981). Posteriormente, o gênero *Burkholderia* foi proposto para acomodar espécies de *Pseudomonas* que compunham o grupo II de homologia rRNA-DNA (YABUUCHI et al. 1992), ocasião em que *P. cepacia* foi reclassificada como *B. cepacia*. Após seu relato em cebola, os isolados de *B. cepacia* também passaram a ser associados a ambientes clínicos, solo, plantas e água de rio (PALLERONI; HOLMES, 1981; VANDAMME et al., 1997). Além disso, diversos estudos revelaram heterogeneidade considerável entre estes isolados (BEVIVINO et al., 1994; BUTLE et al., 1995; GILLIS et al., 1995; SIMPSON et al., 1994; TABACCHIONI et al., 1995; TYLER et al., 1995; YOHALEM; LORBER, 1994).

A diversidade entre os isolados classificados como *B. cepacia* e a falta de métodos de identificação confiáveis levaram a realização de um estudo taxonômico polifásico que revelou que isolados de *B. cepacia* obtidos a partir pacientes com fibrose cística, de outras amostras clínicas humanas e do ambiente pertenciam a pelo menos cinco espécies genômicas distintas, passando a serem chamadas coletivamente de complexo *B. cepacia* (CBC) (VANDAMME et al., 1997).

O complexo *B. cepacia* é atualmente composto por 22 espécies descritas validamente (MARTINA et al., 2018), que apresentam elevada similaridade entre as sequências dos genes 16S rDNA (98-100%) e *recA* (94-95%), moderados níveis de hibridação DNA-DNA (30-50%) (COENYE et al., 2001) e valores de identidade média de nucleotídeos (average nucleotide identity - ANI) do genoma abaixo de 90% (85,04 a 89,92%) (PEETERS et al., 2013; VANLAERE et al., 2009).

As bactérias do complexo *B. cepacia* apresentam-se em forma de bastonetes, são Gram negativas, aeróbicas, oxidase positiva, possuem células móveis, que medem de 1,6 a 3,2 µm por 8 a 10 µm, com flagelo monotríquico e pertencem ao filo *Proteobacteria*, classe *Betaproteobacteria*, família *Burkholderiaceae* e ao gênero *Burkholderia* (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008). Possuem crescimento ótimo a 37°C, mas podem crescer até 42°C. São resistentes a altas concentrações de sais e diversos

antibióticos (DEUS, 2007). Utilizam diversas fontes de carbono (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008). No entanto, alterações simples nessas fontes podem alterar a morfologia das colônias de espécies do complexo cultivadas em meio sólido (WORDELL FILHO; BOFF, 2006). A camada de lipopolissacarídeo das diferentes bactérias do complexo é ligeiramente diferente de outras bactérias Gram negativas, pois as primeiras apresentam maior nível de toxidez (LEITE, 2009). Adicionalmente, as espécies fitopatogênicas acumulam ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico como material de reserva e não produzem pigmentos fluorescentes (KADO, 2010).

A base para a marcante versatilidade ecológica e nutricional das espécies do complexo *B. cepacia* deve-se a variabilidade genômica. O número de cromossomos, bem como o tamanho do genoma, pode variar entre isolados de uma mesma espécie. Nesse contexto, algumas espécies podem possuir de 2 a 4 cromossomos (geralmente 3) e um ou mais plasmídeos. O tamanho do genoma completo é de 4 a 9 Mb (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001) e essas espécies possuem um grande número de sequências de inserção (sequências de DNA móveis) (CHENG; LESSIE, 1994; LESSIE et al., 1996), o que pode favorecer a frequência de recombinação e mutações genéticas, influenciando a adaptação a diferentes ambientes (RAMETTE; LIPUMA; TIEDJE, 2005).

Dentre as espécies do complexo *B. cepacia*, apenas *B. cepacia* (Burkholder, 1950) e *B. cenocepacia* (OLIVEIRA et al., 2017) foram detectadas causando a podridão das escamas de cebola de forma natural. No entanto, segundo Wordell Filho e Boff (2006), *B. multivorans* Vandamme et al. também pode estar envolvida com a doença. Contudo, essa hipótese ainda carece de comprovação.

*B. cenocepacia* é subdividida quatro linhagens filogenéticas caracterizadas como IIIA, IIIB, IIIC e IIID (VANDAMME et al., 2003). Até o momento, apenas a linhagem IIIB foi associada causando podridão das escamas (OLIVEIRA et al., 2017). Estudos recentes mostraram que *B. cenocepacia* é abundante na rizosfera de várias culturas economicamente importantes (BALANDREAU et al., 2001; FIORE et al., 2001). *B. cenocepacia* abriga isolados virulentos e transmissíveis, que estão associados a alta mortalidade entre pacientes com fibrose cística (MAHENTHIRALINGAM et al., 2001), sendo as linhagens IIIA e IIID as mais encontradas em amostras clínicas (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000; VANDAMME et al., 2003), enquanto a linhagem IIIB é encontrada em ambientes clínicos e habitats naturais, como rizosfera de cebola, banana e milho, bem como no solo (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000; VANDAMME et al., 2003). Por sua vez, a linhagem IIIC foi encontrada apenas no solo até o momento (VANDAMME et al., 2003).

As informações sobre os mecanismos de patogenicidade e virulência das espécies do complexo *B. cepacia* ainda são limitadas (CARVALHO et al., 2007). Sabe-se até o momento que as espécies deste complexo possuem pelo menos um sistema clássico de quorum-sensing (LEITÃO; SOUSA; FERREIRA, 2010) e mais de um tipo de sistema de secreção está presente nas espécies do complexo para a translocação de enzimas, toxinas e demais fatores de patogenicidade e virulência (KADO, 2010). Embora não caracterizado em espécies patogênicas a cebola, o sistema de secreção tipo III está presente em isolados de *B. cepacia* patogênicos a humanos. Essa bactéria abriga um plasmídeo de 92 kb que codifica o sistema de secreção tipo IV. Além disso, um dos cromossomos deste patógeno, que causa sintomas de maceração na cebola também codifica o sistema de secreção tipo IV. Para secretar as enzimas pectinolíticas à superfície celular, essas bactérias usam o sistema de secreção tipo II. Com base na análise de sequências do genoma, *B. cepacia* é equipada também pelo sistema de secreção tipo I, os quais estão envolvidos na secreção de peptídeos, lipídeos, enzimas, toxinas, drogas e produtos metabólicos (KADO, 2010).

#### **4. Características de *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola***

*Burkholderia gladioli* (Severini) Yabuuchi et al. (YABUUCHI et al., 1992), anteriormente *Pseudomonas gladioli* Severini (Severini, 1913), foi originalmente descrita como agente causal de uma doença foliar e do corno em gladiolos (Severini, 1913). Posteriormente, foi relatado por McCulloch (1921) causando doença em gladiolos e em outras flores (por exemplo, espécies da íris), entretanto, o autor chamou-a de *P. marginata*, acreditando que se tratava de um fitopatógeno diferente. Após a avaliação da relação entre *P. gladioli* e *P. marginata*, Hildebrand et al. (1973) observou que ambas espécies eram idênticas e os dois nomes passaram a ser considerados sinônimos, com *P. gladioli* tendo prioridade.

Isolados de *B. gladioli* também tem sido associados a infecções pulmonares humanas, doença granulomatosa crônica (HOARE; CANT, 1996; ROSS et al., 1995) e fibrose cística (BAXTER et al., 1997; CHRISTENSON et al., 1989, KHAN et al., 1996; MORTENSEN et al., 1988; SIMPSON et al., 1994; WELCH et al., 1987).

Dentro de *B. gladioli* existem três patovares reconhecidos como bactérias fitopatogênicas: *B. gladioli* pv. *gladioli*, que causa podridões ou manchas em gladiolo e outras plantas ornamentais, e também em arroz (*Oryza sativa* L.) e açafrão (*Curcuma longa* L.) (BRADBURY, 1986); *B. gladioli* pv. *alliicola*, que causa podridão em bulbos de cebola (YOUNG et al., 1978); e *B. gladioli* pv. *agaricola*, que ocasiona podridão em cogumelos

(GILL, 1995). Um quarto patovar, *B. gladioli* pv. *cocovenenans*, foi proposto para a antiga espécie *B. cocovenenans* (GILLIS et al. 1995) com base em sua produção de toxinas letais responsáveis por intoxicação alimentar grave na China (JIAO et al., 2003). Contudo, essa classificação precisa ser revista, visto que o termo patovar proposto por Young et al. (1978) é designado apenas para agentes etiológicos causadores de doenças em plantas.

*B. gladioli* pv. *alliicola* é frequentemente encontrada em cebolas causando a podridão escorregadia e pode aparecer tanto durante o cultivo, no armazenamento, como no transporte (SOBICZEWSKI; SCHOLLENBERGER, 2002). Está presente em muitas, senão todas as áreas de produção de cebola do mundo (BURKHOLDER, 1950; SCHWARTZ; MOHAN, 2008). A bactéria foi primeiramente relatada como *Phytomonas alliicola* causando podridão em bulbos de cebola no estado de Nova York (EUA) (BURKHOLDER, 1942). Em seguida, a bactéria foi reclassificada como *P. gladioli* pv. *alliicola* (YOUNG et al., 1978). Posteriormente, *P. gladioli* foi reclassificada como *Burkholderia gladioli* (YABUUCHI et al., 1992) e, conseqüentemente, o patógeno passou a ser classificado como *B. gladioli* pv. *alliicola* (BULL et al., 2010). Sua presença em cebola já foi relatada na Europa, Ásia e EUA (LEE et al., 2005; SCHWARTZ; MOHAN, 2008; STOYANOVA et al., 2011; SCHROEDER et al., 2012). No Brasil, já foi oficialmente relatada nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Rio de Janeiro (MALAVOLTA Jr. et al., 2008), Bahia e Pernambuco (OLIVEIRA et al., 2017).

Trata-se de uma bactéria Gram negativa, que penetra nos tecidos das plantas através de feridas, causando podridão nos bulbos da cebola, sem sintomas externos, além do amolecimento do colo de alguns bulbos infectados (BURKHOLDER, 1950). Os sintomas caracterizam-se como uma podridão do tecido, com coloração amarelada, com aspecto encharcado das escamas internas. A infecção normalmente progride das escamas internas em direção ao prato, a partir da qual pode se espalhar para as escamas adjacentes (SCHWARTZ; MOHAN, 2008).

O nome “pele escorregadia” ou podridão escorregadia da cebola é derivado do fato de que as escamas centrais “escorregam” pela parte superior se uma pressão for aplicada à base do bulbo. No entanto, isso nem sempre é evidente em bulbos infectados por *B. gladioli* pv. *alliicola*. Adicionalmente, altas temperaturas e condições de umidade favorecem a doença no campo (SCHWARTZ; MOHAN, 2008).

## 5. Identificação e classificação de espécies *Burkholderia*

Desde o início dos anos 90, uma heterogeneidade marcante entre isolados identificados como *B. cepacia* foi observada usando abordagens de identificação tradicionais e moleculares, incluindo crescimento em meios seletivos, testes bioquímicos clássicos e sistemas de testes bioquímicos comerciais, análise de ácidos graxos de células inteiras e várias técnicas baseadas em PCR (BEVIVINO et al., 1994; BUTLER et al., 1995; GILLIS et al., 1995; SIMPSON et al., 1994; TABACCHIONI et al., 1995; YOHALEM; LORBEER, 1994). Essa heterogeneidade tornou a identificação desses isolados problemática, visto que as técnicas usadas nesse período apresentavam baixa sensibilidade e especificidade (KISKA et al., 1996; LARSEN et al., 1993; LEFF et al., 1995; LIU et al., 1995; SIMPSON et al., 1994; STEAD, 1992).

A diversidade desses isolados e seus efeitos devastadores, em especial aqueles associados a ambientes clínicos, levaram a comunidade científica a desenvolver uma série de abordagens de identificação alternativas para reavaliar o papel das diferentes espécies do complexo *B. cepacia*. Esses métodos incluíam vários novos testes por PCR, análises de polimorfismos no tamanho de fragmentos amplificados de DNA genômico (COENYE et al., 1999) ribotipagem (BRISSE et al., 2004; BRISSE et al., 2000), análise de polimorfismos de fragmentos de restrição de fragmentos de genes amplificados por PCR (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000; SEGONDS et al., 1999; VERMIS et al., 2002) e perfilhamento de tRNA (STORMS et al., 2002). Embora vários desses testes por PCR e outros métodos aparentemente tenham se mostrado úteis para a identificação das espécies do complexo *B. cepacia*, sensibilidade e especificidade de tais testes necessitavam de constante reavaliação devido ao surgimento regular de novos membros do complexo *B. cepacia*.

Os métodos para a identificação das espécies que compõem o complexo *B. cepacia* devem distinguir esses organismos de uma variedade de bactérias Gram negativas e, se possível, permitir a discriminação entre as espécies do complexo. Além disso, os métodos de identificação devem ser relativamente rápidos e fáceis de serem realizados devido a relevância clínica, desses organismos e o número relativamente grande de isolados envolvidos (COENYE et al., 2001; VANDAMME et al., 2007).

Desde o conhecimento da baixa resolução taxonômica do gene 16S rRNA para a diferenciação de espécies do complexo *B. cepacia*, Mahenthiralingam et al. (2000) exploraram a utilidade do gene *recA* para identificação dessas espécies. Inicialmente, estudos de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição do gene *recA* (*recA*-RFLP)

mostraram-se muito promissores como uma abordagem de identificação simples, rápida, barata e precisa para bactérias do complexo *B. cepacia* (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000). De maneira semelhante, a espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (matrix associated laser desorption-ionization-time of flight - MALDI-TOF MS) também mostrou-se útil para identificação rápida e barata (MARKO et al. 2012; SAUGET et al. 2017), permitindo a identificação com sucesso da maioria das espécies do complexo (DEGAND et al. 2008; VANLAERE et al. 2008; LAMBIASE et al. 2013). No entanto, ambas as identificações *recA*-RFLP e MALDI-TOF MS baseiam-se na comparação com padrões previamente conhecidos e não identificam novos isolados (PAYNE et al. 2005; SUTTISUNHAKUL et al. 2017).

O gene codificador de proteínas *recA*, essencial para a recombinação e reparo do DNA, tem sido muito utilizado para identificação de espécies do gênero *Burkholderia*, pois sua sequência de nucleotídeos exibe as mutações existentes entre essas espécies (CUCCUI et al., 2007). Além disso, o gene *recA* também tem sido utilizado para analisar a variabilidade de isolados de *B. cenocepacia*, subdividindo-os em quatro linhagens (IIIA, IIIB, IIIC e IIID) (VANDAMME et al. 2003).

As abordagens baseadas no uso de sequências multilocus surgiram como ferramentas poderosas e objetivas que se mostraram úteis para fins de identificação e classificação dessas espécies (VANDAMME; DAWYNDT, 2011). Dentre as análises das sequências multilocus, a tipagem de sequência multilocus (MLST) é um método usado para auxiliar na identificação das espécies, bem como para evitar uma discriminação equivocada de espécies do complexo *B. cepacia* e facilitar as investigações epidemiológicas desse grupo de bactérias (BALDWIN et al., 2005; BALDWIN et al., 2008). A técnica que foi criada por Maiden et al. (1998) e melhorada por Baldwin et al. (2005), tendo sido proposta como uma ferramenta capaz de superar os problemas de reprodutibilidade interlaboratoriais enfrentados nas metodologias de tipagem tradicionais. Essa metodologia se baseia no sequenciamento de alguns genes essenciais ou de manutenção, os chamados genes *housekeeping*. A técnica analisa o polimorfismo de nucleotídeos em sete genes *housekeeping* (*atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC* e *trpB*) (BALDWIN et al., 2005).

Após o sequenciamento, as sequências são depositadas em um banco de dados online, sendo cada sequência correspondente a um alelo. Sequências diferentes são consideradas alelos diferentes daquele gene e recebem arbitrariamente um número para identificação daquele alelo (MAIDEN et al., 1998; URWIN; MAIDEN, 2003). O conjunto de alelos de cada amostra bacteriana dá origem ao “sequence typing” (ST) que é utilizado para análises

filogenéticas, populacionais e evolucionárias (MAIDEN et al., 1998; URWIN; MAIDEN, 2003).

MLST tem as vantagens de ser uma técnica altamente reprodutível e menos sujeita a erros humanos em comparação a outras metodologias, além da grande vantagem de seus resultados poderem ser disponibilizados em bancos de dados específicos e compartilhados online, o que possibilita a análise comparativa da diversidade genética de bactérias isoladas em diferentes partes do mundo (MAIDEN et al., 1998). Segundo Voronina et al. (2013) a solução do problema da identificação de espécies do complexo *B. cepacia* foi favorecida pelo desenvolvimento do método MLST. A aplicação da abordagem para análise da taxonomia do complexo *B. cepacia* não só permitiu a diferenciação de espécies no complexo, mas também de isolados dentro de espécies (BALDWIN et al., 2005). Spilker et al. 2009, também utilizando MLST, permitiu a diferenciação de espécies adicionais, que foram incluídas no complexo. Embora vários protocolos tenham sido desenvolvidos para discriminar espécies individuais (DREVINEK et al., 2010; MAHENTHIRALINGAM et al., 2000; MOORE et al., 2002), MLST provou ser um dos poucos métodos que tem mantido o ritmo com a complexidade crescente de espécies do complexo *B. cepacia*.

Adicionalmente, a análise da sequência multilocus (MLSA), que se baseia no alinhamento de multilocus das regiões utilizadas pela MLST, também tem sido amplamente utilizada para identificação e relações filogenéticas entre isolados do complexo *B. cepacia* (PEETERS et al., 2013; VANLAERE et al., 2009), sendo considerada uma análise mais adequada para separação de espécies (CHRISTENSEN et al., 2007).

Assim como na MLST, na MLSA as sequências são comparadas por similaridade e, além disso, a análise filogenética é realizada com base em matrizes de similaridade ou diretamente a partir das sequências (CHRISTENSEN et al., 2007). Schleifer (2009) declarou que árvores filogenéticas baseadas em sequências concatenadas por MLSA poderiam ser usadas para elucidar ramos profundamente ramificados. Tindall et al. (2010) também enfatizou o potencial da MLSA com base em genes *housekeeping* em complementar as análises de hibridização DNA-DNA (HDD) e 16S rRNA para análises taxonômicas ao nível da espécie. Vandamme e Peeters (2014) descreveram a técnica MLSA como um método que também revela semelhanças entre isolados que representam diferentes espécies e gêneros. Além disso, os autores ilustram o potencial dos dados MLSA, que podem ser obtidos a partir de coleções de banco de dados do MLST para a identificação de novas espécies potenciais.

Dos sete loci que têm sido utilizados as análises MLST e MLSA (PEETERS et al., 2013; SPILKER et al., 2009; VANLAERE et al., 2009), *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA* e *phaC*

localizam-se no maior cromossomo contido nas espécies do CBC, o qual aparentemente abriga a maioria dos genes *housekeeping*. O sétimo locus remanescente (*trpB*) localiza-se no segundo maior cromossomo e tem sido utilizado para assegurar que o esquema englobe a diversidade dentro de outros replicons do cromossomo do CBC. As localizações cromossômicas de todos esses loci foram confirmadas por análise de bioinformática da sequência do genoma J2315 (NC\_004503 [[http://www.sanger.ac.uk/Projects/B\\_cenocepacia/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_cenocepacia/)]). Como estes esquemas usam múltiplos loci em suas análises, um maior grau de variação e, portanto, melhor resolução para a tipagem, inferência da relação evolutiva e epidemiológica dos membros do CBC pode ser obtido quando realizados apenas com base em apenas um único locus (BALDWIN et al., 2005).

Isolamentos realizados a partir de amostras de cebola com podridão das escamas coletadas nas principais regiões produtoras de cebola dos estados da Bahia e Pernambuco demonstraram que a grande maioria dos isolados pertenceram ao gênero *Burkholderia*, mais especificamente a espécies não identificadas do complexo *B. cepacia* e *B. gladioli* pv. *alliicola* (OLIVEIRA, 2016). Além disso, a primeira ocorrência de *B. cenocepacia* (pertencente ao complexo *B. cepacia*) causando podridão das escamas foi realizada nesses estados (OLIVEIRA et al., 2017), sugerindo que outras espécies do complexo *B. cepacia* também podem estar causando a doença. Diante do exposto, os objetivos dessa pesquisa foram estudar a diversidade dos isolados do gênero *Burkholderia* causadores de podridão das escamas em cebola no semiárido nordestino por meio de uma caracterização polifásica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. L. P.; CORREIA, R. C. **Cultivo da cebola no Nordeste: economia.**

EMBRAPA. 2007. Disponível

em:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/custos.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BALANDREAU, J.; VIALARD, V.; COURNOYER, B.; COENYE, T.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 982–985. 2001

BALDWIN, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; DREVINEK, P.; POPE, C.; WAINE, D. J.; HENRY, D. A.; SPEERT, D. P.; CARTER, P.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J.; DOWSON, C. G. Elucidating global epidemiology of *Burkholderia multivorans* in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, p. 290–295. 2008.

BALDWIN, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; THICKETT, K. M.; HONEYBOURNE, D.; MAIDEN, M. C.; GOVAN, J. R.; SPEERT, D. P.; LIPUMA, J. J. VANDAMME P.; DOWSON, C.G. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, p. 4665–4673. 2005.

BAXTER, I. A.; LAMBERT, P. A.; SIMPSON, I. N. M. Isolation from clinical sources of *Burkholderia cepacia* possessing characteristics of *Burkholderia gladioli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 39, p.169–175. 1997.

BEER, S. V.; ASSELIN, J. E.; BONASERA, J. M.; ZAID, A. M.; HOEPTING, C. A. Research yields greater understanding of bacterial diseases of onion in New York. **Onion World**, New York, v. 1, p. 18–23. 2012.

BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; CARUSI, M. V.; DELGALLO, M.; VISCA, P. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. **Microbiology**, Reading, v. 140, p. 1069–1077. 1994.

BOITEUX, L. S.; MELO, P. C. T. **Cultivo da cebola: taxonomia e origem**. EMBRAPA.

2001. Disponível em:

<[http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/sistemas\\_producao/cultivo\\_da\\_cebola/taxonomia\\_e\\_origem.htm](http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/taxonomia_e_origem.htm)>. Acesso em: 20 jan. 2018.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. London: C.A.B. 1986. 332p.

BREWSTER, J. L. **The classification, origins, distribution and economic importance of the major vegetable crops**. In: BREWSTER JL (ed.). Onions and other vegetable alliums. Wallingford: CABI International. 2004. p. 1-22.

BRISSE, S.; CORDEVANT, C.; VANDAMME, P.; BIDET, P.; LOUKIL, C.; CHABANON, G.; LANGE, M.; BINGEN, E. Species distribution and ribotype diversity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from French patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, p. 4824–4827. 2004.

BRISSE, S.; VERDUIN, C. M.; MILATOVIC, D.; FLUIT, A.; VERHOEF, J.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P.; TUMMLER, B.; VERBRUGH, H. A.; BELKUM, A. Distinguishing species of the *Burkholderia cepacia* complex and *Burkholderia gladioli* by automated ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 1876–1884. 2000.

BULL, C.T.; DE BOER, S.H.; DENNY, T.P.; FIRRAO, G.; FISCHER-LE SAUX, M.; SADDLER, G.S.; SCORTICHINI, M.; STEAD, D. E.; TAKIKAWA, Y. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. *Journal of Plant Pathology*, Switzerland, v. 92, n. 3, p. 551-592. 2010.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, p. 115-118. 1950.

BUTLER, S. L.; DOHERTY, C. J.; HUGHES, J. E.; NELSON, J. W.; GOVAN, J. R. W. *Burkholderia cepacia* and cystic-fibrosis – do natural environments present a potential hazard. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 1001–1004. 1995.

CANDEIA, J. A.; SILVA, M. C. L.; MENEZES, J. T. **Cultura da cebola**. Recife: IPA. 2008. 1 p. (Boletim técnico 25).

CARVALHO, A. P.; VENTURA, G. M.; PEREIRA, C. B.; LEÃO, R. S.; FOLESCO, T. W.; HIGA, L.; TEIXEIRA, L. M.; PLOTKOWSKI, M. C.; MERQUIOR, V. L.; ALBANO, M. R.; MARQUES, E. A. *Burkholderiacenocepacia*, *B. multivorans*, *B. ambifaria* and *B. vietnamiensis* isolates from cystic fibrosis patients have different profiles of exoenzyme production. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Kobenhavn, v. 115, n. 4, p. 8- 311, 2007.

CHEMELLO, E. **A Química na Cozinha apresenta: As cebolas**. Revista Eletrônica ZOOM da Editora Cia da Escola - São Paulo, v. 6, n. 2, 2005. Disponível em: <[http://www.quimica.net/emiliano/artigos/2005jun\\_qnc\\_cebola.pdf](http://www.quimica.net/emiliano/artigos/2005jun_qnc_cebola.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2018.

CHENG, H. P.; LESSIE, T. G. Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 4034–42. 1994.

CHRISTENSEN, H.; KUHNERT, P.; BUSSE, H. J.; FREDERIKSEN, W. C.; BISGAARD, M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. **International Journal of Systematic Microbiology**, Berks, v. 57, p. 166-178. 2007.

CHRISTENSON, J. C.; WELCH, D. F.; MUKWAYA, G.; MUSZYNSKI, M. J.; WEAVER, R. E.; BRENNER, D. J. Recovery of *Pseudomonas gladioli* from respiratory tract specimens of patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, p. 270–273. 1989.

COENYE, T.; SCHOULS, L. M.; GOVAN, J. R.; KERSTERS, K.; VANDAMME, P. Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting. **International Journal of Systematic Microbiology**, Berks, v. 49, p. 1657–1666. 1999.

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, J. J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 3427-3436. 2001.

COSTA, N. D.; ANDREOTTI, C. M. **A cultura da cebola**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2002. 107p.

CUCCUI, J.; EASTON, A.; CHU, K. K.; BANCROFT, G. J.; OYSTON, P. C. F.; TITBALL, R. W.; WREN, B. W. Development of signature-tagged mutagenesis in *Burkholderia pseudomallei* to identify genes important in survival and pathogenesis. **Infection and Immunity**, Washington, 75, 1186–1195. 2007.

DAVIS, R. M.; AEGERTER, B. J.; LAEMMLEN, F. F.; VOSS, R. E. **Onion and garlic, bacterial soft rot, Pathogens: *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Pseudomonas gladioli*, and *Enterobacter cloacae***. California: University of California – UC Pest Management Guidelines, 2014. Disponível em:  
<<http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r584100811.html>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

DEGAND, N.; CARBONNELLE, E.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J. L.; LE BOURGEOIS, M.; SERMET-GAUDELUS, I.; SEGONDS, C.; BERCHE, P.; NASSIF, X.; FERRONI, A. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, p. 3361–3367. 2008.

DEUS, M. F. **Purificação parcial de proteínas antimicrobianas secretadas pela bactéria *Burkholderia cepacia***. 2007, 49 f. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2007.

DREVINEK, P.; BALDWIN, A.; LINDENBURG, L. Oxidative stress of *Burkholderia cenocepacia* induces insertion sequence-mediated genomic rearrangements that interfere with macrorestriction-based genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, p. 34 – 40, 2010.

EBERL, L.; VANDAMME, P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. **F1000Research**, London, v. 5, p. 1007-1017. 2016.

EL BALLA, M. M. A.; HAMID, A. A.; ABDELMAGEED, A. H. A. Effects of time of water stress on flowering, seed yield and seed quality of common onion (*Allium cepa* L.) under the arid tropical conditions of Sudan. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 121, p.149-157. 2013.

GAVA, C. A. T.; TAVARES, S. C. C. H. **Cultivo da cebola no nordeste: doenças**. EMBRAPA. 2007. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/doencas.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

GILL, W. M. Bacterial diseases of *Agaricus* mushrooms. **Reports of the Tottori Mycological Institute**, Utrecht, v. 33, p. 34-55. 1995.

GILLIS, M.; VANVAN, T.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 45, p. 274–289. 1995.

HILDEBRAND, D. C.; PALLERONI, N. J.; DOUDOROFF, M. Synonymy of *Pseudomonas gladioli* Severini 1913 and *Pseudomonas marginata* (McCulloch 1921) Stapp 1928. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 23, p. 433-437.1973.

HOARE, S.; CANT, A. J. Chronic granulomatous disease presenting as severe sepsis due to *Burkholderia gladioli*. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 23, p. 411. 1996.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. **Estatística da Produção Agrícola**. BRASIL, 2018. Disponível em:

[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag\\_2017\\_dez.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2017_dez.pdf). Acesso em 18 de nov, 2018.

JACCOUD FILHO, D. S.; ROMEIRO, R. S.; KIMURA, O.; ZAMBOLIM, L.; SOUZA, R. M. Podridão bacteriana da escama – uma nova doença da cebola em Minas Gerais.

**Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.12, p.395-396. 1987.

JIAO, Z.; KAWAMURA, Y.; MISHIMA, N.; YANG, R.; LI, N.; LIU, X.; EZAKI, T. Need to differentiate lethal toxin-producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food poisoning: description of *B. gladioli* pathovar *cocovenenans* and an emended description of *B. gladioli*. **Microbiology and Immunology**, New Jersey, 7, 915–925. 2003.

KADO, C. I. **Classification of plant-patogenic Bacteria**. In: \_\_\_\_\_. Plant Bacteriology. Saint Paul, 2010, p. 21 – 62.

KHAN, S. U.; GORDON, S. M.; STILLWELL, P. C.; KIRBY, T. J. ARROLIGA, A. C. Empyema and bloodstream infection caused by *Burkholderia gladioli* in a patient with cystic fibrosis after lung transplantation. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 15, p. 637–639. 1996.

KIILL, L. H. P.; RESENDE, G. M.; SOUZA, R. J. **Cultivo da cebola no nordeste: doenças**. EMBRAPA, 2007. Available in:  
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/doencas.htm>> Access in: 23 jan. 2018.

KISKA, D. L.; KERR, A.; JONES, M.; CARACCILO, J. A.; ESKRIDGE, B.; JORDAN, M.; MILLER, S.; HUGHES, D.; KING, N.; GILLIGAN, P. H. Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other Gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 34, 886–891. 1996.

KUNZ, V. L.; SIRTOLI, L. F.; FURLAN, L.; POLETTI, L.; PRIMO, M. A.; RODRIGUES, J. D. Produtividade de cebola sob diferentes fontes e modos de aplicação de adubos nitrogenados em cobertura. **Revista Biodiversidade**, Campo Grande, v. 8, p. 31-37. 2009.

LAMBIASE, A.; DEL PEZZO, M.; CERBONE, D.; RAI, R.; ROSSANO, F.; CATANIA, M. R. Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 95, p.145–149. 2013.

LARSEN, G. Y.; STULL, T. L.; BURNS, J. L. Marked phenotypic variability in *Pseudomonas cepacia* isolated from a patient with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, p. 788–792. 1993.

LEE, C. J.; LEE, J. T.; KWON, J. H.; KIM, B. C.; PARK, W. Occurrence of bacterial soft rot of onion plants caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* in Korea. **Australasian Plant Pathology**, Heidelberg, v. 34, p. 287-292. 2005.

LEE, Y. A.; CHAN, C. W. Molecular typing and presence of genetic markers among strains of banana finger-Tip rot pathogens, *Burkholderia cenocepacia*, in Taiwan. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 97, n. 2, p. 195-201. 2007.

LEFF, L. G.; KERNAN, R. M.; MCARTHUR, J. V.; SHIMKETS, L. J. Identification of aquatic *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* by hybridization with species specific ribosomal RNA geneprobos. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1634–636. 1995.

LEITE, D. L. **Produção de Sementes de Cebola**. Pelotas: Embrapa Clima temperado - 2014. 9 p. (EMBRAPA Clima Temperado. Circular técnica, 142).

LEITE, F. C. **Variantes genômicas do complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística no hospital das Clínicas em Porto Alegre**. 2009, 65f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LEITÃO, J. H.; SOUSA, A.; FERREIRA, A. S. Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. **Applied Microbiology Biotechnology**, Wolverhampton, v. 87, n. 1, p.31-40, 2010.

LESSIE, T. G.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B. D.; DEVEREUX, R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 144, p. 117–128. 1996.

LISBÃO, R. S. **Cebola**. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. P. O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico. Campinas: Instituto Agronômico. 1993. v. 1. p. 254-269.

LIU, P. Y. F.; SHI, Z. Y.; LAU, Y. J.; HU, B. S.; SHYR, J. M.; TSAI, W. S.; LIN, Y. H.; TSENG, C. Y. Comparison of different PCR approaches for characterization of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 3304–3307. 1995.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1539-1551. 2008.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BISCHOF, J.; BYRNE, S. K.; RADOMSKI, C.; DAVIES, J. E.; AV-GAY, Y.; VANDAMME, P. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 3165–3173. 2000.

MAHENTHIRALINGAM, E.; COENYE, T.; CHUNG, J. W.; SPEERT, D. P.; GOVAN, J. R.; TAYLOR, P.; VANDAMME, P. Diagnostically and experimentally useful panel of strains from the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 910–913. 2000.

MAHENTHIRALINGAM, E.; VANDAMME, P.; CAMPBELL, M. E.; HENRY, D. A.; GRAVELLE, A. M.; WONG, L. T.; DAVIDSON, A. G.; WILCOX, P. G.; NAKIELNA, B.; SPEERT, D. P. Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, 33,1469-75. 2001.

MAIDEN, M. C. J.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, Q.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, Washington, v. 95, n. 6, p. 3140-3145. 1998.

MALAVOLTA JR.; V. A.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. 9-88. 2008.

MARKO, D. C.; SAFFERT, R. T.; CUNNINGHAM, S. A.; HYMAN, J.; WALSH, J.; ARBEFEVILLE, S.; HOWARD, W.; PRUESSNER, J.; SAFWAT, N.; COCKERILL, F. R.; BOSSLER, A. D.; PATEL, R.; RICHTER, S. S. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, p. 2034–9. 2012.

MARQUES, A. S. A.; ROBBS, C. F.; BOITEUX, L. S.; PARENTE, P. M. **Índice de fitobacterioses assinaladas no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 65p.

MARTINA, P.; LEGUIZAMON, M.; PRIETO, C. I.; SOUSA, S. A.; MONTANARO, P.; DRAGHI, W. O.; STÄMMLER, M.; BETTIOL, M.; CARVALHO, C. C. C. R.; PALAU, J.; FIGOLI, C.; ALVAREZ, F.; BENETTI, S.; LEJONA, S.; VESCINA, C.; FERRERAS, J.; LASCH, P.; LAGARES, A.; ZORREGUIETA, A.; LEITÃO, J. H.; YANTORNO, O. M.; BOSCH, A. *Burkholderia puraquae* sp. nov.; a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 68, p. 14-20. 2018.

MCCULLOCH, L. A bacterial disease of gladiolus. **Science**, Washington, v. 54, p.115–116. 1921.

MELO, P. C. T.; BOITEUX, L. S. **Análise retrospectiva do melhoramento genético de cebola (*Allium cepa* L.) no Brasil e potencial aplicação de novas estratégias**

**biotecnológicas.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1.; 2001, Goiânia. Anais... Goiânia: SBMP, 2001.

MENEZES JÚNIOR, F. O. G.; VIEIRA NETO, J. Produção da cebola em função da densidade de plantas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 733-739. 2012.

MOHAN, S. K. **Leaf streak and bulb rot.** In: H. F.; MOHAN, S. K. (Eds). Compendium of onion and garlic diseases. Saint Paul: APS. 1995. v. 2., 31 p.

MOORE, J. E.; XU, B. C.; MILLAR, M. C.; ELBORN, J. S. Improved molecular detection of *Burkholderia cepacia* genomovar III and *Burkholderia multivorans* directly from sputum of patients with cystic fibrosis. **Journal of Microbiological Methods**, Guelph, v. 49, p. 183–191. 2002.

MORTENSEN, J. B.; SCHIDLOW, D. V.; STAHL, E. M. *Pseudomonas gladioli (marginata)* isolated from a patient with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Newsletter*, New York, v. 10, p. 29–30. 1988.

OLIVEIRA, W. J. **Etiologia da podridão de escama da cebola no semiárido brasileiro.** 2016, 58 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

OLIVEIRA, W. J.; SILVA, W. A.; SILVA, A. M. F.; CANDEIA, J. A.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; GAMA, M. A. S. First report of *Burkholderia cenocepacia* causing sour skin of onion (*Allium cepa*) in Brazil. **Plant disease**, Saint Paul, v. 101, p. 1950. 2017.

PALLERONI, N. J. *Pseudomonas solanacearum* (Smith 1896) Smith 1914. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (eds), **Bergey's manual of systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins, Baltimore/London. 1984. v. 1, p. 177-178.

PALLERONI, N. J.; HOLMES, B. *Pseudomonas cepacia* sp. nov, nom. rev. **International Journal of Systematic Microbiology**, Berks, v. 31, p. 479–481. 1981.

PARCKER, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 225-258. 2001.

PAYNE, G. W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S. H.; LIPUMA, J. J.; COENYE, T.; WEIGHTMAN, A. J.; JONES, T. H.; MAHENTHIRALINGAM, E. Development of a recA gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 3917–27. 2005.

PEETERS, C.; ZLOSNIK, J. E. A.; SPILKER, T.; TREVOR J.; HIRD, T. J.; LIPUMA, J. J.; VANDAMME, P. *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov.; a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 36, p. 483–489. 2013.

QUARTIERO, A.; FARIA, M. V.; RESENDE, J. T. V.; FIGUEIREDO, A. S. T.; CAMARGO, L. K. P.; SANTOS, R. L.; KOBORI, R. F. Desempenho agrônômico, heterose e estabilidade fenotípica de genótipos de cebola em Guarapuava. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 259-266. 2014.

RAMETTE, A.; LIPUMA, J. J.; TIEDJE, J. M. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 3, p. 201-1193, 2005.

REIS, A.; HENZ, G. P.; LOPES, C. A. **Cultivo da cebola: doenças**. Disponível em: <[http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas\\_producao/cultivo\\_da\\_cebola/doencas.tm](http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/doencas.tm)> Acesso em: 04 dez. 2018.

RESENDE, G. M.; COSTA, N. D. **Cultivo de cebola do nordeste: socioeconomia**. EMBRAPA, 2007. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

ROBERTS, S. Bacterial storage rots in onion caused by *Burkholderia gladioli* pv. *aliicola*. Warwick: **Plant Health Solution**, 2013. Disponível em:

<[http://www.planthealth.co.uk/downloads/Bga\\_Onions\\_Poster\\_2013\\_A4.pdf](http://www.planthealth.co.uk/downloads/Bga_Onions_Poster_2013_A4.pdf)>. Acesso em: 18 jan. 2019.

ROMEIRO, R. S. **Doenças causadas por bactérias em alho e cebola**. In: ZAMBOLIM, L.; VALE F. X. R.; COSTA, H (Ed.). Controle de doenças de plantas hortaliças. Viçosa: Editora UFV, 2000. v. 1, p. 43–81

ROSS, J. P.; HOLLAND, S. M.; GILL, V. J.; DECARLO, E. S.; GALLIN, J. I. Severe *Burkholderia (Pseudomonas) gladioli* infection in chronic granulomatous disease: report of two successfully treated cases. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 21, p. 1291–1293. 1995.

SAUGET, M.; VALOT, B.; BERTRAND, X.; HOCQUET, D. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 25, p. 447–455. 2017.

SCHLEIFER, K. H. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 32, p. 533–542. 2009.

SCHMITT, D. R. **Cebola**: produção e mercado nacional. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina - 2010-2011. Santa Catarina, SC. 2010.

SCHROEDER, B. K.; HUMANN, J. L. Effects of post harvest onion curing parameters on the development of sour skin and slippery skin in storage. **Plant disease**, Saint Paul,

SCHWARTZ, H. F.; MOHAN, S. K. In: **Compendium of Onion and Garlic Diseases and Pests**, Second Edition. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 2008. p. 44-45.

SEGONDS, C.; HEULIN, T.; MARTY, N.; CHABANON, G. Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 2201–2208. 1999.

SEMENIUK, G.; MELTHUS, I. E. **Botany and plant pathology section**. Republic Iowa Agricultural Experiment Station 1942- 1943. 1943, p. 125-145.

SIMPSON, I. N.; FINLAY, J.; WINSTANLEY, D. J.; DEWHURST, N.; NELSON, J. W.; BUTLER, S. L.; GOVAN, J. R. W. Multi-resistance isolates possessing characteristics of both *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* and *Burkholderia gladioli* from patients with cystic fibrosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Chemother. v. 34, p. 353–361. 1994.

SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 30, p. 225–420. 1980.

SOBICZEWSKI, P.; SCHOLLENBERGER, M. **Bacterial diseases of horticultural plants**. Manual for students. PWRiL, Warsaw, Poland. 2002. p. 54-67.

SOUZA, R. J.; RESENDE, G. M. **Cultura da cebola**. Lavras: UFLA, 2002. 115 p. (Textos Acadêmicos - Olericultura, 21).

SPIPKER, T.; BALDWIN, A.; BUMFORD, A.; DOWSON, C. G.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J. J. Expanded Multilocus Sequence Typing for *Burkholderia* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 8, p. 2607–2610. 2009.

STARR, M. P.; BURKHOLDER, W. H. Lipolytic activity of phytopathogenic bacteria determined by means of spirit blue agar and its taxonomic significance. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 32, p. 598-604. 1942.

STEAD, D. E. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 42, p. 281–295. 1992.

STORMS, V.; VAN DEN VREKEN, N.; COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J. J.; GILLIS, M.; VANDAMME, P. Polyphasic characterisation of *Burkholderia cepacia* like isolates leading to the emended description of *Burkholderia pyrrocinia*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 517–526. 2004.

STOYANOVA, M.; KIZHEVA, Y.; CHIPEVA, V.; BOGATZEVSKA, N.; MONCHEVA, P. Phytopathogenic *Burkholderia* species in bulb plants in Bulgaria. **Biotechnology and Biotechnology Equipment**, London, v. 25, p. 2477-2483. 2011.

SUTTISUNHAKUL, V.; PUMPUANG, A.; EKCHARIYAWAT, P.; WUTHIEKANUN, V.; ELROD, M. G.; TURNER, P.; CURRIE, B. J.; PHETSOUVANH, R.; DANCE, D. A.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; PEACOCK, S. J.; CHANTRATITA, N. Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Burkholderia pseudomallei* from Asia and Australia and differentiation between *Burkholderia* species. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 4, p. 1-16. 2017.

TABACCHIONI, S.; VISCA, P.; CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DISERIO, C.; FANCELLI, S.; FANI, R. Molecular characterisation of rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 146, p. 531–542. 1995.

TINDALL, B. J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H. J.; LUDWIG, W.; KÄMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic Microbiology**, Berks, v. 60, p. 249–266. 2010.

TRANI, P. E.; JÚNIOR, J. M. B.; FACTOR, T. L. Calagem e adubação da cebola (*Allium cepa* L.). Instituto Agrônomo de Campinas, 2014. Available in: <[http://www.iac.sp.gov.br/imagem\\_informacoestecnologicas/95.pdf](http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/95.pdf)>. Access in: 29 jun. 2018.

TYLER, S. D.; STRATHDEE, C. A.; ROZEE, K. R.; JOHNSON, W. M. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic pseudomonads on the basis of the sequence of genes coding for 16S–23S rRNA internal transcribed spacers. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Maryland, 2:448–453. 1995.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, Cambridge v. 11, n. 10, p. 479-87. 2003.  
v. 96, p. 1548-1555. 2012.

VANDAMME, P.; DAWYNDT, P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, Freising, v. 34, p. 87–95. 2011.

VANDAMME, P.; GOVAN J. R. W.; LIPUMA, J. J. Diversity and role of *Burkholderia* spp.; In: COENYE, T.; VANDAMME, P. A. R. (eds.). *Burkholderia* genomics. **Horizon Scientific Press**, Norwich, United Kingdom. 2007. p. 1-28.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; COENYE, T.; GORIS, J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J. J.; GOVAN, J. R. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. – a new twist to an old story. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, p. 91–96. 2003.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; COENYE, T.; GORIS, J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J. J.; GOVAN, J. R. W. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. – a new twist to an old story. **Research in Microbiology**, Amsterdam, 154: 91–96. 2003.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; HOSTE, B.; COOPMAN, R.; REVETS, H.; LAUWERS, S.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; GOVAN, J. R. W. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 47, p.1188–1200. 1997.

VANDAMME, P.; PEETERS, C. Time to revisit polyphasic taxonomy. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 106, n.1, p. 57-65. 2014.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; LI-PUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D. P.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. Táxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 102–111. 2009.

VANLAERE, E.; SERGEANT, K.; DAWYNDT, P.; KALLOW, W.; ERHARD, M.; SUTTON, H.; DARE, D.; DEVREESE, B.; SAMYN, B.; VANDAMME, P. Matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry of intact cells allows rapid

identification of *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 279–286. 2008.

VERMIS, K.; VANDEKERCKHOVE, C.; NELIS, H. J.; VANDAMME, P. A. Evaluation of restriction fragment length polymorphism analysis of 16 Sr DNA as a tool for genomovar characterisation within the *Burkholderia cepacia* complex. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 214, p. 1–5. 2002.

VITANOV, M. **Influence of the harvest date and storage conditions on the slippery skin (*Pseudomonas alliicola* Burk.) infection of onions bulbs**. In: Gradinarska i Lozarska Nauka (Eds). Principles of Plant Pathology, Cambridge, v.2, 13, 63–71. 1976.

VITANOV, M. **Slippery skin of onion caused by *Pseudomonas alliicola* Burkholder**. In: Gradinarska i Lozarska Nauka (Eds). Principles of Plant Pathology, Cambridge, 56: v. 1, 665. 1977.

VORONINA, O. L.; CHERNUKHA, M.; YU, M.; SHAGINYAN, I. A.; KUNDA; M. S.; AVETISYAN, L. R.; ORLOVA, A. A.; LUNIN, V. G.; AVAKYAN, L. V.; KAPRANOV, N. I.; AMELINA, E. L.; CHUCHALIN, A. G.; GINTSBURG, A. L. Characterization of Genotypes for *Burkholderia cepacia* Complex Strains Isolated from Patients in Hospitals of the Russian Federation. **Molecular Genetics, Microbiology and Virology**, Moscow, v. 28, n. 2, p. 64–73. 2013.

WASUM, R. A.; BORDIN, J.; SINIGAGLIA, C. **Considerações taxonômicas**. In: BARBIERI, R.L. (Ed.). Cebola: ciência, arte e história. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2007. p. 23-26.

WELCH, D. F.; MUSZYNSKI, M. J.; PAI, C. H.; MARCON, M. J.; HRIBAR, M. M.; GILLIGAN, P. H.; MATSEN, J. M.; AHLIN, P. A.; HILMAN, B. C.; CHARTRAND, S. A. Selective and differential medium for recovery of *Pseudomonas cepacia* from the respiratory tracts of patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 25, p. 1730–1734. 1987.

WORDELL FILHO, J. A.; BOFF, P. **“Doenças de origem parasitária”** In: WORDELL FILHO, J. A.; ROWE, E.; GONÇALVES, P. A. S.; DEBARBA, J. F.; BOFF, P.;

THOMAZELLI, L. F. Manejo fitossanitário da cebola. Florianópolis: EPAGRI, 2006. p. 19 - 126.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group-II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Amsterdam, v. 36, p. 1251-1275. 1992.

YOHALEM, D. S.; LORBEER, J. W. Multilocus isoenzyme diversity among strains of *Pseudomonas cepacia* isolated from decayed onions, soils, and clinical sources. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 17, p. 116–124. 1994.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 21, p. 153-177. 1978.

YUTIN, N.; PUIGBO, P.; KOONIN, E. V.; WOLF, Y. I. Phylogenomics of prokaryotic ribosomal proteins. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, p. 1-10. 2012.

## **CAPÍTULO II**

---

---

### **Caracterização polifásica de isolados de *Burkholderia gladioli* pv. *allicola*, agente causal da podridão escorregadia da cebola**

1 **Caracterização polifásica de isolados de *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*, agente causal**  
2 **da podridão escorregadia da cebola**

3  
4

5 **Ana D. B. Baia**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,  
6 Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil; **Adriano M. F. Silva**, Universidade Federal de  
7 Alagoas, Departamento de Agronomia, Rio Largo, 57072-900, Alagoas; **Bárbara G. Ribeiro**,  
8 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 52171-  
9 900, Pernambuco, Brasil; **Claudeana C. Souza**, Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
10 Departamento de Agronomia, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil; **Valdir de Queiroz**  
11 **Balbino**, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, 50670-  
12 901, Pernambuco, Brasil; **Elineide B. Souza**, Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
13 Departamento de Microbiologia, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil; e **Marco A. S.**  
14 **Gama**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife,  
15 52171-900, Pernambuco, Brasil.

16 Autor para correspondência: Marco A. S. Gama; marco.gama@ufrpe.br

17

18 **Resumo**

19 A podridão escorregadia das escamas da cebola, causada por *Burkholderia gladioli* pv.  
20 *alliicola*, é uma das mais importantes doenças bacterianas da cebola, pois está presente em  
21 muitas, senão todas, as áreas de produção de cebola no mundo. Visto que estudos com  
22 isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* são escassos, uma abordagem polifásica envolvendo  
23 genotipagem por meio de rep-PCR, análise filogenética do gene *recA*, análise da sequência  
24 multilocos (MLSA) com os genes *recA*, *gyrB*, *lepA* e *trpB*, características bioquímicas,  
25 morfológicas e patogênicas foram utilizadas para analisar a variabilidade de 31 isolados  
26 causadores de podridão escorregadia das escamas da cebola no semiárido brasileiro. Foram  
27 observados 25 isolados com colônias pigmentadas e 6 isolados com colônias não  
28 pigmentadas. Vinte e oito isolados apresentaram reação de PCR-positiva com os *primers*  
29 CMG-23-1 e G-23-2, específicos para *B. gladioli* a nível de espécie. A análise de rep-PCR  
30 evidenciou uma elevada variabilidade genética entre os isolados, sendo observada a formação  
31 de 21 haplótipos e 9 grupos a 70% de similaridade. A análise de inferência Bayesiana (IB)  
32 realizada com o fragmento do gene *recA*, com 16 isolados selecionados com base na  
33 variabilidade encontrada por meio de rep-PCR, permitiu o agrupamento dos isolados junto  
34 com o isolado tipo de *B. gladioli*, com probabilidade posterior de 94%. No entanto, 11  
35 isolados foram agrupados junto com o isolado tipo de *B. gladioli* pv. *alliicola*, enquanto 5

36 foram agrupados junto com o isolado tipo de *B. gladioli* pv. *gladioli*. A MLSA realizada com  
37 os isolados CCRMBG13, CCRMBG38 CCRMBG47, CCRMBG160, CCRMBG222 e  
38 CCRMBG251, por meio de IB com os genes *recA*, *gyrB*, *lepA* e *trpB*, confirmou os resultados  
39 observados com o gene *recA*. Os isolados de *B. gladioli* do estudo utilizaram 12 compostos  
40 bioquímicos, os quais não foram pelo isolado tipo de *B. gladioli* pv. *alliicola*. Foram  
41 observadas diferenças significativas entre a severidade da doença provocada por isolados  
42 pigmentados e não pigmentados. Os resultados obtidos revelaram uma elevada variabilidade  
43 genética e patogênica entre os isolados estudados. Portanto, o conhecimento da diversidade  
44 genética dos isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* causadores da podridão escorregadia da  
45 cebola no semiárido brasileiro deverão ser levados em consideração para o desenvolvimento  
46 de estratégias de manejo da doença.

47

#### 48 **Abstract**

49 The slippery skin of onion caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*, is one of the most  
50 important bacterial diseases of the onion, as it is present in many, if not all, of the onion  
51 production areas in the world. Since studies with isolates of *B. gladioli* pv. *alliicola* are scarce,  
52 a polyphase approach involving genotyping by means of rep-PCR, phylogenetic analysis of  
53 the *recA* gene, multilocus sequence analysis (MLSA) with *recA*, *gyrB*, *lepA* and *trpB*,  
54 biochemical morphological and pathogenic characteristics were used to analyze the variability  
55 of 31 isolates causing slippery skin of onion in Northeast Brazil. 25 isolates with pigmented  
56 colonies and 6 isolates with non-pigmented colonies were observed. Twenty-eight isolates  
57 showed PCR-positive reaction with primers CMG-23-1 and G-23-2. Rep-PCR analysis  
58 revealed high genetic variability among isolates, with 21 haplotypes and 9 groups at 70%  
59 similarity. The Bayesian inference (IB) analysis performed with the *recA* gene, with 16  
60 isolates selected based on the variability found by means of rep-PCR, allowed grouping of the  
61 isolates together with the *B. gladioli* type isolate, with a posterior probability of 94%.  
62 However, 11 isolates were grouped together with the isolate type of *B. gladioli* pv. *alliicola*,  
63 while 5 were grouped together with the isolated type of *B. gladioli* pv. *gladioli*. The MLSA  
64 performed with the isolates CCRMBG13, CCRMBG38 CCRMBG47, CCRMBG160,  
65 CCRMBG222 and CCRMBG251, through IB with the *recA*, *gyrB*, *lepA* and *trpB* genes,  
66 confirmed the results observed for the *recA* gene. The isolates of *B. gladioli* pv. *alliicola* and  
67 *B. gladioli* pv. *gladioli* used 12 biochemical compounds, which were not by the isolated type  
68 of *B. gladioli* pv. *alliicola*. Significant differences were observed between the severity of the  
69 disease caused by pigmented and non-pigmented isolates. The results showed high genetic

70 and pathogenic variability among the studied isolates. Therefore, the knowledge of the genetic  
71 behavior of the isolates of *B. gladioli* pv. *alliicola* causing the slippery skin in the Brazilian  
72 semiarid should be taken into account for the development of disease management strategies.

73

74 A cultura da cebola está sujeita a uma série de doenças que podem atacar as mais  
75 diversas partes da planta. Algumas destas doenças podem causar grandes perdas, tornando-se  
76 fatores limitantes ao cultivo se medidas de controle adequadas não forem adotadas (Gava e  
77 Tavares 2007). Dentre essas doenças, destaca-se a podridão escorregadia da escama, causada  
78 por *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* (Burkholder) Young et al. (ex. *Pseudomonas gladioli*  
79 pv. *alliicola* (Burkholder) Young et al.), devido a elevada incidência nas etapas de cultivo,  
80 armazenamento e transporte (Sobiczewski e Schollenberger 2002).

81 *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* foi relatada pela primeira vez em 1950 causando  
82 podridão em bulbos de cebola no estado de Nova York (EUA) (Burkholder 1942), ocasião em  
83 que foi chamada de podridão escorregadia (do inglês slippery skin) devido ao fato de que as  
84 escamas centrais de bulbos infectados “escorregam” pela parte superior do bulbo se uma  
85 pressão for aplicada à base do mesmo (Vitanov 1976). Os sintomas da podridão escorregadia  
86 caracterizam-se como um encharcamento com coloração amarela ou marrom-amarelada das  
87 escamas internas. A infecção normalmente progride do topo das escamas infectadas em  
88 direção ao prato, a partir da qual a bactéria pode se espalhar para escamas adjacentes  
89 (Schwartz e Mohan 2008). A doença está presente em muitas, senão em todas as áreas de  
90 cultivo de cebola e armazenamento no mundo (Schwartz e Mohan 2008). No Brasil, a  
91 podridão escorregadia foi oficialmente relatada nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Santa  
92 Catarina, Rio de Janeiro (Malavolta Jr. et al. 2008), Bahia e Pernambuco (Oliveira 2016).

93 Como patógeno de plantas, *B. gladioli* também apresenta outros dois patovares: pv.  
94 *gladioli*, causando podridões ou manchas em gladiolos e outras plantas ornamentais, arroz  
95 (*Oryza sativa* L.) e açafrão (*Curcuma longa* L.) (Bradbury 1986), e pv. *agaricola*, causando  
96 podridão em cogumelos (Gill 1995). Por sua vez, além de bulbos de cebola, *B. gladioli* pv.  
97 *alliicola* também tem sido encontrada no solo, em plantas e no trato respiratório de humanos  
98 com granulomatosa crônica e fibrose cística (Segonds et al. 1999).

99 Muito pouco é conhecido sobre a podridão escorregadia da cebola e as características  
100 de seus isolados. Nenhum estudo de caracterização explorando as propriedades bioquímicas,  
101 moleculares, patogênicas e o comportamento genético de *B. gladioli* pv. *alliicola* foram  
102 realizados até o momento e os estudos desenvolvidos com *B. gladioli* pv. *alliicola* até o  
103 momento tem sido voltado apenas para fins de identificação e detecção (Bonasera et al. 2014;

104 Félix-Gastélum et al. 2017; Kuang et al. 2017; Kowalska et al. 2015; Lamovšek et al. 2016;  
105 Lee et al. 2005; Stoyanova et al. 2011). Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi  
106 caracterizar os isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* associados a podridão escorregadia da  
107 cebola no semiárido brasileiro com base nas características fenotípicas e genotípicas a fim de  
108 se conhecer melhor a variabilidade entre esses isolados.

109

## 110 **Materiais e Métodos**

111 **Isolados, extração e quantificação do DNA genômico.** Foram utilizados 31 isolados  
112 causadores da podridão escorregadia da cebola, (Tabela 1) pertencentes a Coleção de Culturas  
113 Rosa Mariano (CCRM) do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) da Universidade  
114 Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os isolados foram obtidos a partir de bulbos de  
115 cebola apresentando sintomas característicos da doença nas regiões produtoras de cebola do  
116 semiárido brasileiro. Os isolados tipos de *B. gladioli* pv. *alliicola* (IBSBF534= LMG 2121<sup>TS</sup>),  
117 *B. gladioli* pv. *gladioli* (IBSBF546= LMG 2216<sup>TS</sup>) e *B. cepacia* (IBSBF567) também foram  
118 usados para fins de comparação.

119 A extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando-se o protocolo descrito em  
120 Gama e Covello (2016). O DNA foi quantificado por meio de análise comparativa com o  
121 marcador High DNA Mass Ladder (Fermentas Life Sciences, Canadá) em gel de agarose a  
122 1% preparado em TBE 1X (Tris-Borato EDTA). O DNA foi corado usando uma mistura  
123 contendo 5 µl de DNA concentrado, 3 µl de 6X DNA Loading Dye (Fermentas Life Sciences,  
124 Ontário, Canadá) e 2 µl de SYBR<sup>®</sup> Safe (10X) (Life Technologies, São Paulo, Brasil). A  
125 eletroforese foi realizada por 1h e 40 min a 80 V. Posteriormente, o gel foi fotodocumentado,  
126 seguindo-se a diluição das amostras para 10 ng/µl e armazenado a -20° C.

127

128 **Características morfológicas das colônias.** A morfologia das colônias dos isolados  
129 foram observadas em diferentes meios de cultura levando-se em consideração a forma,  
130 tamanho, textura e coloração. Os meios de culturas utilizados foram o azul de triptano  
131 tetraciclina (trypan blue tetracycline - TB-T) (20g/L de ágar, 2,0 g/L glicose, 1,0 g/L  
132 asparagina, 1,0g/L NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05 g/L azul de  
133 triptano e 0,02 g/L tetraciclina em ddH<sub>2</sub>O), ágar nutritivo-dextrose-levedura (NYDA) (20 g/L  
134 de ágar, 10 g/L de dextrose, 5 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de carne e 5 g/L de  
135 peptona), ágar nutritivo (AN) (20g/L de ágar, 3g/L de extrato de carne e 5g/L de peptona); e  
136 meio de King B (KMB) (15g/ L de ágar, 20 g/L de protease peptona, 8,7 g/L de glicerol, 1,5  
137 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,5 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). As bactérias foram cultivadas pelo método de

138 estrias e incubadas por 48 horas a 30° C em estufa do tipo B.O.D. (Biochemistry Oxygen  
139 Demand).

140

141 **Identificação molecular.** Para a separação dos isolados de *B. gladioli* dos demais  
142 isolados, os isolados foram identificados utilizando-se o par de *primers* específicos para  
143 identificação *B. gladioli* a nível de espécie, CMG-23-1 (5'ATAGCTGGTTCTCTCCGAA3')  
144 e G-23-2 (5'CCTACCATGCAYATAAAT3'), os quais amplificam um fragmento de 388 pb  
145 do gene 23S tRNA (Bauernfeind et al. 1998). As reações foram compostas por 1X PCR  
146 Master Mix 2X (0,05 U / µl de Taq DNA-polimerase, tampão de reação, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4  
147 mM de cada dNTP), 0,5 µM de cada iniciador, 2 µM de água e 100 ng de DNA. As amostras  
148 foram amplificadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Waltham, EUA) de acordo com  
149 Bauernfeind et al. (1998). Controles brancos (reações livres de DNA) foram incluídos em  
150 todos os experimentos para avaliar a presença de contaminantes. As reações de amplificação  
151 foram coradas usando uma mistura contendo 6 µl da reação, 3 µl de 6X DNA Loading Dye  
152 (Fermentas Life Sciences, Ontário, Canadá) e 2 µl de SYBR<sup>®</sup> Safe (10X) (Life Technologies,  
153 São Paulo, Brasil). Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de  
154 agarose a 1,0% por 1 h e 30 minutos a 80 V, em tampão TBE 1X (5,4 g de Tris-base, 2,75 g  
155 de ácido bórico e 0,375 g de EDTA, para um volume final de 1000 ml) com GeneRuler 1 kb  
156 DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). O gel foi posteriormente  
157 fotodocumentado.

158

159 **rep-PCR.** A análise por rep-PCR (REP, ERIC e BOX-PCR) dos isolados foi realizada  
160 conforme descrito por Louws et al. (1995). As reações foram compostas por: 1X PCR Master  
161 Mix 2X (0,05 U / µl de Taq DNA-polimerase, tampão de reação, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de  
162 cada dNTP), 2 µM de cada iniciador e 200 ng de DNA. As amostras foram amplificadas em  
163 termociclador PTC-100. Controles brancos (reações livres de DNA) foram incluídos em todos  
164 os experimentos para avaliar a presença de contaminantes. As reações de amplificação foram  
165 coradas usando uma mistura contendo 10 µl da reação, 3 µl de 6X DNA Loading Dye e 2 µl  
166 de SYBR<sup>®</sup> Safe (10X). Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em  
167 gel de agarose a 1,5% por 3 h a 80 V, em tampão TBE 1X (5,4 g de Tris-base, 2,75 g de ácido  
168 bórico e 0,375 g de EDTA num volume final de 1000 ml) com GeneRuler 1 kb DNA ladder.  
169 O gel foi posteriormente fotodocumentado. As análises foram realizadas em duplicata.

170 Os perfis de amplificação gerados com os marcadores REP, ERIC e BOX foram  
171 analisados visualmente com base na presença (1) ou ausência (0) de bandas para construção

172 de uma matriz binária. Apenas bandas reprodutíveis (presentes em ambas as réplicas) foram  
173 registradas. Os dados de cada marcador foram analisados separadamente e combinados  
174 usando o programa MVSP (Multivariate Statistic Package) v. 3.2. para determinar as relações  
175 genéticas entre os isolados. Foi utilizado o coeficiente de similaridade de Jaccard (Sneath e  
176 Sokal 1973) e o método de grupo de par não ponderado usando médias aritméticas  
177 (unweighted pair group method using arithmetic averages - UPGMA).

178

179 **Amplificação e sequenciamento do gene *recA*.** Um fragmento de 376 pb do gene  
180 *recA* foi amplificado usando os *primers* Bur3 (GA(AG)AAGCAGTTCGGCAA) e Bur5  
181 (CGATCATGTCGATCGARC) (Ginther 2015) para estabelecer as posições filogenéticas dos  
182 isolados CCRMBG04, CCRMBG05, CCRMBG13, CCRMBG26, CCRMBG38,  
183 CCRMBG43, CCRMBG47, CCRMBG134, CCRMBG143, CCRMBG160, CCRMBG165,  
184 CCRMBG172, CCRMBG194, CCRMBG222, CCRMBG243 e CCRMBG251. As reações  
185 foram compostas por 1X PCR Master Mix 2X (0,05 U/μl de Taq DNA polimerase, tampão de  
186 reação, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de cada, dNTP), 1 μM de cada iniciador, 1 μM de DMSO e  
187 100 ng de DNA. O DNA amplificado foi purificado com as enzimas *Exonuclease I* (Exo I) e  
188 *Shrimp Alkaline Phosphatase* (rSAP) (New England Biolabs Inc., Ipswich, EUA) de acordo  
189 com as instruções do fabricante. O sequenciamento do DNA foi realizado com o sequenciador  
190 ABI modelo 3700 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) usando o protocolo do  
191 fabricante e o kit de reação de sequenciamento BigDye Terminator (Thermo Fisher Scientific,  
192 Waltham, USA).

193 A análise da qualidade das sequências de nucleotídeos e a montagem dos consensos  
194 foram realizadas com Staden Package (Staden et al. 2000). As sequências foram analisadas  
195 com o algoritmo Blastn, implementado no National Center for Biotechnology Information  
196 (NCBI) (<http://www.ncbi.org/>). As sequências obtidas neste estudo também foram analisadas  
197 em conjunto com as sequências disponíveis no banco de dados PubMLST *Burkholderia*  
198 *cepacia* complex (PubMLST Bcc) (<http://pubmlst.org/bcc>). Para as construções das árvores  
199 filogenéticas foram utilizadas sequências dos isolados tipo das espécies de *Burkholderia*  
200 disponíveis no Genbank.

201 O múltiplo alinhamento das sequências (MSA) foi realizado com a versão online do  
202 MAFFT v.7 (Katoh et al. 2002; Katoh e Standley 2013; Katoh et al. 2017) com o método  
203 iterativo G-INS-i e com a matriz de pontuação de nucleotídeos 200PAM / k = 2. Em seguida,  
204 o alinhamento para cada coluna no MSA foi refinado usando o algoritmo GUIDANCE2  
205 implementado no Guidance2 Server em <http://guidance.tau.ac.il/> com as configurações de

206 tratamento padrão. O alinhamento usado foi o resultado mascarado com uma pontuação de  
207 99% dos resíduos específicos.

208 As relações evolutivas foram inferidas usando Inferência Bayesiana (IB) e a Máxima  
209 verossimilhança (MV), ambas realizadas usando a plataforma CIPRES  
210 (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>). A IB foi realizada usando o programa MrBayes  
211 v. 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) com o modelo GTR+I+G de evolução de nucleotídeos  
212 estimado por meio do Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP\* v.4) (Swofford 1998)  
213 e MrModeltest 2.3 (Nylander 2004), segundo o critério de Akaike Information Criterion  
214 (AIC). A análise foi realizada com  $5 \times 10^7$  gerações de Monte Carlo Cadeia de Markov, com  
215 amostragem a cada 1000 gerações. A MV foi realizada com auxílio do programa RAxML-  
216 HPC2 (8.2.10) (Stamatakis 2014) com 1000 pseudoreplicatas sob o modelo GTR-GAMMA  
217 (-m GTRCAT -x-f a).

218

219 **Análise de sequências multilocus (MLSA).** Os isolados CCRMBG13, CCRMBG38,  
220 CCRMBG47, CCRMBG222 e CCRMBG251 foram utilizados para amplificação e  
221 sequenciamento de fragmentos de dos genes *recA*, *gyrB*, *lepA* e *trpB* (Spilker et al. 2009). A  
222 amplificação, sequenciamento e construção das árvores filogenéticas, dos genes individuais e  
223 da sequência concatenada, foram realizadas conforme descrito no item anterior. Para as  
224 construções das árvores filogenéticas foram utilizadas sequências dos isolados tipo das  
225 espécies do gênero *Burkholderia* disponíveis no banco de dados do GenBank  
226 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e sequências tipo (STs) de *Burkholderia* disponíveis  
227 na base de dados do PubMLST Bcc (Tabela 2).

228

229 **Caracterização bioquímica e fisiológica.** A caracterização bioquímica dos isolados  
230 CCRMBG13, CCRMBG38, CCRMBG47, CCRMBG222 e CCRMBG251 e do isolado tipo  
231 IBSBF 534 (LMG 2121<sup>TS</sup>) de *B. gladioli* pv. *alliicola* foi realizada utilizando-se microplacas  
232 Biolog<sup>®</sup> GEN III compostas por 71 fontes de carbono e 23 substâncias inibitórias. Os isolados  
233 foram cultivados em meio Biolog Universal Growth (BUG) a 30° C por 48 horas em estufa  
234 tipo B.O.D. A suspensão bacteriana foi preparada em fluído de inoculação IF-A para uma  
235 transmitância de 98%, ajustada com auxílio de espectrofotometro Turbidimeter (Biolog, Inc.,  
236 US). Foram depositados 100 µl da suspensão em cada poço das microplacas. Posteriormente,  
237 as microplacas foram incubadas a 33° C por 24 h em estufa tipo B.O.D. A avaliação foi  
238 determinada pela presença de crescimento bacteriano, evidenciado pela coloração roxa  
239 indicadora da redução do cloreto de trifeniltetrazólio.

240 **Caracterização patológica.** Os isolados descritos na Tabela 1 foram inoculados em  
241 bulbos de cebola amarela (cv. IPA 11) com o auxílio de uma almofada de alfinete  
242 entomológico de 3 mm de profundidade. Os bulbos foram feridos e sobre o ferimento foram  
243 depositados 20 µL de suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). Bulbos inoculados apenas com  
244 água destilada esterilizada (ADE) constituíram o controle negativo. Após as inoculações, os  
245 bulbos foram depositados em placas de Petri esterilizadas e submetidos a tratamento em  
246 câmara úmida por 48 horas a 30° C em estufa tipo B.O.D. Os mesmos foram avaliados 48  
247 horas após as inoculações determinando-se o tamanho da lesão em milímetros (severidade)  
248 por meio da medição das lesões com auxílio de um paquímetro.

249 O experimento foi inteiramente casualizado com quatro repetições por isolado e cada  
250 repetição caracterizada por um bulbo de cebola, com cada bulbo contendo um ponto de  
251 inoculação. O isolado tipo de *B. gladioli* pv. *alliicola* (IBSBF 534= LMG 2121<sup>TS</sup>) foi usado  
252 para fins de comparação. O experimento foi realizado duas vezes. Os dados obtidos foram  
253 submetidos à análise de variância e ao teste de Scott Knot (P= 0,05) usando o programa  
254 AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomicos (Barbosa e  
255 Maldonado 2015). Para comparação da severidade entre os isolados pigmentados e não  
256 pigmentados foi utilizado o “teste t” de student (P=0,01) para amostras independentes através  
257 do programa Statistix<sup>®</sup> 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, USA).

258

## 259 **Resultados**

260 **Características morfológicas das colônias.** As colônias dos isolados descritos na  
261 Tabela 1 apresentaram-se redondas, pequenas, convexas, com bordas lisas e cremosas em  
262 todos os meios de cultura avaliados (TB-T, NYDA, AN e KMB). Entretanto, foi possível  
263 observar a formação de dois grupos: isolados pigmentados e não pigmentados (Figura 1). Os  
264 isolados CCRMBG01, CCRMBG03, CCRMBG04, CCRMBG05, CCRMBG07,  
265 CCRMBG08, CCRMBG13, CCRMBG36, CCRMBG38, CCRMBG39, CCRMBG42,  
266 CCRMBG43, CCRMBG44, CCRMBG46, CCRMBG47, CCRMBG70, CCRMBG134,  
267 CCRMBG143, CCRMBG160, CCRMBG172, CCRMBG194, CCRMBG212, CCRMBG222,  
268 CCRMBG223 e CCRMBG251 produziram um pigmento amarelado, enquanto os isolados  
269 CCRMBG11, CCRMBG24, CCRMBG26, CCRMBG165, CCRMBG175 e CCRMBG243  
270 apresentaram colônia com coloração esbranquiçada. Essa característica foi observada em  
271 todos os meios utilizados, com exceção do meio TB-T, onde as colônias permaneceram com a  
272 coloração esbranquiçada.

273

274 **Identificação dos isolados.** Os isolados tipos de *B. gladioli* pv. *alliicola* (IBSBF534=  
275 LMG 2121<sup>TS</sup>), *B. gladioli* pv. *gladioli* (IBSBF546= LMG 2216<sup>TS</sup>) e 28 isolados amplificaram  
276 o fragmento de 388 pb do gene 23S tRNA. Os isolados CCRMBG13, CCRMBG143 e  
277 CCRMBG172 e o isolado tipo de *B. cepacia* (IBSBF567=LMG 1222<sup>TS</sup>) não amplificaram  
278 nenhum fragmento.

279

280 **rep-PCR.** A análise de agrupamento dos isolados listados na Tabela 1 realizada com  
281 os dados combinados dos marcadores REP, ERIC e BOX (rep-PCR) permitiu a formação de  
282 21 haplótipos e nove grupos distintos ao nível de 70% de similaridade (Figura 2). O grupo 1  
283 compreendeu 34% dos isolados, incluindo o isolado tipo IBSBF534 (LMG 2121<sup>TS</sup>) e isolados  
284 coletados nos estados da Bahia (Casa Nova e Mucugê) e Pernambuco (Petrolândia), o grupo  
285 2 compreendeu apenas o isolado CCRMBG38, coletado no estado de Pernambuco (Orocó), o  
286 grupo 3 compreendeu apenas o isolado CCRMBG13, coletado no estado de Pernambuco  
287 (Petrolândia), o grupo 4 compreendeu os isolados CCRMBG05, CCRMBG07 e CCRMBG11  
288 coletados no estado de Pernambuco (Petrolândia), o grupo 5 compreendeu os isolados  
289 CCRMBG26 e CCRMBG134 coletados no estado de Pernambuco (Belém do São Francisco e  
290 Orocó), o grupo 6 compreendeu os isolados CCRMBG172, CCRMBG212, CCRMBG222,  
291 CCRMBG223 e CCRMBG251 coletados no estado da Bahia (Casa Nova e Irecê), o grupo 7  
292 compreendeu os isolados CCRMBG36, CCRMBG42, CCRMBG43, CCRMBG44,  
293 CCRMBG46 e CCRMBG47, coletados no estado de Pernambuco (Orocó e Belém de São  
294 Francisco), o grupo 8 compreendeu o isolado CCRMBG24, coletado no estado de  
295 Pernambuco (Orocó) e o grupo 9 compreendeu o CCRMBG143, coletado no estado de  
296 Pernambuco (Belém de São Francisco).

297

298 **Sequenciamento e análise filogenética do gene *recA*.** As árvores filogenéticas  
299 construídas com a sequência do gene *recA* pelos métodos de MV e IB exibiram estrutura  
300 similar. A árvore filogenética construída por meio de IB permitiu o agrupamento dos 16  
301 isolados em um mesmo clado, junto com o isolado tipo de *B. gladioli* (LMG2216<sup>TS</sup>), com  
302 probabilidade posterior de 94%. No entanto, os isolados CCRMBG04, CCRMBG05,  
303 CCRMBG13, CCRMBG26, CCRMBG38, CCRMBG134, CCRMBG143, CCRMBG160,  
304 CCRMBG165, CCRMBG194, e CCRMBG243 se agruparam junto com o isolado tipo de *B.*  
305 *gladioli* pv. *alliicola* (LMG 2121<sup>TS</sup>), enquanto os isolados CCRMBG43, CCRMBG47,  
306 CCRMBG172, CCRMBG222 e CCRMBG251 se agruparam mais próximo do isolado tipo de  
307 *B. gladioli* pv. *gladioli* (LMG 2216<sup>TS</sup>) (Figura 3).

308 **Análise da sequência multilocus.** As árvores filogenéticas construídas com as  
309 sequências parciais dos genes *recA*, *gyrB*, *lepA* e *trpB*, analisadas individualmente,  
310 apresentaram estruturas similares utilizando os métodos de MV e IB. De forma semelhante, as  
311 árvores filogenéticas geradas com a sequência concatenada também exibiram estruturas  
312 similares quando os dois métodos foram utilizados. A árvore filogenética construída por meio  
313 de IB permitiu o agrupamento dos 6 isolados em um mesmo clado, junto com o isolado tipo  
314 de *B. gladioli* (LMG2216<sup>TS</sup>), com probabilidade posterior de 100% (Figura 4). No entanto, os  
315 isolados CCRMBG47, CCRMBG222 e CCRMBG251 se agruparam junto com o isolado tipo  
316 de *B. gladioli* pv. *gladioli* (LMG2216<sup>TS</sup>), enquanto os isolados CCRMBG13, CCRMBG38 e  
317 CCRMBG160 se agruparam mais próximo do isolado tipo de *B. gladioli* pv. *alliicola*  
318 (LMG2121<sup>TS</sup>).

319

320 **Análises bioquímicas e fisiológicas.** As reações dos isolados CCRMBG13,  
321 CCRMBG38, CCRMBG47, CCRMBG160, CCRMBG222, CCRMBG251 e do isolado tipo  
322 de *B. gladioli* pv. *alliicola* (IBSBF534 = LMG 2121<sup>TS</sup>) foram registradas como positiva ou  
323 negativa para cada um dos 94 testes bioquímicos presentes no sistema Biolog® GEN III  
324 (Tabela 3). Todos os isolados metabolizaram 100% dos carbonos N-acetil-D-Glucosamina, L-  
325 Fucose, D-Manitol, D-Glucose-6-PO<sub>4</sub>, D-frutose-6-PO<sub>4</sub>, L-Alanina, L-Arginina, L-Histidina,  
326 L-Serina. As substâncias inibidoras que não foram 100% eficientes em todos os isolados  
327 foram pH 6, pH 5, 1% de NaCl, D-Sódio a 1% lactato, ácido fusídico, D-Sorbitol, D-Arabitol,  
328 troleandomicina, A rifamicina SV, ácido L-aspártico, ácido L-glutâmico, Lincomicina, ácido  
329 D-Galacturônico, ácido D-glucônico, ácido D-glucurônico, ácido quínico, ácido D-sacárico,  
330 tetrazólio Azul, piruvato de metilo, D,L ácido láctico, ácido cítrico, L-ácido málico, Tween 40,  
331 ácido  $\gamma$ -Amino-Butyric,  $\beta$ -Hidroxi-D, L-Ácido butírico, ácido acético, ácido fórmico.

332 Todos os isolados não possuíram capacidade para metabolizar 100% dos carbonos D-  
333 Celobiose, D-Turanose, D-Maltose, estaquiase, D-Rafinose,  $\beta$ -Metil-D-Glicosídeo,  $\alpha$ -D-  
334 lactose, N-acetil-  $\beta$ -D-Manaçúcar, bem como não foram sensíveis 100% as substâncias  
335 inibitórias N-Acetil ácido neuramínico, 4% de NaCl, 8% de NaCl, D-Serina, glicerina,  
336 minociclina, ácido L-Galactonico Lactona, p-hidroxi-Fenilacético ácido, ácido D-láctico  
337 methyl Ester, Nalidixic e cloreto de lítio e bromato de Sódio. As demais fontes de carbono e  
338 substâncias inibitórias apresentaram reação variável.

339

340 **Caracterização patológica.** Foram identificados seis grupos (A, B, C, D, E e F)  
341 baseados na severidade da doença (Tabela 1). O grupo A foi composto por 10 isolados, os

342 quais causaram lesões variando de 29,58 a 25,33 mm; o grupo B foi composto por 9 isolados,  
343 que causaram lesões variando de 24,86 a 21,08 mm; o grupo C foi composto por 8 isolados,  
344 que causaram lesões variando de 20,61 a 18,24 mm; o grupo D foi composto por 4 isolados,  
345 que causaram lesões variando de 17,77 a 14, 81 mm; e o grupo E foi composto pelo isolado  
346 CCRMBG04, que causou lesão de 9,77 mm. Adicionalmente, foi possível observar diferenças  
347 significativas ( $p=0,01$ ) entre a severidade dos isolados pigmentados (14,3 mm) e não  
348 pigmentados (10,4 mm) quanto a severidade.

349

### 350 **Discussão**

351 O presente trabalho realizou a caracterização de 31 isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola*  
352 coletados a partir de bulbos de cebolas apresentando sintomas característicos da podridão  
353 escorregadia da cebola no semiárido brasileiro. A maioria dos isolados apresentou  
354 características semelhantes às do isolado tipo de *B. gladioli* pv. *alliicola* (IBSBF534 = LMG  
355 2121<sup>TS</sup>), que apresentou colônias redondas, pequenas, convexas, bordas lisas, cremosas, com  
356 pigmento amarelado. Todavia, interessante um grupo de isolados apresentou coloração  
357 esbranquiçada. Diferenças nas características das colônias de *B. gladioli* pv. *alliicola* também  
358 foram observadas por Lamovšek et al. (2016), que observaram que alguns isolados  
359 apresentaram uma superfície ligeiramente enrugada enquanto outros eram lisos em meio  
360 KMB.

361 A identificação molecular com *primers* específicos CMG-23-1 e G-23-2 (Bauernfeind  
362 et al. 1998) permitiu a identificação de 28 isolados como *B. gladioli* pv. *alliicola*. Os isolados  
363 CCRMBG13, CCRMBG143 e CCRMBG172 não amplificaram nenhuma banda. No entanto,  
364 tendo em vista a capacidade de causar apodrecimento desses isolados e a possibilidade da  
365 variabilidade genética inerente dos isolados terem levado a uma reação negativa, os mesmos  
366 foram selecionados para análise filogenética por meio do gene *recA*.

367 A estrutura genética dos isolados relacionados na Tabela 1 foi analisada por meio da  
368 técnica rep-PCR, o que permitiu a formação de 9 grupos distintos ao nível de 70% de  
369 similaridade e 21 haplótipos (Figura 2), indicando alta variabilidade entre os isolados de *B.*  
370 *gladioli*. Além disso, com base na análise de rep-PCR, 16 isolados representativos da  
371 variabilidade genética observada na população estudada foram selecionados para  
372 sequenciamento e análise filogenética do gene *recA*. Estratégia semelhante foi utilizada para  
373 confirmação da identidade de isolados obtidos a partir de cebolas com sintomas de podridão  
374 escorregadia por meio da comparação dos perfis gerados com o marcador ERIC-PCR e  
375 seleção de isolados para sequenciamento do gene *recA* (Kowalska et al. 2015).

376 O gene *recA* tem sido amplamente aplicado na sistemática bacteriana (Karlin,  
377 Weinstock e Brendel 1995), incluindo as espécies do gênero *Burkholderia*, facilitando estudos  
378 de diversidade, relações filogenéticas e genotípicas desses organismos (Payne et al. 2005). A  
379 análise filogenética dos 16 isolados causadores de podridão escorregadia realizada por meio  
380 de IB com esse marcador mostrou que todos os isolados foram filogeneticamente relacionados  
381 a espécie *B. gladioli*, com 94% de probabilidade posterior. No entanto, os isolados  
382 CCRMBG04, CCRMBG05, CCRMBG13, CCRMBG26, CCRMBG38, CCRMBG134,  
383 CCRMBG143, CCRMBG160, CCRMBG165, CCRMBG194, e CCRMBG243 se agruparam  
384 junto com o isolado tipo de *B. gladioli* pv. *alliicola* (LMG 2121<sup>TS</sup>), enquanto os isolados  
385 CCRMBG43, CCRMBG47, CCRMBG172, CCRMBG222 e CCRMBG251 se agruparam  
386 mais próximo do isolado tipo de *B. gladioli* pv. *gladioli* (LMG 2216<sup>TS</sup>). Esse resultado foi  
387 inesperado pelo fato de não existirem relatos sobre a capacidade de isolados de *B. gladioli* pv.  
388 *gladioli* causarem podridão escorregadia em bulbos de cebola, e nem de isolados de *B.*  
389 *gladioli* pv. *alliicola* causarem lesões em gládíolos.

390 Os isolados CCRMBG13, CCRMBG143 e CCRMBG172, os quais apresentaram PCR  
391 negativa com os *primers* CMG-23 e G-23-2 e foram incluídos nas análises filogenéticas com  
392 o gene *recA*, também foram agrupados no clado formado por isolados de *B. gladioli*. Esses  
393 resultados demonstram que os *primers* desenvolvidos para *B. gladioli* não são tão eficientes  
394 para todos os isolados da espécie em questão, devido ao fato de não ter cobertura para detectar  
395 a variabilidade encontrada entre seus isolados. Vale salientar que esses *primers* foram  
396 desenvolvidos com base em isolados obtidos a partir de amostras clínicas de pacientes com  
397 fibrose cística (Bauernfeind et al. 1998), o que ressalta a necessidade do desenvolvimento de  
398 *primers* que levem em consideração a variabilidade desses organismos.

399 Com base na análise filogenética realizada por meio de IB com o gene *recA*, os  
400 isolados CCRMBG13, CCRMBG38, CCRMBG47, CCRMBG160, CCRMBG222 e  
401 CCRMBG251 foram selecionados para MLSA. Por sua vez, a árvore de MLSA realizada por  
402 meio de IB possibilitou a identificação da posição taxonômica dos isolados CCRMBG13,  
403 CCRMBG38, CCRMBG47, CCRMBG160, CCRMBG222 e CCRMBG251 como *B. gladioli*,  
404 com probabilidade posterior de 100%. No entanto, assim como para o gene *recA*, foi  
405 observada variabilidade infrasubespécífica, com os isolados CCRMBG13, CCRMBG38 e  
406 CCRMBG160 se agrupando com o isolado tipo de *B. gladioli* pv. *alliicola* (LMG 2121<sup>TS</sup>) e os  
407 isolados CCRMBG47, CCRMBG222 e CCRMBG251 se agrupando com o isolado tipo de *B.*  
408 *gladioli* pv. *gladioli* (LMG 2216<sup>TS</sup>). Em estudo semelhante, os genes *gyrB*, *lepA*, *phaC* e *recA*  
409 permitiram a identificação e formação de dois grupos de isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola*

410 obtidos de bulbos de cebola na Polônia, contudo os grupos foram formados apenas entre  
411 isolados do mesmo patovar (Kowalska et al. 2015).

412 A alta variabilidade genética foi refletida também na diversidade bioquímica exibida  
413 pelos isolados, pois houveram compostos bioquímicos utilizados pelos isolados presentes no  
414 semiárido brasileiro que não foram consumidos pelo isolado tipo de *B. gladioli* pv. *alliicola*  
415 (IBSBF534 = LMG 2121<sup>TS</sup>) (D-Melibiose, 3-Metil Glucose, D-Serina, minociclina, guanidina  
416 HCl, pectina, p-hidroxi-Fenilacético ácido, potássio telurito, aztreonam e o butirato de sódio).  
417 Esta diversidade pode ser atribuída ao tamanho do genoma das espécies do gênero  
418 *Burkholderia* (6 Mb a 9 Mb), rico em sequências de inserção e elementos genéticos móveis,  
419 que podem contribuir para a sua plasticidade e diversidade genética. Quando essas variações  
420 são expressas em isolados pertencentes a uma mesma espécie, podem resultar em perfis  
421 bioquímicos variáveis (Mahenthiralingam et al. 2008; Drevinek e Mahenthiralingam 2010; Li  
422 Puma et al. 2011).

423 Foram observadas diferenças quanto ao nível de severidade entre os isolados, bem  
424 como entre os isolados pigmentados e não pigmentados. Variações referentes ao tamanho das  
425 lesões ocasionadas isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* em bulbos de cebola foram observadas  
426 anteriormente (Félix-Gastélum et al. 2017; Keith et al. 2005; Kowalska et al. 2015).

427 Considerando que os 31 isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* apresentaram  
428 características particulares nos testes fisiológicos e bioquímicos, diferenças morfológicas e  
429 diferenças na severidade entre os isolados, e considerando o alto polimorfismo genético,  
430 conforme revelado pela análise de rep-PCR, conclui-se que a população estudada apresenta  
431 elevada variabilidade. O conhecimento da variabilidade genética e versatilidade metabólica  
432 desses isolados poderão ser úteis no desenvolvimento de estratégias de manejo da doença por  
433 meio da utilização de diferentes isolados em programas de melhoramento genético de  
434 cultivares de cebola visando a resistência a podridão escorregadia.

435

### 436 **Agradecimentos**

437 Agradecemos à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
438 Superior) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela  
439 concessão da bolsa durante o período de realização desta tese de doutorado.

440

441

442

443 **Literatura citada**

444

445 Bachmann, H. S., Siffert, W., e Frey, U. H. 2003. Successful amplification of extremely GC-  
446 rich promoter regions using a novel ‘slowdown PCR’ technique. *Pharmacogenetics* 13:759–  
447 766.

448

449 Ballard, R. W., Palleroni, N. J., Doudoroff, M., Stanier, R. Y., e Mandel, M. 1970. Taxonomy  
450 of the aerobic *Pseudomonads*: *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, *P. alliicola* and *P.*  
451 *caryophylli*. *J. Gen. Microbiol.* 60:199–214.

452

453 Barbosa, J.C., e Maldonado Júnior, W. 2015. Experimentação agronômica & AgroEstat:  
454 sistema para análise estatística de ensaios agronômicos. Gráfica Multipress, Jaboticabal.

455

456 Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R., e Roller, C. 1998. Discrimination of  
457 *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia* species detectable in cystic fibrosis patients by  
458 PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36:2748-2751.

459

460 Bonasera, J. M., Asselin, J. A. E., e Beer, S. V. 2014. Identification of bacteria pathogenic to  
461 or associated with onion (*Allium cepa*) based on sequence differences in a portion of the  
462 conserved *gyrase B* gene. *J. Microbiol. Methods* 103:138–143.

463

464 Bradbury, J. F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International, London.

465

466 Burkholder, W. H. 1942. Three bacterial plant pathogens: *Phytomonas earyophylli* sp.n.,  
467 *Phytomonas alliicola* sp.n., and *Phytomonas manihotis* (Arthaud-Berthet et Sondar) Viégas.  
468 *Phytopathology* 32:141-149

469

470 Burkholder, W. H. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40:115–  
471 117.

472

473 Drevinek, P., e Mahenthiralingam, E. 2010. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis:  
474 epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:821-830.

475

- 476 El Balla, M. M. A., Hamid, A. A., e Abdelmageed, A. H. A. 2013. Effects of time of water  
477 stress on flowering, seed yield and seed quality of common onion (*Allium cepa* L.) under the  
478 arid tropical conditions of Sudan. *Agric Water Manag* 121:149-157.
- 479
- 480 Félix-Gastélum, R., Maldonado-Mendoza, I. E., Olivas-Peraza, N. G., Brito-Veja, H.,  
481 Peñuelas-Rubio, O., e Longoria-Espinoza, R. M. 2017. First report of slippery skin caused by  
482 *Burkholderia gladioli* in stored onion bulbs in Mexico. *Plant Dis.* 101:1030.
- 483
- 484 Frey, U. H., Lieb, W., Erdmann, J., Savidou, D., Heusch, G., Leineweber, K., Jakob, H.,  
485 Hense, H. W., Löwel, H., Brockmeyer, N. H., Schunkert, H., e Siffert, W. 2008.  
486 Characterization of the GNAQ promoter and association of increased Gq expression with  
487 cardiac hypertrophy in humans. *Eur. Heart J.* 29:888–897.
- 488
- 489 Gama, M. S. A., e Covello, V. N. 2016. Técnicas moleculares I – Detecção e identificação de  
490 bactérias fitopatogênicas. Pages 183-198in: *Manual de prática em fitobacteriologia*. 3rd ed. R.  
491 L. R. Mariano and E. B. SOUZA, eds. EDUFRPE, Recife.
- 492
- 493 Gava, C. A. T., e Tavares, S. C. C. H. 2007. *Cultivo da cebola no Nordeste*. Embrapa Semi-  
494 Árido, Petrolina.  
495 <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/162405/1/Cultivodacebola.pdf>
- 496
- 497 Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt,  
498 E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F. L., e Swings, J. 2005. Re-evaluating  
499 prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:733–739.
- 500
- 501 Gill, W. M. 1995. Bacterial diseases of *Agaricus* mushrooms. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* 33:34-  
502 55.
- 503
- 504 Ginther, J. L., Mayo, M., Warrington, S. D., Kaestli, M., Mullins, T., Wagner, D. M., Currie,  
505 B. J., Tuanyok, e A., Keim, P. 2015. Identification of *Burkholderia pseudomallei* Near-  
506 Neighbor Species in the Northern Territory of Australia. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e0003892.
- 507
- 508 Glaeser, S. P., e Kampfer, P. 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic  
509 taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* 38:237–245.

- 510 Jiao, Z., Kawamura, Y., Mishima, N., Yang, R., Li, N., Liu, X., e Ezaki, T. 2003. Need to  
511 differentiate lethal toxin-producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food  
512 poisoning: description of *B. gladioli* pathovar *cocovenenans* and an emended description of *B.*  
513 *gladioli*. Microbiol. Immunol. 47:915–925.
- 514
- 515 Karlin, S., Weinstock, G. M., e Brendel, V. 1995. Bacterial classifications derived from recA  
516 protein sequence comparisons. J. Bacteriol. 177:6881-93.
- 517
- 518 Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., e Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid  
519 multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Res. 30:3059-  
520 3066.
- 521
- 522 Katoh, K., e Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7:  
523 improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. 30:772-780.
- 524
- 525 Keith, L. M., Sewake, K. T., e Zee, F. T. 2005. Isolation and characterization of *Burkholderia*  
526 *gladioli* from orchids in Hawaii. Plant Dis. 89:1273-1278.
- 527
- 528 Kim, J., Kim, J. G., Kang, Y., Jang J. Y., Jog, G. J., Lim, J. Y., Kim, S., Suga, H., Nagamatsu,  
529 T., e Hwang, I. 2004. Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR  
530 regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. Mol. Microbiol.  
531 54:921–934.
- 532
- 533 Kowalska, B., Smolińska, U., e Oskiera, M. 2015. *Burkholderia gladioli* associated with soft  
534 rot of onion bulbs in Poland. J. Plant Pathol. 97:37-43.
- 535
- 536 Kuang, w., Luo, L., Gao, W., Lei, Y., lv, Q., e Jianqiang Li, J. 2017. Development of a Real-  
537 time Fluorescence Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of  
538 *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*. J Phytopathol. 165:82–90.
- 539
- 540 Kunz, V. L., Sirtoli, L. F., Furlan, L., Poletti, L., Primo, M. A., e Rodrigues, J. D. 2009.  
541 Produtividade de cebola sob diferentes fontes e modos de aplicação de adubos nitrogenados  
542 em cobertura. Revista Biodiversidade 8:31-37.
- 543

- 544 Lamovšek, J., Gerič Stare, B., Žerjav, M., e Urek, G. 2016. Soft rot of onion bulbs caused by  
545 *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* in Slovenia. J. Plant Pathol. 98:369-377.  
546
- 547 Lee, C. J., Lee, J. T., Kwon, J. H., Kim, B. C., e Park, W. 2005. Occurrence of bacterial soft  
548 rot of onion plants caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* in Korea. Australas. Plant  
549 Pathol. 34:287-292.  
550
- 551 Leite, D. L. 2014. Produção de Sementes de Cebola. Embrapa Clima Temperado, Pelotas.  
552
- 553 López, M. M., Bertolini, E., Caruso, P., Penyalver, R., Marco-Noales, E., Gorris, M. T.,  
554 Morente, C., Salcedo, C., e Llop, P. 2005. Advantages of an integrated approach for diagnosis  
555 of plant pathogenic bacteria in plant material. Phytopathol. Pol. 35:49–56.  
556
- 557 Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., e Bruijn, F. J. 1995. Differentiation of  
558 genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv.  
559 *vesicatoria*. Phytopathology 85:528-536.  
560
- 561 Mahenthiralingam, E., Baldwin, A., e Dowson, C.G. 2008. *Burkholderia cepacia* complex  
562 bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. J. Appl Microbiol.  
563 104:1539-51.  
564
- 565 Malavolta Júnior, V. A., Beriam, L. O. S., Almeida, I. M. G., Rodrigues Neto, J., e Robbs, C.  
566 F. 2008. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. Summa  
567 Phytopathol. 34:9-88.  
568
- 569 Nylander, A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary  
570 Biology Centre, Uppsala University.  
571
- 572 Oliveira, W. J. 2016. Etiologia da podridão de escama da cebola no semiárido brasileiro.  
573 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.  
574
- 575 Payne, G.W., Vandamme, P., Morgan, S. H., LiPuma, J. J., Coenye, T., Weightman, A. J.,  
576 Jones, T. H., e Mahenthiralingam, E. 2005. Development of a recA gene-based identification  
577 approach for the entire *Burkholderia* genus. Appl. Environ. Microbiol. 71: 3917–3927.

578

579 Quartiero, A., Faria, M. V., Resende, J. T. V., Figueiredo, A. S. T., Camargo, L. K. P., Santos,  
580 R. L., e Kobori, R. F. 2014. Desempenho agronômico, heterose e estabilidade fenotípica de  
581 genótipos de cebola em Guarapuava. Hort. bras. 32:259-266.

582

583 Katoh, K., Rozewicki, J., e Yamada, K.D. 2017. MAFFT online service: multiple sequence  
584 alignment, interactive sequence choice and visualization. Brief. Bioinformatics. doi:  
585 10.1093/bib/bbx108.

586

587 Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B.,  
588 Liu, L., Suchard, M. A., e Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: eficiente Bayesian  
589 phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61:539-542.

590

591 Schaad, N. W., Jones, J. B., e and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of  
592 Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul, MN.

593

594 Schroeder, B. K., e Humann, J. L. 2012. Effects of postharvest onion curing parameters on the  
595 development of sour skin and slippery skin in storage. Plant Dis. 96:1548-1555.

596

597 Schwartz, H. F., e Mohan, S. K. 2008. Compendium of Onion and Garlic Diseases and Pests.  
598 APS Press, St. Paul, MN.

599

600 Segonds, C., Heulin, T., Marty, N., e Chabanon, G. 1999. Differentiation of *Burkholderia*  
601 species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and  
602 application to cystic fibrosis isolates. J. Clin. Microbiol. 37:2201-2208.

603

604 Semeniuk, G., e Melthus, I.E. 1943. Botany and plant pathology section. Republic Iowa  
605 Agricultural Experiment Station 1942- 1943:125-145.

606

607 Sneath, P. H. A., Sokal, R. R., e Freeman, W. H. 1973. Numerical taxonomy. the principles  
608 and practice of numerical classification. Systematic Zoology. 24:263-268.

609

610 Sobiczewski, P., e Schollenberger, M. 2002 Bakteryjne choroby roślin ogrodnicych.

611 Podręcznik dla studentów. PWRiL, Warsaw, Poland.

- 612  
613 Spilker, T., Baldwin, A., Bumford, A., Dowson, C. G., Mahenthiralingam, E., e LiPuma, J, J.  
614 2009. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. J. Clin. Microbiol.  
615 47:2607-2610  
616
- 617 Staden, R., Beal, K. F., e Bonfield, J. K. 2000. The Staden Package, 1998. Pages 115-130 in:  
618 Bioinformatics methods and protocols. S. Misener and S. A. Krawetz, eds. Hulmana Press,  
619 New York.  
620
- 621 Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of  
622 large phylogenies. Bioinformatics 30:1312-1313.  
623
- 624 Stoyanova, M., Kizheva, Y., Chipeva, V., Bogatzevska, N., e Moncheva, P. 2011.  
625 Phytopathogenic *Burkholderia* species in bulb plants in Bulgaria. Biotechnol. & Biotechnol.  
626 Eq. 25:2477-2483.  
627
- 628 Ura, H., Furuya, N., Iiyama, K., Hidaka, M., Tsuchiya, K., e Matsuyama, N. 2006.  
629 *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath  
630 browning of rice plants. J. Gen. Plant Pathol. 72:98-103.  
631
- 632 Vitanov, M. 1976, Influence of the harvest date and storage conditions on the slippery skin  
633 (*Pseudomonas alliicola* Burk.) infection of onions bulbs. In: Gradinanska i Lozarska Nauka  
634 (Eds). Principles of Plant Pathology 13:63–71.  
635
- 636 Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., e Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA  
637 amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697-703.  
638
- 639 Wordell Filho, J. A., e Boff, P. 2006. Doenças de origem parasitária. Pages 19-126 in: Manejo  
640 fitossanitário da cebola., J. A. Wordell Filho, E. Rowe, P. A. S. Gonçalves, J. F. Debarba, P.  
641 Boff, and L. F. Thomazelli, eds. Epagri, Florianópolis, BR  
642
- 643 Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., e  
644 Arakawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the

- 645 genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia*  
646 *cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol. 36:1251-1275.  
647
- 648 Young, J. M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C. G., e Robbs, C. F. 1978. A  
649 proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. New Zeal. J. Agr.  
650 Res. 21:153-177.  
651

652 **Tabela 1.** Perfil genômico e patogênico dos isolados associados a podridão escorregadia no  
 653 semiárido nordestino

Isolados <sup>x</sup>	Cidade	País	Grupo rep-PCR	Agressividade <sup>y</sup>
CCRMBG143	Petrolândia-PE	Brasil	09	29,58 a <sup>z</sup>
CCRMBG13	Petrolândia-PE	Brasil	03	29,11 a
CCRMBG172	Petrolândia-PE	Brasil	06	28,64 a
IBSBF534	Petrolândia-PE	Brasil	01	28,16 a
CCRMBG251	Petrolândia-PE	Brasil	06	27,69 a
CCRMBG243	Petrolândia-PE	Brasil	01	27,22 a
CCRMBG223	Petrolândia-PE	Brasil	06	26,75 a
CCRMBG222	-	Brasil	06	26,27 a
CCRMBG212	Orocó-PE	Brasil	06	25,80 a
CCRMBG194	Orocó-PE	Brasil	01	25,33 a
CCRMBG175	Orocó-PE	Brasil	01	24,86 b
CCRMBG165	Orocó-PE	Brasil	01	24,38 b
CCRMBG160	Petrolândia-PE	Brasil	01	23,91 b
CCRMBG143	Orocó-PE	Brasil	09	23,44 b
CCRMBG70	Orocó-PE	Brasil	01	22,97 b
CCRMBG47	Orocó-PE	Brasil	07	22,50 b
CCRMBG46	Orocó-PE	Brasil	07	22,02 b
CCRMBG44	Belém do São Francisco-PE	Brasil	07	21,55 b
CCRMBG43	Petrolândia-PE	Brasil	07	21,08 b
CCRMBG42	Belém do São Francisco-PE	Brasil	07	20,61 c
CCRMBG39	-	Brasil	01	20,13 c
CCRMBG07	Casa Nova-BA	Brasil	04	19,90 c
CCRMBG38	Casa Nova-BA	Brasil	02	19,66 c
CCRMBG36	-	Brasil	07	19,19 c
CCRMBG03	Mucugê-BA	Brasil	01	18,85 c
CCRMBG26	Casa Nova-BA	Brasil	05	18,72 c
CCRMBG24	Casa Nova-BA	Brasil	08	18,24 c
CCRMBG11	Casa Nova-BA	Brasil	04	17,77 d
CCRMBG08	Casa Nova-BA	Brasil	01	17,30 d
CCRMBG05	Casa Nova-BA	Brasil	04	16,08 d
CCRMBG01	Irêce-BA	Brasil	01	14,81 d
CCRMBG04	-	USA	01	9,77 e

654 <sup>x</sup>CCRMBG: Coleção de Cultura Rosa Mariano *Burkholderia gladioli*; IBSBF 534 =  
 655 ATCC19302. IBSBF: Coleção de Cultura de Fitobactérias do Instituto Biológico, São Paulo,  
 656 Brasil; ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA. Todas os isolados  
 657 estão disponíveis na Coleção de Culturas de Fitobactérias Rosa Mariano (CCRM) alojadas no

658 Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Pernambuco,  
659 Brasil).

660 <sup>y</sup>Agressividade: médias obtidas com base no desenvolvimento da lesão (cm) causadas pelos  
661 os isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola*.

662 <sup>z</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre  
663 si pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0.05$ ).

664

665 **Tabela 2.** Identidade e seqüências tipos dos isolados usados nas reconstruções filogenéticas

Espécie	Isolados	ST <sup>x</sup>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>lepA</i>	<i>trpB</i>
<i>Burkholderia gladioli</i>						
<i>pv. alliiicola</i>	<b>LMG 2121<sup>T</sup></b>	-	sequenciado	sequenciado	sequenciado	sequenciado
<i>B. gladioli pv.</i>						
<i>gladioli</i>	<b>LMG 2216<sup>T</sup></b>	-	HQ849196 <sup>Y</sup>	AY619665	HQ398518	CP023523
<i>B. plantarii</i>	<b>AU8269</b>	552	401 <sup>Z</sup>	253	302	273
<i>B. glumae</i>	<b>ATCC 33617</b>	1200	394	251	296	269
<i>B. mallei</i>	<b>ATCC 23344</b>	-	CP010348	CP010348	CP010348	CP010348
<i>B. pseudomallei</i>	<b>K96243</b>	-	CP009538	CP009538	CP009538	CP009538
<i>B. oklahomensis</i>	<b>EO147</b>	-	CP013358	CP013358	CP013358	CP013358
<i>B. contaminans</i>	<b>LMG 23361<sup>T</sup></b>	102	80	89	105	70
<i>B. lata</i>	<b>LMG 22485<sup>T</sup></b>	101	38	44	30	42
<i>B. metallica</i>	<b>LMG 24068<sup>T</sup></b>	511	268	187	202	242
<i>B. cepacia</i>	<b>LMG1222<sup>T</sup></b>	10	44	4	4	48
<i>B. arboris</i>	<b>LMG 24066<sup>T</sup></b>	492	415	149	316	239
<i>B. pyrrocinia</i>	<b>LMG 14191<sup>T</sup></b>	41	250	108	98	86
<i>B. stabilis</i>	<b>LMG 14294<sup>T</sup></b>	50	14	21	70	16
<i>B. seminalis</i>	<b>LMG 24067<sup>T</sup></b>	473	386	144	286	240
<i>B. cenocepacia</i> IIIC	<b>LMG 21462</b>	44	41	47	33	44
<i>B. cenocepacia</i> IID	<b>LMG 19230</b>	102	76	89	105	70
<i>B. cenocepacia</i> IIB	<b>LMG 18830</b>	39	121	49	94	9
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<b>LMG 16656<sup>T</sup></b>	31	9	14	11	79
<i>B. anthina</i>	<b>LMG 20980<sup>T</sup></b>	86	26	31	19	28
<i>B. ambifaria</i>	<b>LMG 19182<sup>T</sup></b>	77	123	98	103	49
<i>B. diffusa</i>	<b>LMG 24065<sup>T</sup></b>	164	68	87	53	41
<i>B. vietnamensis</i>	<b>LMG 10929<sup>T</sup></b>	65	15	23	35	17
<i>B. latens</i>	<b>LMG 24064<sup>T</sup></b>	238	209	150	176	150
<i>B. territorii</i>	<b>LMG 28158<sup>T</sup></b>	794	570	351	398	386
<i>B. pseudomultivorans</i>	<b>LMG 26883<sup>T</sup></b>	536	205	250	171	304
<i>B. multivorans</i>	<b>LMG 13010<sup>T</sup></b>	397	117	81	37	97
<i>B. dolosa</i>	<b>LMG 18943<sup>T</sup></b>	72	18	24	72	20
<i>B. ubonensis</i>	<b>LMG 20358<sup>T</sup></b>	299	200	216	243	153
<i>B. stagnalis</i>	<b>LMG 28156<sup>T</sup></b>	787	564	345	300	381
<i>B. puraquae</i>	<b>LMG 29660<sup>T</sup></b>	1065	690	404	459	450
<i>B. fungorum</i>	<b>LMG 16225<sup>T</sup></b>	499	3	3	1	1

666 <sup>x</sup>Seqüências tipos (STs) com base no perfil alélico disponíveis do banco de dados do complexo *B. cepacia*

667 PubMLST Bcc

668 <sup>y</sup>Código de acesso dos isolados depositados no banco de dados disponíveis no genbank.669 <sup>z</sup>Código de acesso de cada perfil alélico depositado no banco de dados do complexo *B. cepacia* PubMLST Bcc.

670 **Tabela 3.** Perfil bioquímico gerado pelo sistema Biolog GEN III Micro-Plate™ de isolados  
 671 de *Burkholderia gladioli*

<b>Testes bioquímicos</b>	<b>IBSBF 534</b>	<b>CCRM BG 13</b>	<b>CCRM BG 38</b>	<b>CCRMB CG 47</b>	<b>CCRMB G 160</b>	<b>CCRMB G 222</b>	<b>CCRMB G 251</b>
Controle negativo	-	-	-	-	-	-	-
Dextrina	+	+	-	+	-	+	-
D-Maltose	-	-	-	-	-	-	-
D-Trealose	+	-	-	-	+	+	+
D-Celobiose	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	+	+	+	+	-	+	-
Sacarose	+	-	-	-	-	-	+
D-Turanose	-	-	-	-	-	-	-
Estaquiiose	-	-	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+	+	+
pH 6	+	+	+	+	+	+	+
pH 5	+	+	+	+	+	+	+
D-Rafinose	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-lactose	-	-	-	-	-	-	-
D-Melibiose	-	-	+	-	+	+	-
$\beta$ -Metil-D- Glicosídeo	-	-	-	-	-	-	-
D-Salicina	+	-	-	-	-	-	+
N-acetil-D- Glucosamina	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil- $\beta$ -D- Manaçúcar	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil-D- Galactosamina	+	-	-	-	-	-	-
N-Acetil ácido neuramínico	-	-	-	-	-	-	-
1% de NaCl	+	+	+	+	+	+	+
4% de NaCl	-	-	-	-	-	+	-
8% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	+	-	+	+	+	+

D-Manose	+	+	-	+	+	+	+
D-Frutose	+	+	-	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	-	+	+	+	+
3-Metil Glucose	-	-	+	-	-	-	-
D-Fucose	+	+	+	+	+	+	-
L-Fucose	+	+	+	+	+	+	+
L-Ramnose	+	-	+	-	-	-	-
Inosina	+	-	+	-	-	-	-
D-Sódio a 1%		+	+	+	+	+	+
Lactato	+						
Ácido fusídico	+	+	+	+	+	+	+
D-Serina	-	-	-	-	-	-	-
D1 D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
D2 D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+
D3 D-Arabitol	+	+	+	+	+	+	+
D4 mio-Inositol	+	+	+	+	+	-	+
Glicerina	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose-6-PO4	+	+	+	+	+	+	+
D-frutose-6-PO4	+	+	+	+	+	+	+
D-Ácido Aspártico	+	+	+	+	+	-	-
D-Serina	-	+	-	+	-	-	-
Troleandomicina	+	+	+	+	+	+	+
A rifamicina SV	+	+	+	+	+	+	+
Minociclina	-	-	-	-	-	-	+
Gelatina	+	-	-	-	+	-	+
Glicil-L-prolina	+	+	+	+	+	+	-
L-Alanina	+	+	+	+	+	+	+
L-Arginina	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-aspártico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-glutâmico	+	+	+	+	+	+	+
L-Histidina	+	+	+	+	+	+	+
L-piroglutâmico		+	+	+	-	+	+
ácido	+						
L-Serina	+	+	+	+	+	+	+

Lincomicina	+	+	+	+	+	+	+
Guanidina HCl	-	-	-	-	-	-	+
Niaproof 4	+	+	+	+	+	-	+
Pectina	-	-	+	-	-	+	+
Ácido D- Galacturónico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L- Galactonico	-	-	-	-	-	-	-
Lactona Ácido D- glucónico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido D- glucurônico	+	+	+	+	+	+	+
Glucuronamida	+	+	+	+	+	+	-
Ácido múcico	+	+	+	+	+	+	-
Ácido quínico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido D-sacárico	+	+	+	+	+	+	+
Vancomicina	+	+	+	+	+	+	-
Tetrazólio violeta	+	+	+	+	+	+	-
Tetrazólio azul	+	+	+	+	+	+	+
p-hidroxi- Fenilacético ácido	-	-	-	-	-	-	+
Piruvato de metilo	+	+	+	+	+	+	+
Ácido D-láctico methyl Ester	-	-	-	-	-	+	-
D, L ácido láctico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido cítrico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido $\alpha$ -Keto- glutárico	+	+	+	+	-	+	-
G7 D-ácido málico	+	+	+	+	+	+	-
L-ácido málico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido Bromo- succínico	+	+	+	-	+	+	+

nalidíxico	-	-	-	-	-	-	-
Cloreto de lítio	-	-	-	-	-	-	-
Potássio telurito	-	-	-	-	-	+	+
Tween 40	+	+	+	+	+	+	+
Ácido $\gamma$ -Amino- Butyric	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -Hidroxi-Ácido butírico	+	-	+	-	+	+	-
$\beta$ -Hidroxi-D, L- Ácido butírico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido $\alpha$ -Keto- butírico	+	+	+	+	+	+	-
Ácido acetoacético	+	-	-	-	-	+	-
Ácido propiónico	+	-	-	-	-	+	-
Ácido acético	+	+	+	+	+	+	+
Ácido fórmico	+	+	+	+	+	+	+
Aztreonam	-	-	-	-	-	+	+
O butirato de sódio	-	-	-	-	-	-	+
Bromato de Sódio	-	-	-	-	-	-	-

672

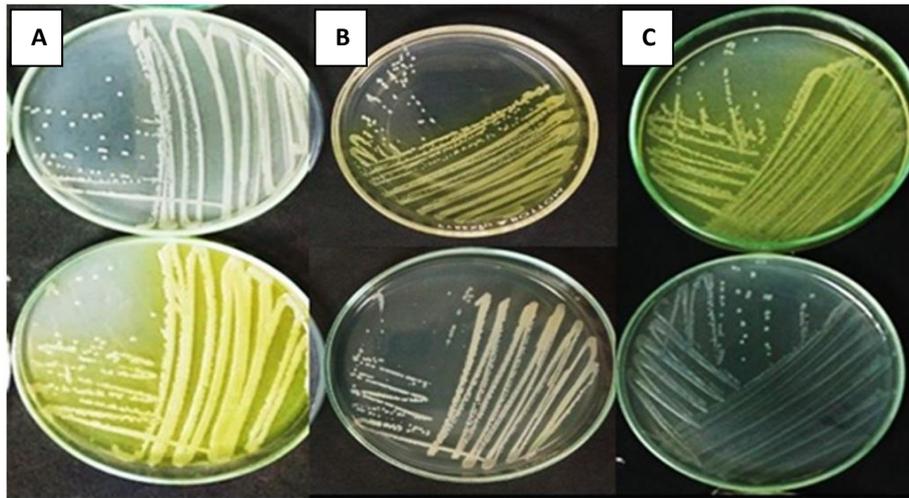
673

674

675

676

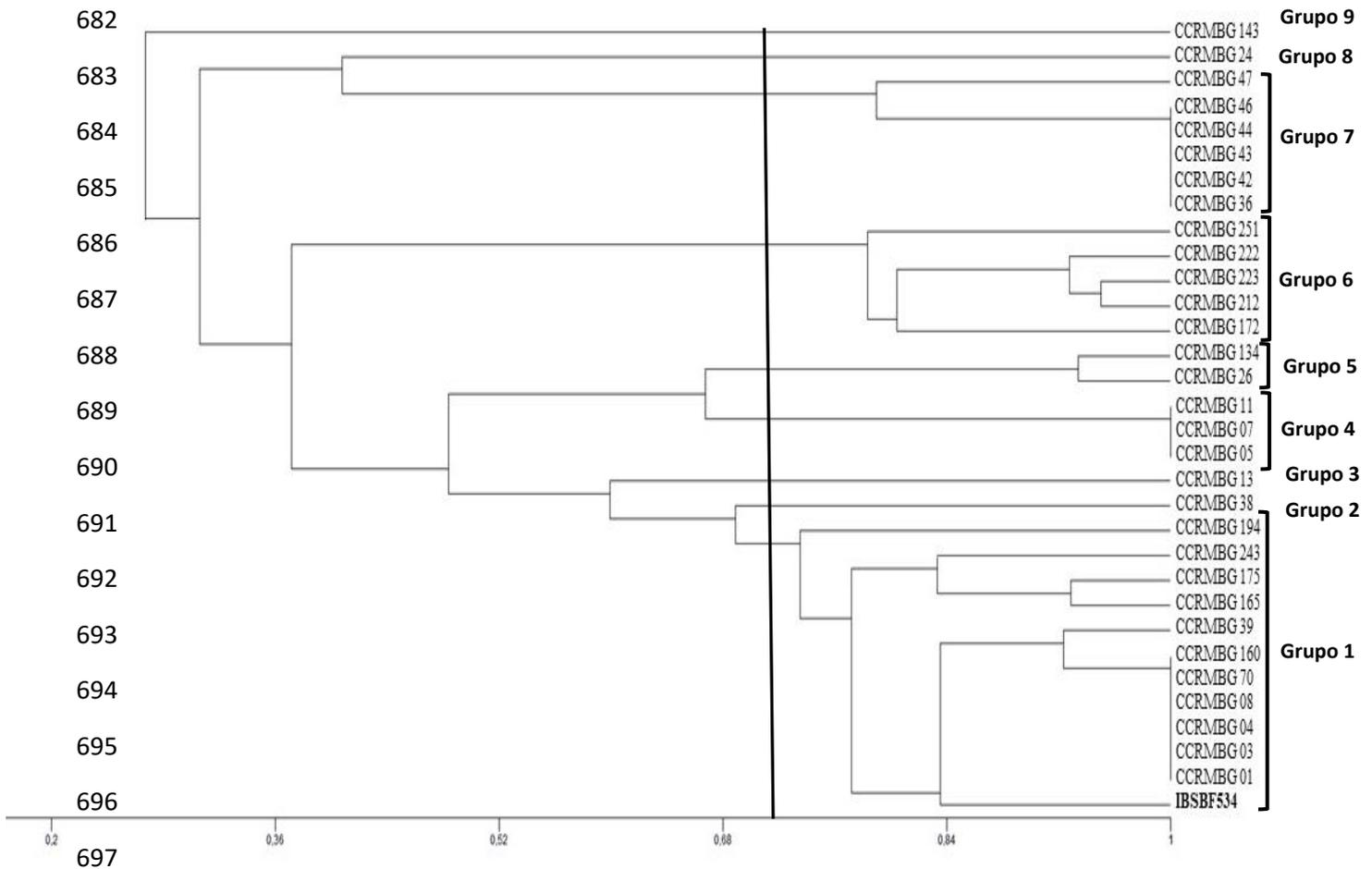
677



678

679 **Figura 1.** Diferenças na coloração das colônias de isolados cultivados em meio KMB (A),  
680 ágar nutritivo (B) e NYDA (C).

681



698 **Figura 2.** Dendrograma baseado no método UPGMA de acordo com os perfis gerados por  
 699 rep-PCR (BOX, ERIC e REP), mostrando as relações genéticas entre 31 isolados de  
 700 *Burkholderia gladioli* causadores de podridão escorregadia da cebola no semiárido do Brasil.

701

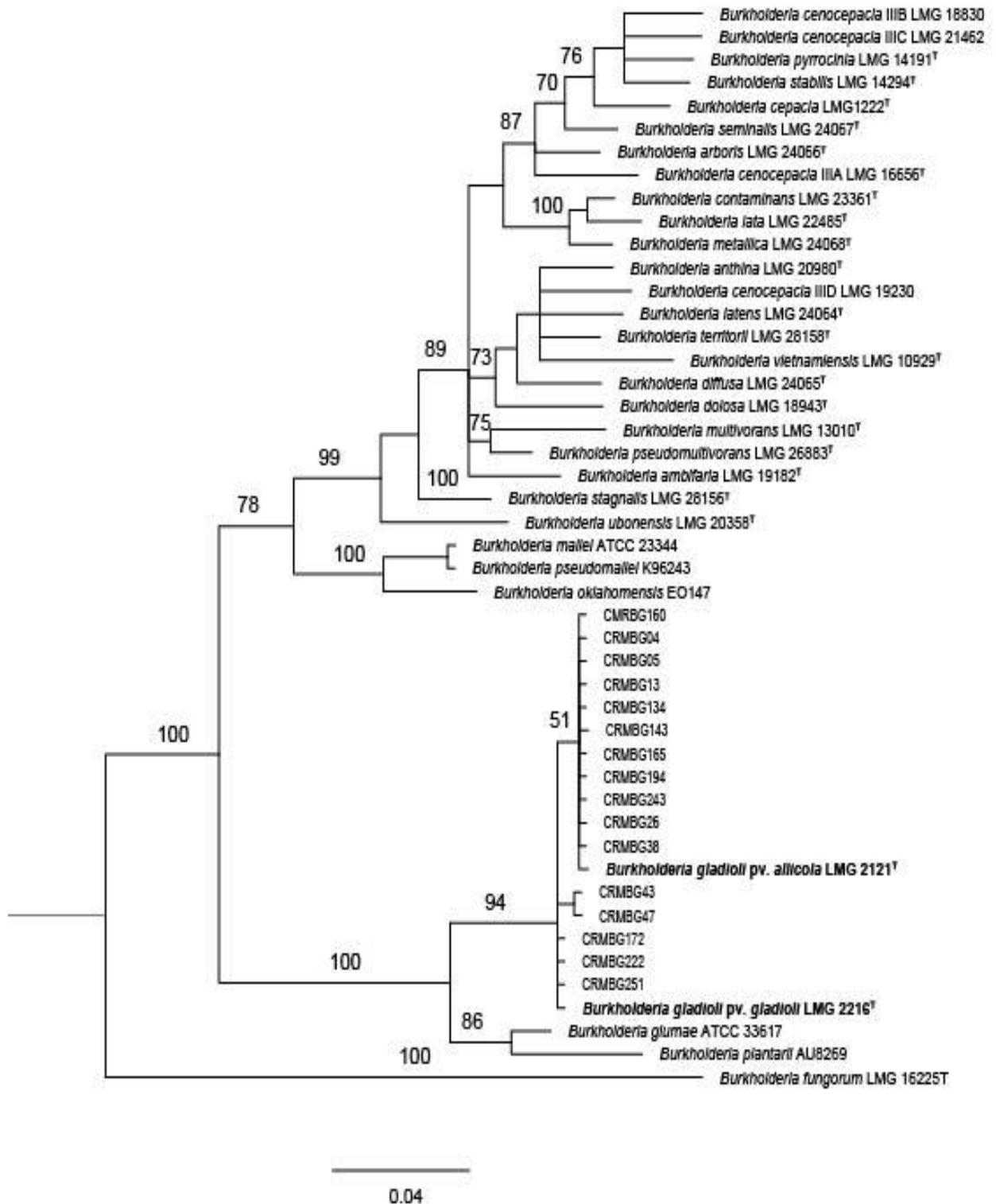
702

703

704

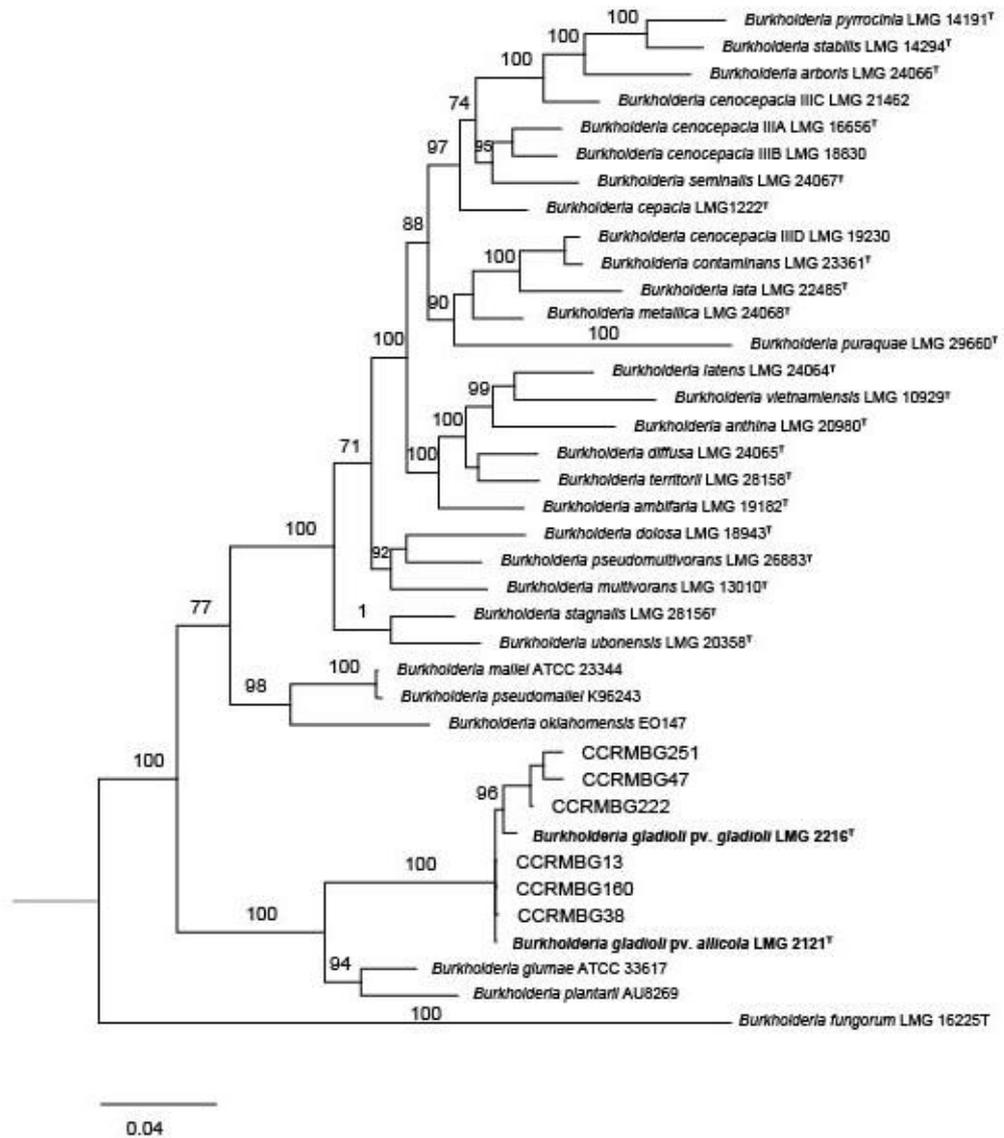
705

706



707 **Figura 3.** Árvore filogenética de Inferência Bayesiana baseada em sequências do gene *recA*,  
 708 mostrando as relações dos isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* associados a podridão  
 709 escorregadia da cebola no semiárido brasileiro e os taxos relacionados. *Burkholderia*  
 710 *fungorum* foi o outgroup usado. Os suportes de probabilidade posterior são mostrados nos  
 711 ramos para valores acima de 70%, respectivamente.

713



714

715

716 **Figura 4.** Árvore filogenética concatenada de Inferência Baeyiana baseada nas sequências  
 717 dos genes *gyrB*, *lepA*, *recA* e *trpB*, mostrando as relações dos isolados de *B. gladioli* pv.  
 718 *allicola* associados a podridão escorregadia da cebola no semiárido brasileiro e os taxas  
 719 relacionados. *Burkholderia fungorum* foi o outgroup utilizado. Os suportes de probabilidade  
 720 posterior são mostrados nos ramos para valores acima de 70%, respectivamente.

721

### **CAPÍTULO III**

---

## **Caracterização Polifásica de Isolados do Complexo *Burkholderia cepacia* Associados a Podridão das Escamas de Cebola no Semiárido Brasileiro**

1 **Caracterização polifásica de isolados do complexo *Burkholderia cepacia* associados a**  
2 **podridão das escamas de cebola no semiárido brasileiro**

3

4 **Ana D. B. Baia**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,  
5 Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil; **Adriano M. F. Silva**, Universidade Federal de  
6 Alagoas, Departamento de Agronomia, Rio Largo, 57072-900, Alagoas; **Bárbara G. Ribeiro**,  
7 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 52171-900,  
8 Pernambuco, Brasil; **Willams J. Oliveira**, Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
9 Departamento de Agronomia, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil; **Valdir de Queiroz**  
10 **Balbino**, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, 50670-  
11 901, Pernambuco, Brasil; **Elineide B. Souza**, Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
12 Departamento de Microbiologia, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil; **Marco A. S. Gama**  
13 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 52171-900,  
14 Pernambuco, Brasil.

15 Autor correspondente: Marco A. S. Gama; marco.gama@ufrpe.br

16

17 **Resumo**

18 *Burkholderia cepacia* foi originalmente descrita como agente causal da podridão bacteriana  
19 dos bulbos de cebola. Contudo, poucos estudos taxonômicos usando técnicas moleculares  
20 confiáveis voltados para a compreensão da diversidade das espécies do complexo  
21 *Burkholderia cepacia* (CBC) causadoras da doença foram realizados. Portanto, o presente  
22 estudo teve como objetivo estudar 84 isolados do CBC oriundos de bulbos de cebolas  
23 apresentando sintomas típicos da doença no semiárido brasileiro por meio de uma análise  
24 polifásica. A análise de rep-PCR evidenciou uma elevada variabilidade genética entre os  
25 isolados, sendo observada a formação de 43 grupos a 80% de similaridade. A análise de  
26 inferência Bayesiana (IB) realizada com o gene *recA*, com 50 isolados selecionados com base  
27 na variabilidade encontrada por meio de rep-PCR, permitiu o agrupamento dos isolados em  
28 quatro clados: clado I formado por 29 isolados que se agruparam com os isolados tipo de *B.*  
29 *ceenocepacia* linhagem IIIB, o clado II formado por 11 isolados que se agruparam com o  
30 isolado tipo de *B. ceenocepacia* linhagem IIIA, o clado III composto por um isolado  
31 (CCRMBC51) que não se agrupou com nenhuma espécie conhecida, e o clado IV formado  
32 por 10 isolados que também não se agruparam com nenhuma espécie conhecida. A análise da  
33 sequência multilocus (MLSA) realizada com os isolados CCRMBC02, CCRMBC16,  
34 CCRMBC18, CCRMBC31, CCRMBC33, CCRMBC45, CCRMBC51, CCRMBC60,

35 CCRMBC64, CCRMBC67, CCRMBC74, CCRMBC81, CCRMBC99, CCRMBC157 e  
36 CCRMBC199 e CCRMBC171, por meio de IB com os genes *recA*, *gyrB*, *atpD*, *gltB*, *lepA*,  
37 *trpB* e *phaC*, confirmou os resultados observados o gene *recA*. A análise de MLST permitiu a  
38 detecção de oito sequências tipos, das quais sete foram sequencias novas. Foram observadas  
39 diferenças significativas entre a severidade da doença provocada pelos isolados estudados.  
40 Este é o primeiro estudo polifásico voltado para entender a diversidade dessas bactérias  
41 associadas a podridão em escamas de cebola, ampliando assim o nosso conhecimento da  
42 diversidade de espécies do complexo *B. cepacia* associada com a doença no semiárido  
43 brasileiro.

44

#### 45 **Abstract**

46 *Burkholderia cepacia* was originally described as causal agent of bacterial rot of onion bulbs.  
47 However, few taxonomic studies using reliable molecular techniques aimed at understanding  
48 the diversity of *Burkholderia cepacia* (CBC) species causing the disease were performed.  
49 Therefore, the present study aimed to study 84 isolates of BCC from onion bulbs presenting  
50 typical symptoms of the disease in the Brazilian semiarid region through a polyphase analysis.  
51 The rep-PCR analysis revealed a high genetic variability among the isolates, with 43 groups  
52 being observed at 80% of similarity. The Bayesian inference (IB) analysis performed with the  
53 *recA* gene, with 50 isolates selected based on the variability found by means of rep-PCR,  
54 allowed the clustering of the isolates in four clades: clade I composed of 29 isolates that were  
55 grouped with isolated type *B. cenocepacia* lineage IIIB, clade II formed by 11 isolates that  
56 were grouped with the isolated type of *B. cenocepacia* lineage IIIA, the clade III composed by  
57 an isolate (CCRMBC51) that did not cluster with any known species, and the clade IV formed  
58 by 10 isolates that did not cluster with any known species. The MLSA carried out with the  
59 isolates CCRMBC02, CCRMBC18, CCRMBC18, CCRMBC33, CCRMBC45, CCRMBC51,  
60 CCRMBC60, CCRMBC64, CCRMBC67, CCRMBC74, CCRMBC74, CCRMBC81,  
61 CCRMBC157 and CCRMBC199 and CCRMBC171, by means of IB with the *recA*, *gyrB*,  
62 *atpD*, *gltB*, *lepA*, *trpB* and *phaC*, confirmed the results observed for the *recA* gene. MLST  
63 analysis allowed the detection of eight sequence types, of which seven were new sequences.  
64 Significant differences were observed between the severity of the disease caused by the  
65 isolates studied. This is the first polyphase study to understand the diversity of these bacteria  
66 associated with sour skin of onion, thus expanding our knowledge of the diversity of species  
67 of *B. cepacia* complex associated with the disease in the Brazilian semiarid.

68

69 A podridão das escamas da cebola foi originalmente descrita em 1950, sendo a causa  
70 atribuída à bactéria *Burkholderia cepacia* (Palleroni e Holmes) Yabuuchi et al. (ex  
71 *Pseudomonas cepacia* (Burkholder) Palleroni e Holmes) (Burkholder 1950). Com o passar  
72 dos anos, isolados oriundos de diferentes locais, incluindo pacientes com fibrose cística,  
73 amostras clínicas, animais, plantas, rizosfera, solo, água e contaminantes industriais, foram  
74 classificados como *B. cepacia* (Coenye et al. 2001). Essa elevada diversidade apresentada  
75 entre os isolados classificados como *B. cepacia* levou a separação dos mesmos em cinco  
76 genovares (espécies genômicas fenotipicamente similares), os quais foram referidos como  
77 complexo *Burkholderia cepacia* (CBC) (Vandamme et al. 1997). Atualmente, o CBC abriga  
78 22 espécies distintas (Martina et al., 2018) que apresentam elevada similaridade entre as  
79 sequências dos genes 16S rDNA (98-100%) e *recA* (94-95%), moderados níveis de hibridação  
80 DNA-DNA (30-50%) (Coenye et al. 2001) e valores de identidade média de nucleotídeos  
81 (Average Nucleotide Identity - ANI) do genoma abaixo de 90% (85,04 a 89,92%) (Peeters et  
82 al. 2013; Vanlaere et al. 2009).

83 Além de *B. cepacia* (Burkholder 1950), *B. cenocepacia* (Oliveira et al. 2017), *B.*  
84 *multivorans* (Wordell Filho e Boff 2006) e *B. gladioli* pv. *alliicola* (Burkholder, 1942)  
85 também foram relatadas causando podridão em bulbos de cebola, embora esta última bactéria  
86 não pertença ao CBC (Martina et al. 2018). As espécies do CBC apresentam-se como um  
87 grupo desafiador de organismos com características biológicas conflitantes (Govan et al.  
88 2000). Trata-se de um grupo de bactérias versáteis que ocupam uma variedade  
89 surpreendentemente ampla de nichos ecológicos (Coenye e Vandamme 2003), abrigando  
90 patógenos de plantas e humanos, agentes biocontroladores (Parke e Gurian-Sherman, 2001),  
91 promotores do crescimento de plantas e biorremediadores de xenobióticos recalcitrantes  
92 (Coenye e Vandamme 2003).

93 Diversos métodos moleculares, com elevado nível de confiança, têm sido utilizados  
94 para avaliar o comportamento taxonômico das espécies do CBC (Coenye et al. 2002). Dentre  
95 eles, as abordagens baseadas no uso de sequências multilocus surgiram como ferramentas  
96 poderosas e objetivas que se mostraram úteis para fins de identificação e classificação dessas  
97 espécies (Vandamme e Dawyndt 2011). Dentre essas análises, a tipagem de sequências  
98 multilocos (multilocus sequence typing - MLST) destaca-se pelo fato de ser um método  
99 globalmente aceito que fornece alta resolução para separação de espécies (Vandamme e  
100 Dawyndt 2011), sendo utilizado para tipagem e avaliação da estrutura populacional de  
101 isolados do CBC (Baldwin et al., 2005, Spilker et al. 2009). Adicionalmente, a análise de  
102 sequências multilocos (multilocus sequence analysis - MLSA), que utiliza as sequências

103 nucleotídicas dos locus alélicos para realização de análises filogenéticas, também tem sido  
104 amplamente utilizada para identificação das relações filogenéticas entre essas espécies  
105 (Peeters et al. 2013; Vanlaere et al. 2009), sendo considerada uma das técnicas mais  
106 adequadas para esta finalidade (Christensen et al. 2007).

107 Visto que ainda não existem estudos sobre a diversidade das espécies do CBC que  
108 estão envolvidas com a podridão das escamas da cebola no semiárido brasileiro, bem como  
109 nas demais regiões, o presente estudo teve como objetivo identificar as espécies causadoras da  
110 doença nessa região por meio de uma caracterização polifásica. Dessa forma, as técnicas de  
111 rep-PCR, MLSA e MLST, aliadas aos perfis bioquímico, fisiológico e patológico foram  
112 utilizadas para lançar luz sobre a diversidade das espécies do CBC causadoras da podridão  
113 das escamas nessa região.

114

## 115 **Materiais e Métodos**

116 **Coleção de isolados, condições de cultivo, extração de DNA e seleção de isolados**  
117 **do complexo *B. cepacia*.** Cento e dezenove isolados depositados na coleção de Culturas de  
118 Bactérias Fitopatogênicas do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) da Universidade  
119 Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), obtidos no ano de 2016, a partir de bulbos de cebola  
120 coletados nos estados de Pernambuco e Bahia apresentando sintomas característicos da  
121 podridão em escama, foram recuperados no meio TB-T (2.0 g/litro glucose; 1.0 g/litro  
122 asparagina; 1.0g/litro NaHCO<sub>3</sub>; 0.5 g/litro KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.01 g/litro MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0.05 g/litro  
123 trypan blue e 0.02 g/litro tetraciclina em ddH<sub>2</sub>O), o qual é seletivo para espécies do complexo  
124 *B. cepacia* presentes no solo (Hagedorn et al., 1987). Em seguida, os isolados com colônias  
125 características do gênero *Burkholderia* (redondas, pequenas, circulares, convexas, com bordas  
126 lisas, cremosas com coloração branca ou amarelada) foram repicados em meio de cultura  
127 NYDA (20 g/litro de ágar; 10 g/litro de dextrose; 5 g/litro de extrato de levedura; 3 g/litro de  
128 extrato de carne e 5 g/litro de peptona) para extração do DNA genômico.

129 A extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando-se o protocolo de Gama e  
130 Covello (2016). O DNA foi quantificado por meio de espectrofotômetro utilizando-se o  
131 biodrop Biochrom™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ajustando-se a concentração  
132 10 ng/μl, seguindo-se o armazenamento a -20° C. Posteriormente, o DNA dos isolados foi  
133 analisado com os *primers* CMG-23-1 (5'ATAGCTGGTTCTCTCCGAA3') e G-23-2  
134 (5'CCTACCATGCAYATAAAT3'), os quais amplificam um fragmento de 388 pb da região  
135 23S tRNA e são específicos para identificação de isolados de *B. gladioli*, incluindo os  
136 patovares *alliicola* e *gladioli* (Bauernfeind et al. 1998). Os isolados que apresentaram reação

137 PCR-negativa foram considerados como pertencentes ao CBC, sendo selecionados para o  
138 presente estudo. Para fins comparativos, o isolado tipo de *B. cepacia* (IBSBF567<sup>TS</sup>) foi  
139 utilizado nas análises descritas a seguir.

140

141 **rep-PCR.** A genotipagem dos isolados descritos na Tabela 1 foi realizada utilizando-  
142 se os marcados moleculares REP, ERIC e BOX-PCR (coletivamente descritos como rep-  
143 PCR), conforme descrito por Louws et al. (1994). As reações de REP, ERIC e BOX foram  
144 compostas por 1X PCR Master Mix 2X (0,05 U /  $\mu$ l de Taq DNA-polimerase, tampão de  
145 reação, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de cada dNTP), 2  $\mu$ M de cada iniciador e 200 ng de DNA.  
146 As amostras foram amplificadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Waltham, EUA).  
147 Controles brancos (reações livres de DNA) foram incluídos em todos os experimentos para  
148 avaliar a presença de contaminantes. As reações de amplificação foram coradas usando uma  
149 mistura contendo 10  $\mu$ l da reação, 3  $\mu$ l de 6X DNA Loading Dye (Fermentas Life Sciences,  
150 Ontário, Canadá) e 2  $\mu$ l de SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain (10X) (Life Technologies, São Paulo,  
151 Brasil). Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a  
152 1,5% por 3 h a 80 V, em tampão TBE 1X (5,4 g de Tris-base, 2,75 g de ácido bórico e 0,375 g  
153 de EDTA, para um volume final de 1000 ml), utilizando-se GeneRuler 1 kb DNA ladder  
154 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). O gel foi posteriormente fotodocumentado. As  
155 análises foram realizadas em duplicata.

156 Os perfis de amplificação gerados com os iniciadores REP, ERIC e BOX foram  
157 analisados visualmente com base na presença (1) ou ausência (0) de bandas de 250 a 10000  
158 pb. Apenas bandas reprodutíveis (presentes em ambas as réplicas) foram registradas. Os  
159 dados de cada marcador foram analisados separadamente e em conjunto, utilizando o  
160 programa MVSP (Multivariate Statistic Package) versão 3.2. Para determinar as relações  
161 genéticas entre os isolados, utilizou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard (Sneath et al.  
162 1973) e o método de agrupamento de UPGMA (unweighted pair group method using  
163 arithmetic averages).

164

165 **Amplificação e sequenciamento do gene *recA*.** Um fragmento de 376 pb do gene  
166 *recA* de 50 isolados (Tabela 1) foi amplificado utilizando os *primers* Bur3 e Bur5 (Ginther et  
167 al. 2015). As reações foram compostas por 1X PCR Master Mix 2X (0,05 U/ $\mu$ l de Taq DNA  
168 polimerase, tampão de reação, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de cada, dNTP), 1  $\mu$ M de cada  
169 iniciador, 1  $\mu$ M de DMSO e 100 ng de DNA. As amostras foram amplificadas em  
170 termociclador PTC-100. Controles brancos foram incluídos para avaliar a presença de

171 contaminantes. As reações de amplificação foram coradas, visualizados e fotodocumentadas  
172 conforme já descrito. A purificação das reações foi realizada com as enzimas Exonuclease I  
173 (Exo I) e fosfatase alcalina de camarão (Shrimp Alkaline Phosphatase - rSAP) de acordo com  
174 as instruções do fabricante (New England Biolabs Inc., Ipswich, EUA). O sequenciamento foi  
175 realizado em sequenciador ABI modelo 3700 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia)  
176 de acordo com a recomendação do fabricante, e o kit de reação de sequenciamento BigDye  
177 Terminator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

178 A análise da qualidade das sequências de nucleotídeos e a montagem dos consensos  
179 foram realizadas com Staden Package (Staden et al. 2000) e, posteriormente, analisadas com o  
180 algoritmo Blastn do National Center for Biotechnology Information (NCBI)  
181 (<http://www.ncbi.org/>). As sequências obtidas neste estudo também foram analisadas em  
182 conjunto com as sequências disponíveis no banco de dados PubMLST *Burkholderia cepacia*  
183 complex (PubMLST Bcc) (<http://pubmlst.org/bcc>). Para as construções das árvores  
184 filogenéticas foram utilizadas sequências dos isolados tipo das 22 espécies do CBC  
185 disponíveis no Genbank acrescidas de sequências das quatro linhagens filogenéticas de *B.*  
186 *cenoecepacia* disponíveis no PubMLST Bcc.

187 O múltiplo alinhamento das sequências (MSA) foi realizado com a versão online do  
188 MAFFT v.7 (Kato et al. 2002; Kato e Standley 2013; Kato et al. 2017) com o método  
189 iterativo G-INS-i e com a matriz de pontuação de nucleotídeos 200PAM / k = 2. Em seguida,  
190 o alinhamento para cada coluna no MSA foi refinado usando o algoritmo GUIDANCE2  
191 implementado no Guidance2 Server em <http://guidance.tau.ac.il/> com as configurações de  
192 tratamento padrão. O alinhamento usado foi o resultado mascarado com uma pontuação de  
193 99% dos resíduos específicos.

194 As relações evolutivas foram analisadas por meio de Inferência Bayesiana (IB) e  
195 Máxima Verossimilhança (MV), ambas implementadas na plataforma CIPRES  
196 (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>), utilizando o Mr. Bayes v. 3.2.6 (Ronquist et al.  
197 2012) e RAxML-HPC2 (8.2.10) (Stamatakis 2014), respectivamente. Os modelos de  
198 substituição dos nucleotídeos foram selecionados usando o Phylogenetic Analysis Using  
199 Parsimony (PAUP\* v.4) (Swofford 1998) e Mr.Modeltest 2.3 (Nylander 2004), sob o critério  
200 Akaike Information Criterion (AIC). A IB foi realizada com  $5 \times 10^7$  gerações de Monte Carlo  
201 Cadeia de Markov (três cadeias quentes e uma fria) e as árvores amostradas a cada 1000  
202 gerações. A MV foi realizada com 1000 pseudoreplicatas sob o modelo GTR-GAMMA (-m  
203 GTRCAT -x-f a).

204

205           **Análise da sequência multilocus (MLSA).** A amplificação de fragmentos dos genes  
206 *recA* (Recombinase A), *gyrB* (DNA Gyrase subunit B), *atpD* (ATP synthase beta chain), *gltB*  
207 (Glutamate synthase large subunit), *lepA* (GTP binding protein), *phaC* (Acetoacetyl-CoA  
208 reductase) e *trpB* (Tryptophan synthase subunit B) dos isolados CCRMBC02, CCRMBC16,  
209 CCRMBC18, CCRMBC31, CCRMBC33, CCRMBC45, CCRMBC51, CCRMBC60,  
210 CCRMBC64, CCRMBC67, CCRMBC74, CCRMBC81, CCRMBC99, CCRMBC157,  
211 CCRMBC171, CCRMBC199 e CCRMBC259 foi realizada de acordo com Spilker et al.  
212 (2009), sendo a purificação das amostras e o sequenciamento dos genes realizado conforme  
213 descrito acima. As árvores filogenéticas individuais e concatenadas foram realizadas  
214 conforme descrito para o gene *recA*. Para construção das árvores filogenéticas foram usados  
215 isolados tipo e STs (sequence types) disponíveis na base de dados PubMLST Bcc (Tabela 2).  
216 O número médio de substituições nucleotídicas por sítio (percentagem de divergência de  
217 sequências de alelos concatenadas) entre populações foi calculado utilizando o programa  
218 DnaSP v5.10 (Librado e Rozas 2009) com base no método de Jukes-Cantor (Jukes e Cantor,  
219 1969).

220

221           **Tipagem de sequência multilocus (MLST).** As sequências parciais dos genes *recA*,  
222 *gyrB*, *atpD*, *gltB*, *lepA*, *phaC* e *trpB* dos isolados utilizados na MLSA foram comparadas com  
223 as sequências das 22 espécies do CBC, utilizando-se a ferramenta sequence query -  
224 *Burkholderia cepacia* complex locus/sequence definitions  
225 ([https://pubmlst.org/bigsubdb?db=pubmlst\\_bcc\\_seqdef&page=profiles&scheme\\_id=1](https://pubmlst.org/bigsubdb?db=pubmlst_bcc_seqdef&page=profiles&scheme_id=1)),  
226 disponível no banco de dados do PubMLST Bcc. Foram determinados o alelo para cada um  
227 dos sete loci, os perfis alélicos e a sequência tipo (ST) dos isolados (Spilker et al. 2009).

228

229           **Análise bioquímica.** A caracterização bioquímica dos isolados CCRMBC02,  
230 CCRMBC16, CCRMBC45, CCRMBC51, CCRMBC64, CCRMBC74, CCRMBC 199 e  
231 CCRMBC 259. foi realizada por meio do sistema Biolog<sup>®</sup> GEN III, que contém 71 fontes de  
232 carbono e 23 substâncias inibitórias. O isolado tipo de *B. cepacia* (IBSBF567<sup>TS</sup>) foi utilizado  
233 como padrão comparativo. A suspensão bacteriana foi preparada em fluido de inoculação IF-  
234 A a partir de crescimento bacteriano obtido pelo cultivo dos isolados em meio Biolog  
235 Universal Growth (BUG<sup>®</sup>), a 30° C por 48 horas. As suspensões foram ajustadas para uma  
236 transmitância de 98% e, em seguida, foram depositados 100 µl em cada poço das microplacas  
237 do Biolog<sup>®</sup>. Posteriormente, as microplacas foram incubadas a 33°C por 24 h. A avaliação foi

238 realizada observando-se a presença de crescimento bacteriano, evidenciado pela coloração  
239 roxa indicadora da redução do cloreto de trifeniltetrazólio.

240

241 **Caracterização patogênica.** Os isolados listados na Tabela 1 foram inoculados em  
242 bulbos de cebola amarela (cv. IPA 11). Com o auxílio de uma almofada de alfinete  
243 entomológico de 3 mm de profundidade foram realizados ferimentos em catafilos de cebola  
244 destacados e, posteriormente, foram depositados 10 µL de suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC  
245 mL<sup>-1</sup>). Catafilos tratados similarmente com água destilada esterilizada (ADE) constituíram o  
246 controle negativo. Após as inoculações, os catafilos foram depositados em placas de Petri  
247 esterilizadas e submetidos a tratamento em câmara úmida por 48 horas a 30° C. Os  
248 tratamentos foram avaliados às 48 horas após as inoculações determinando-se a severidade  
249 dos isolados por meio da medição das lesões com auxílio de um paquímetro. O experimento  
250 foi realizado duas vezes.

251 O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro  
252 repetições por isolado, sendo cada repetição composta por quatro catafilos de cebola com um  
253 ponto de inoculação em cada catafilo. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de  
254 agrupamento de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ) usando o programa AgroEstat (Barbosa e Maldonado  
255 2015).

256

## 257 **Resultados**

258 **Seleção de isolados do complexo *B. cepacia*.** Dos 119 isolados cultivados em meio  
259 TB-T, 112 apresentaram características típicas do gênero *Burkholderia*, com colônias  
260 redondas, pequenas, circulares, convexas, com bordas lisas, cremosas com coloração  
261 amarelada. Sete isolados apresentaram colônias com características de *P. aeruginosa*, ou seja,  
262 redondas, grandes, circulares, achatadas, bordas irregulares, enrugadas e coloração  
263 esverdeada, sendo estas excluídas das análises seguintes.

264 Dos 112 isolados com colônias típicas de *Burkholderia*, 28 apresentaram reação PCR-  
265 positiva com os *primers* CMG-23-1 e G-23-2, amplificando uma banda de 388 pb da região  
266 23S tRNA. Esses isolados também foram excluídos das análises. Assim, 84 isolados foram  
267 considerados como pertencentes ao CBC (Tabela 1).

268

269 **rep-PCR.** A amplificação do DNA genômico dos isolados relacionados na Tabela 1  
270 por meio de rep-PCR gerou 17 bandas reprodutíveis variando de 500 a 5000 pb (Figura 1). A  
271 análise de agrupamento realizada com os dados combinados dos perfis gerados com os

272 marcadores REP, ERIC e BOX permitiu a formação de 43 grupos ao nível de 80% de  
273 similaridade (Figura 2, Tabela 1). Pelo menos um isolado de cada grupo foi selecionado para  
274 o sequenciamento parcial do gene *recA*.

275

276 **Gene *recA*.** As árvores filogenéticas construídas com a sequência do gene *recA* pelos  
277 métodos de MV e IB exibiram estrutura similar. Utilizando o método de IB, os 50 isolados  
278 analisados foram separados em quatro cladogramas: o clado I foi formado por 29 isolados, que se  
279 agruparam com os isolados LMG18829 (Genbank nº FJ670551) e LMG18830 (Genbank nº  
280 FJ670552) de *B. cenocepacia* linhagem IIIB, o clado II foi formado por 11 isolados, que se  
281 agruparam com o isolado LMG16656<sup>T</sup> (Genbank nº AY951880) de *B. cenocepacia* linhagem  
282 IIIA, o clado III foi composto por um isolado (CCRMBC51) que não se agrupou com  
283 nenhuma espécie conhecida, e o clado IV foi formado por 10 isolados que se agruparam com  
284 o isolado M27 de *Burkholderia* sp. (Zhang e Xie 2007) (Figura 3). Todos os quatro cladogramas  
285 formados apresentaram ramos bem apoiados com probabilidade posterior acima de 85%.

286 Os isolados CCRMBC18, CCRMBC31, CCRMBC45, CCRMBC60, CCRMBC64,  
287 CCRMBC67, CCRMBC81 e CCRMBC259, agrupados no clado I; CCRMBC02,  
288 CCRMBC99, CCRMBC157 e CCRMBC199, agrupados no clado II; CCRMBC51, agrupado  
289 no clado III; e CCRMBC16, CCRMBC33, CCRMBC74 e CCRMBC171, agrupados no clado  
290 IV, foram selecionados para realização da MLSA.

291

292 **Análise da sequência multilocus (MLSA).** As árvores filogenéticas construídas com  
293 as sequências parciais dos genes *recA*, *gyrB*, *atpD*, *gltB*, *lepA*, *trpB* e *phaC*, analisadas  
294 individualmente, apresentaram estrutura similar utilizando os métodos de MV e IB. De forma  
295 semelhante, as árvores filogenéticas geradas com a sequência concatenada também exibiram  
296 estruturas similares quando os dois métodos foram utilizados. A árvore filogenética  
297 construída por meio de IB separou os isolados em quatro cladogramas, com 100% de probabilidade  
298 posterior (Figura 4). O clado I foi formado pelos isolados CCRMBC18, CCRMBC31,  
299 CCRMBC45, CCRMBC60, CCRMBC64, CCRMBC67 e CCRMBC81, que se agruparam  
300 com o isolado LMG18830 (ST39) de *B. cenocepacia* linhagem IIIB; o clado II foi formado  
301 pelos isolados CCRMBC02, CCRMBC99, CCRMBC157 e CCRMBC199, que se agruparam  
302 com o isolado LMG16656<sup>T</sup> (ST31) de *B. cenocepacia* linhagem IIIA; o clado III foi formado  
303 pelos isolados CCRMBC16, CCRMBC33, CCRMBC74 e CCRMBC171, que não se  
304 agruparam com nenhuma espécie conhecida; e o clado IV foi composto pelo isolado  
305 CCRMBC51, que também não se agrupou com nenhuma espécie conhecida.

306 Para os isolados agrupados no clado III e IV, a divergência do alelo concatenado em  
307 relação aos vizinhos mais próximos, *B. cenocepacia* (IIIA, IIIB, IIIC, IIID), *Burkholderia* sp.  
308 ST1058 e *B. seminalis*, foi de 4,65 e 4,16%. Enquanto a divergência nucleotídica dos isolados  
309 do clado I e clado II em relação as quatro linhagens de *B. cenocepacia* foi de 2,27 e 2,26,  
310 respectivamente.

311

312 **Análise da sequência multilocus (MLST).** De acordo com as sequências parciais dos  
313 genes *recA*, *gyrB*, *atpD*, *gltB*, *lepA*, *phaC* e *trpB*, os 17 isolados foram separados em oito STs,  
314 das quais sete não foram descritas até o momento (Tabela 3). Os isolados diferiram em pelo  
315 menos um alelo dos isolados depositados no PubMLST do complexo *B. cepacia*, resultando  
316 em perfis alélicos distintos, bem como em novas sequências tipos, a saber: ST1528  
317 (CCRMB199), ST1529 (CCRMB157), ST1530 (CCRMB02, CCRMB99), ST1531  
318 (CCRMB18, CCRMB31, CCRMB45, CCRMB259), ST1532 (CCRMB74, CCRMB171),  
319 ST1533 (CCRMB33) e ST1534 (CCRMB51).

320 Os isolados CCRMBC02, CCRMBC16, CCRMBC45, CCRMBC51, CCRMBC64,  
321 CCRMBC74, CCRMBC199 e CCRMBC259 representando as oito STs detectadas no  
322 presente estudo, foram selecionados para realização das análises bioquímicas.

323

324 **Análises bioquímicas.** As características bioquímicas dos isolados analisados estão  
325 listadas na Tabela 4. Todos os isolados metabolizaram 100% os carbonos N-acetil-D-  
326 Glucosamina,  $\alpha$ -D-Glucose, D-Manose, D-Fructose, D-Galactose, L-Fucose, D-Glucose-6-  
327 PO<sub>4</sub>, D-frutose-6-PO<sub>4</sub>, L-Arginina, L-Histidina, L-Serina e pectina. Todos os isolados não se  
328 mostraram 100% sensíveis as substâncias inibitórias pH 6, pH 5, 1% de NaCl, D-Sódio a 1%  
329 Lactato, mio-Inositol, troleandomicina, A rifamicina SV, ácido L-aspartico, ácido L-  
330 glutâmico, L-piroglutâmico ácido, lincomicina, ácido D-Galacturônico, ácido D-glucônico,  
331 ácido D-glucurônico, glucuronamida, ácido quínico, vancomicina, tetrazólio violeta, tetrazólio  
332 azul, p-hidroxi-fenilacético ácido e piruvato de metilo. Nenhum isolado metabolizou 100% os  
333 carbonos D-Maltose, D-Celobiose, D-Turanose, estaquiase, D-Rafinose,  $\alpha$ -D-lactose, D-  
334 Melibiose,  $\beta$ -Metil-D-Glicosídeo, N-acetil-  $\beta$ -D-Manaçúcar, N-acetil-D-Galactosamina, 3-  
335 Metil Glucose, L-Ramnose e inosina, bem como não foram 100% sensíveis as substâncias  
336 inibitórias N-Acetil ácido neuramínico, 4% de NaCl, 8% de NaCl, D-Ácido Aspartico, ácido  
337 D-láctico metil ester, ácido  $\alpha$ -Keto-glutárico, cloreto de lítio,  $\alpha$ -Hidroxi-Ácido butírico, ácido  
338  $\alpha$ -Keto-butírico e bromato de sódio. As demais fontes de carbono e substâncias inibitórias  
339 apresentaram reação variável.

340 **Caracterização patológica.** Todos os isolados da Tabela 1 foram analisados e  
341 mostraram-se patogênicos a bulbo de cebola, causando os sintomas característicos da doença.  
342 Foram observadas diferenças quanto à severidade da doença, sendo formados dois grupos. O  
343 grupo I foi composto por 38 isolados mais agressivos, os quais causaram lesões variando de  
344 16,78 a 26,20 mm, enquanto o grupo II foi composto por 46 isolados, os quais causaram  
345 lesões variando de 16,46 a 3,25 mm.

346 Os isolados CCRMBC74, CCRMBC171 e CCRMBCB33 representantes das STs 1532  
347 e 1533, foram agrupados no grupo I, os isolados CCRMBC199, CCRMBC157 e CCRMBC51  
348 representantes das STs 1528, 1529 e 1534, foram agrupados no grupo II, e os isolados  
349 CCRMBC02, CCRMBC99, CCRMBC18, CCRMBC31, CCRMBC45, CCRMBC259,  
350 CCRMBC60, CCRMBC64, CCRMBC67, CCRMBC81 representantes das STs 1530, 1531 e  
351 395, foram agrupados nos dois grupos.

352

### 353 **Discussão**

354 Uma coleção de 119 isolados causadores de podridão das escamas da cebola no  
355 nordeste brasileiro foi utilizada para analisar a diversidade de espécies do complexo *B.*  
356 *cepacia* associados à doença. Os isolados foram coletados em 2016, nos principais municípios  
357 produtores de cebola da região Nordeste do Brasil, e depositados na Coleção de Culturas do  
358 Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Tendo em  
359 vista que a podridão das escamas pode ser causada pelas bactérias *B. cenocepacia* Vandamme  
360 et al. (Oliveira et al. 2017), *B. cepacia* (Burkholder 1950), *B. gladioli* pv. *alliicola*  
361 (Burkholder 1942), *Pseudomonas aeruginosa* (Wordell Filho e Boff 2006) e *Serratia*  
362 *marcescens* (Marques et al. 1994), os isolados foram recuperados em meio TB-T, o qual é  
363 seletivo e permite a diferenciação das colônias de espécies de *Burkholderia* habitantes do solo  
364 (Hagedorn et al. 1987). Os isolados que apresentaram colônias redondas, pequenas, circulares,  
365 convexas, com bordas lisas, cremosas com coloração amarelada foram considerados com  
366 pertencentes ao gênero *Burkholderia*., enquanto sete isolados que apresentaram colônias  
367 redondas, grandes, circulares, achatadas, bordas irregulares, enrugadas e coloração  
368 esverdeada, e *P. aeruginosa*. foram considerados como *P. auroginosa*, sendo excluídos das  
369 análises. Os 112 isolados restantes foram analisados utilizando os *primers* CMG-23-1 e G-23-  
370 2, específicos para identificação de *B. gladioli*, incluindo os patovares *alliicola* e *gladioli*, e  
371 28 isolados foram amplificados e identificados como *B. gladioli* pv. *alliicola*, sendo também  
372 excluídos das análises. Os 84 restantes foram considerados como pertencentes ao CBC, sendo  
373 utilizados nas análises de rep-PCR.

374 A análise de rep-PCR separou os isolados em 43 grupos distintos, revelando alta  
375 variabilidade entre os isolados estudados. Com base nessa variabilidade, 50 isolados  
376 representativos dos 43 grupos encontrados foram selecionados para as análises filogenéticas  
377 como gene *recA*. Estudos com o marcador BOX-PCR têm sido realizados para fins  
378 epidemiológicos com isolados obtidos a partir de ambientes clínicos (Campana et al. 2005),  
379 sendo considerado o marcador mais apropriado para estudos epidemiológicos para o CBC  
380 (Biddick et al. 2004; Coenye et al. 2002; Coenye e LiPuma 2003). No entanto, para o nosso  
381 conhecimento, não existem estudos aplicando-se a técnica de rep-PCR com isolados do CBC  
382 obtidos de bulbos de cebola com sintomas de podridão das escamas.

383 O sequenciamento do gene *recA* dos isolados selecionados por meio de rep-PCR  
384 mostrou que a maioria dos isolados foram filogeneticamente relacionados a *B. cenocepacia*,  
385 bem como a duas espécies do CBC ainda não descritas. O gene *recA* tem sido muito utilizado  
386 para estudos de diversidade e de relações filogenéticas e genotípicas entre as espécies do  
387 gênero *Burkholderia* (Payne et al. 2005). Em nossos estudos, a técnica foi capaz de mostrar a  
388 diversidade dos isolados e possibilitar a seleção de haplótipos para posterior MLSA.

389 *Burkholderia cenocepacia*, a espécie prevalentemente encontrada em nosso estudo,  
390 tem sido considerada como uma espécie geneticamente heterogênea, sendo composta por pelo  
391 menos quatro linhagens filogenéticas (IIIA, IIIB, IIIC e IIID), determinadas com base no  
392 polimorfismo do gene *recA* (Mahenthalingam et al. 2000; Vandamme et al. 2003). Até o  
393 momento, as linhagens IIIA e IIID foram detectadas exclusivamente em ambientes clínicos  
394 (Mahenthalingam et al., 2000; Vandamme et al., 2003), enquanto a linhagem IIIC foi  
395 encontrada apenas em solo (Vandamme et al., 2003). Por sua vez, a linhagem IIIB foi  
396 detectada em amostras clínicas, habitats naturais, como no solo e na rizosfera de cebola,  
397 banana, milho (Mahenthalingam et al. 2000; Vandamme et al. 2003), e causando podridão  
398 das escamas da cebola no nordeste brasileiro, mais precisamente nos estados da Bahia e  
399 Pernambuco (Oliveira et al. 2017). Em nosso estudo, o sequenciamento do gene *recA* permitiu  
400 o agrupamento de 22% dos isolados nas linhagens IIIA (LMG16656T) e 58% na IIIB (LMG  
401 18829 e LMG18829) de *B. cenocepacia*. Embora a linhagem IIIB já tenha sido detectada  
402 causando podridão das escamas no Brasil (Oliveira et al. 2017), essa é a primeira vez que a  
403 linhagem IIIA é encontrada em associação com doenças de plantas. Adicionalmente, com  
404 base na identificação filogenética realizada por meio do gene *recA* dos isolados representantes  
405 de cada grupo definido por meio de rep-PCR, os demais isolados contidos em cada grupo  
406 foram considerados como sendo da mesma espécie do isolado identificado (Tabela 1).

407 A MLSA permitiu a confirmação dos quatro clados formados anteriormente na  
408 inferência filogenética com base no gene *recA*, todavia, apresentando clados bem mais  
409 suportados (100% de probabilidade posterior para todos os clados). A técnica de MLSA tem  
410 um alto poder discriminatório para a identificação de isolados do CBC e a divergência de  
411 sequência concatenada de 3% tem sido aceita como um limiar para diferenciação das espécies  
412 do CBC (Peeters et al. 2013; Vanlaere et al. 2009). Em nosso estudo, técnica de MLSA  
413 confirmou que os isolados encontrados representaram novas espécies do CBC, conforme  
414 confirmado pelas análises de divergência nucleotídica, as quais indicaram valores abaixo de  
415 3% entre os isolados dos clados I e II e *B. cenocepacia* (linhagens IIIA e IIIB), e valores  
416 acima de 3% para os isolados dos clados III e IV e as espécies *B. cenocepacia* (IIIA, IIIB,  
417 IIIC, IIID), *Burkholderia* sp. ST1058 e *B. seminalis*, as quais foram filogeneticamente mais  
418 relacionadas.

419 A MLST realizada com sete genes *housekeeping* (*atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC* e  
420 *trpB*) tem sido bastante utilizada para atribuir tipos de alelos as sequências, perfis alélicos e  
421 tipos de sequência (STs) aos isolados do CBC (Baldwin et al. 2005). Os perfis alélicos  
422 gerados por meio de MLST distribuiu os 17 isolados utilizados no presente estudo em 8  
423 distintas sequências tipos (STs), das quais sete não foram descritas até o momento (Tabela 3).  
424 Nesse contexto, os isolados CCRMBC60, CCRMBC64, CCRMBC67, CCRMBC81 foram  
425 caracterizados na ST 395, obtida de humanos com pneumonia na França (PubMLST Bcc). Os  
426 demais isolados foram caracterizados como STs novas, embora tenham se aproximado de  
427 outras STs. Por exemplo, os isolados CCRMBC18, CCRMBC31, CCRMBC45 e CCRMB259  
428 de *B. cenocepacia* linhagem IIIB (ST 1531), apresentaram um perfil alélico próximo a ST  
429 204, obtida de amostras ambientais no Reino Unido (PubMLST Bcc); os isolados  
430 CCRMBC157 e CCRMBC199 de *B. cenocepacia* linhagem IIIA (ST 1529 e 1528,  
431 respectivamente), apresentaram perfil alélico próximo a ST 826, obtida de humanos  
432 portadores de fibrose cística na Índia (PubMLST Bcc); os isolados CCRMBC02 e  
433 CCRMBC99 de *B. cenocepacia* linhagem IIIA (ST 1530), apresentam perfil muito próximo a  
434 ST 242, obtida de humanos com pneumonia no Reino Unido (PubMLST Bcc); os isolados  
435 CCRMBC74, CCRMBC171 e CCRMBC33, que não apresentaram relação com as espécies  
436 descritas até o momento (ST 1532 e 1533, respectivamente), apresentaram perfil alélico  
437 próximo a ST 1304, obtida de humanos portadores de fibrose cística nos EUA (PubMLST  
438 Bcc); e o isolado CCRMBC51 (ST 1534), que também não apresentou relação com as  
439 espécies descritas até o momento, mostrou perfil alélico próximo a ST 1058, obtida de  
440 humanos portadores de fibrose cística no Brasil (PubMLST Bcc).

441 Os perfis alélicos encontrados nos isolados do CBC associados a podridão das escamas  
442 foram diferentes dos depositados para os demais isolados do CBC no PubMLST Bcc para  
443 maioria dos isolados. A proximidade entre os perfis alélicos demonstra que os isolados  
444 detectados em cebola tem relações genéticas muito próximas com isolados oriundos de  
445 amostras clínicas na Índia, Reino Unido, França, EUA e Brasil (PubMLST Bcc; Tabela 3).  
446 Estes resultados despertam a necessidade de estudos visando à compreensão da relação  
447 genética entre esses isolados, uma vez que os membros do CBC são patogênicos a animais e  
448 plantas, e estão presentes em diversos ambientes (Coenye e Vandamme 2003).

449 A caracterização patológica dos isolados permitiu a observação de diferenças ao nível de  
450 severidade dos isolados encontrados no semiárido brasileiro. Os 84 isolados foram divididos  
451 em dois grupos, sendo um mais agressivo (16,78 a 26,20 mm de severidade) e outro menos  
452 agressivo (de 16,43 a 3,25 mm de severidade) (Tabela 1). Também foram observadas  
453 diferenças entre as STs encontradas, demonstrando a variabilidade patogênica entre os  
454 isolados, fato este que pode estar relacionado a variabilidade genética e bioquímica observada  
455 entre os isolados do estudo.

456 É importante mencionar que no presente estudo nenhum dos isolados coletados em  
457 bulbos com sintomas típicos da doença foram relacionados a *B. cepacia*. Estes resultados são  
458 surpreendentes, uma vez que *B. cepacia* foi inicialmente relatada como agente causal da  
459 podridão das escamas da cebola (Burkholder 1950). Este fato também vem sendo observado  
460 em outros ambientes associados a cebola, tais como em solos (Lipuma et al. 2002) e rizosfera  
461 de cebola (Jacobs et al. 2008), onde *B. cenocepacia* vem sendo encontrada como espécie  
462 prevalente. Essa prevalência de *B. cenocepacia* na rizosfera da cebola pode está diretamente  
463 relacionada a fatores exclusivos da planta hospedeira (Jacobs et al. 2008). Com base nos  
464 resultados obtidos, conclui-se que a podridão das escamas da cebola no semiárido brasileiro  
465 tem sido causada por *B. cenocepacia* (linhagens IIIA e IIIB) e espécies ainda não conhecidas.  
466 O sequenciamento genômico dessas espécies está em andamento e, no futuro próximo, as  
467 mesmas serão formalmente descritas.

468

#### 469 **Agradecimentos**

470 Agradecemos à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
471 Superior) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela  
472 concessão da bolsa durante o período de realização desta tese de doutorado.

473

474 **Literatura citada**

475

476 Bachmann, H. S., Siffert, W., e Frey, U. H. 2003. Successful amplification of extremely GC-  
477 rich promoter regions using a novel ‘slowdown PCR’ technique. *Pharmacogenetics* 13:759–  
478 766.

479

480 Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Thickett, K. M., Honeybourne, D., Maiden, M. C.,  
481 Govan, J. R., Speert, D. P., Lipuma, J. J., Vandamme, P., e Dowson, C. G. 2005. Multilocus  
482 sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the  
483 *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 43:4665-4673.

484

485 Barbosa, J.C., e Maldonado Júnior, W. 2015. Experimentação agrônômica & AgroEstat:  
486 sistema para análise estatística de ensaios agrônômicos. Gráfica Multipress, Jaboticabal.

487

488 Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R., e Roller, C. 1998. Discrimination of  
489 *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia* species detectable in cystic fibrosis patients by  
490 PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36:2748-2751.

491

492 Bevivino, A., Costa, B., Cantale, C., Cesarini, S., Chiarini, L., Tabacchioni, S., Caballero-  
493 Mellado, J., e Dalmastri, C. 2011. Genetic relationships among Italian and Mexican maize-  
494 rhizosphere *Burkholderia cepacia* complex (BCC) populations belonging to *Burkholderia*  
495 *cenocepacia* IIIB and BCC6 group. *BMC Microbiol.* 11:228.

496

497 Biddick, R., T. Spilker, A. Martin, e J. J. LiPuma. 2003. Evidence of transmission of  
498 *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia dolosa* among persons  
499 with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett.* 228:57–62.

500

501 Burkholder, W. H. 1942. Three bacterial plant pathogens: *Phytophthora earyophylli* sp.n.,  
502 *Phytophthora alliicola* sp.n., and *Phytophthora manihotis* (Arthaud-Berthet et Sondar) Viégas.  
503 *Phytopathology* 32:141-149.

504

505 Burkholder, W. H. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40:115–  
506 117.

507

- 508 Butler, S. L., Doherty, C. J., Hughes, J. E., Nelson, J. W., e Govan, J. R. W. 1995.  
509 *Burkholderia cepacia* and cystic fibrosis: do natural environments present a potential hazard?  
510 *J. Clin. Microbiol.* 33:1001–1004.  
511
- 512 Campana, S., Taccetti, G., Ravenni, N., Favari, F., Cariani, L., Sciacca, A., Savoia, D.,  
513 Collura, A., Fiscarelli, E., De Intinis, G., Buseti, M., Cipolloni, A., d'Aprile, A., Provenzano,  
514 E., Collebrusco, I., Frontini, P., Stassi, G., Trancassini, M., Tovagliari, D., Lavitola, A.,  
515 Doherty, C.J., Coenye, T., Govan, J.R., e Vandamme, P. 2005. Transmission of *Burkholderia*  
516 *cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy.  
517 *J. Clin. Microbiol.* 43:5136-5142.  
518
- 519 Christensen, H., Kuhnert, P., Busse, H. J., Frederiksen, W. C., e Bisgaard, M. 2007. Proposed  
520 minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the Pasteurellaceae.  
521 *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:166-178.  
522
- 523 Coenye, T., Goris, J., Spilker, T., Vandamme, P., e LiPuma, J. J. 2002. Characterization of  
524 unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description  
525 of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 40:2062–2069.  
526
- 527 Coenye, T., e LiPuma, J. J. 2003. Population structure analysis of *Burkholderia cepacia*  
528 gemonovar III: varying degrees of genetic recombination characterize major clonal  
529 complexes. *Microbiology.* 149:77-88.  
530
- 531 Coenye, T., e J. J. LiPuma. 2003. Molecular epidemiology of *Burkholderia* species. *Front.*  
532 *Biosci.* 8:55–e67  
533
- 534 Coenye, T., e Vandamme, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species  
535 occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* 5:719–729.  
536
- 537 Coenye, T., T. Spilker, A. Martin, e J. J. LiPuma. 2002. Comparative assessment of  
538 genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* genomovar III. *J. Clin.*  
539 *Microbiol.* 40:3300–3307.  
540
- 541 Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J. R. W., e LiPuma, J. J. 2001. Taxonomy and  
542 identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 39:3427–3436.

543

544 Dettman, J. R., Jacobson, D. J., e Taylor, J. W. 2003. A multilocus genealogical approach to  
545 phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution* 57: 2703-  
546 2720.

547

548 Engledow, A. S., Medrano, E. G., Mahenthiralingam, E., LiPuma, J. J., e Gonzalez, C. F.  
549 2004. Involvement of a plasmid-encoded type IV secretion system in the plant tissue water  
550 soaking phenotype in *Burkholderia cenocepacia*. *J. Bacteriol.* 186:6015–6024.

551

552 Faria, M. V., Quartiero, A., Resende, J.T.V., Figueiredo, A. S. T., Camargo, L. K. P., Santos,  
553 R. L., e Kobori, R. F. 2014. Desempenho agronômico, heterose e estabilidade fenotípica de  
554 genótipos de cebola em Guarapuava. *Horticultura Brasileira.* 32:259-266.

555

556 Frey, U. H., Lieb, W., Erdmann, J., Savidou, D., Heusch, G., Leineweber, K., Jakob, H.,  
557 Hense, H. W., Löwel, H., Brockmeyer, N.H., Schunkert, H., e Siffert, W. 2008.

558 Characterization of the GNAQ promoter and association of increased Gq expression with  
559 cardiac hypertrophy in humans. *Eur. Heart J.* 29:888–897.

560

561 Gama, M. S. A., e Covello, V. N. 2016. Técnicas moleculares I – Detecção e identificação de  
562 bactérias fitopatogênicas. Pages 183-198in: Manual de prática em fitobacteriologia. 3rd ed. R.  
563 L. R. Mariano and E. B. SOUZA, eds. EDUFRPE, Recife.

564

565 Ginther, J. L., Mayo, M., Warrington, S. D., Kaestli, M., Mullins, T., Wagner, D. M., Currie,  
566 B. J., Tuanyok, e A., Keim, P. 2015. Identification of *Burkholderia pseudomallei* Near-  
567 Neighbor Species in the Northern Territory of Australia. *PLoS Negl Trop Dis.* 9:e0003892.

568

569 Golini, G., Cazzola, G., e Fontana, R. 2006. Molecular epidemiology and antibiotic  
570 susceptibility of *Burkholderia cepacia*-complex isolates from an Italian cystic fibrosis centre.  
571 *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25:175-180.

572

573 Govan, J. R.W., Balandreau, J., e Vandamme, P. 2000. *Burkholderia cepacia* –friend and foe.  
574 *ASM News.* 66:124–125.

575

576 Hagedorn, C., Gould, W. D., Bardinelli, T. R., e Gustavson, D. R. 1987. A

- 577 selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia*  
578 biotypes from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2265–2268.  
579
- 580 Jacobs, J. L., Fasi, A. C., Ramette, A., Smith, J. J., Hammerschmidt, R., e Sundin, G. W.  
581 2008. Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from  
582 the onion rhizosphere and onion field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3121-3129.  
583
- 584 Jukes, T., e Cantor, C. 1969. Evolution of protein molecules. Pages 21-132 in: *Mammalian*  
585 *Protein Metabolism*. H. N. Munro, ed. Academic Press, New York.  
586
- 587 Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., e Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid  
588 multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30:3059-  
589 3066.  
590
- 591 Katoh, K., Rozewicki, J., e Yamada, K.D. 2017. MAFFT online service: multiple sequence  
592 alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinformatics*. doi:  
593 10.1093/bib/bbx108.  
594
- 595 Katoh, K., e Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7:  
596 improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30:772-780.  
597
- 598 Kunz, V. L., Sirtoli, L. F., Furlan, L., Poletti, L., Primo, M. A., e Rodrigues, J. D. 2009.  
599 Produtividade de cebola sob diferentes fontes e modos de aplicação de adubos nitrogenados  
600 em cobertura. *Revista Biodiversidade* 8:31-37.  
601
- 602 Lee, Y. A., e Chan, C. W. 2007. Molecular typing and presence of genetic markers among  
603 strains of banana finger-Tip rot pathogens, *Burkholderia cenocepacia*, in Taiwan.  
604 *Phytopathology* 97:195-201.  
605
- 606 Librado, P., e Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of  
607 DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.  
608
- 609 LiPuma, J. J., Spilker, T., Coeyne, T., e Gonzalez, C. F. 2002. An epidemic  
610 *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *Lancet* 359:2002–2003.

- 611  
612 LiPuma, J. J., Spilker, T., Gill, L. H., Campbell, P. W., Liu, L., e Mahenthiralingam, E. 2001.  
613 Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility  
614 markers in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:92–96.  
615
- 616 Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., e Bruijn, F. J. 1994. Specific genomic  
617 fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains  
618 generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2286-2295.  
619
- 620 Mahenthiralingam, E., Bischof, J., Byrne, S. K., Radomski, C., Davies, J. E., Av-Gay, Y., e  
621 Vandamme, P. 2000. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia*  
622 *cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia*  
623 *stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J. Clin. Microbiol.* 38:3165–3173.  
624
- 625 Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Campbell, M. E., Henry, D. A., Gravelle, A. M.,  
626 Wong, L. T., Davidson, A. G., Wilcox, P. G., Nakielna, B., e Speert, D. P. 2001. Infection  
627 with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent  
628 transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. *Clin. Infect.*  
629 *Dis.* 33:1469–1475.  
630
- 631 Marques, A. S. A., Robbs, C. F., Boiteux, L. S., e Parente, P. M. 1994. Índice de  
632 fitobacterioses assinaladas no Brasil. EMBRAPA-SPI, Brasília.  
633
- 634 Martina, P., Leguizamon, M., Prieto, C. I., Sousa, S. A., Montanaro, P., Draghi, W. O.,  
635 Stämmler, M., Bettiol, M., De Carvalho, C. C. C. R., Palau, J., Figoli, C., Alvarez, F., Benetti,  
636 S., Lejona, S., Vescina, C., Ferreras, J., Lasch, P., Lagares, A., Zorreguieta, A., Leitão, J. H.,  
637 Yantorno, O. M., e Bosch, A. 2018. *Burkholderia puraquae* sp. nov., a novel species of the  
638 *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. *Int. J.*  
639 *Syst. Evol. Microbiol.* 68:14-20.  
640
- 641 Nylander, A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary  
642 Biology Centre, Uppsala University.  
643

- 644 Oliveira, W. J. 2016. Etiologia da podridão de escama da cebola no semiárido brasileiro.  
645 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.  
646
- 647 Oliveira, W. J., Silva, W. A., Silva, A. M. F., Candeia, J. A., Souza, E. B., Mariano, R. L. R.,  
648 e Gama, M. A. S. 2017. First report of *Burkholderia cenocepacia* causing sour skin of onion  
649 (*Allium cepa*) in Brazil. Plant Dis. 101:1950.  
650
- 651 Payne, G.W., Vandamme, P., Morgan, S. H., LiPuma, J. J., Coenye, T., Weightman, A. J.,  
652 Jones, T. H., e Mahenthiralingam, E. 2005. Development of a *recA* gene-based identification  
653 approach for the entire *Burkholderia* genus. Appl. Environ. Microbiol. 71: 3917–3927.  
654
- 655 Parker, J. L., e Gurian-Sherman, D. 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and  
656 implications for risk assessment of biological control strains. Annu. Rev. Phytopathol.  
657 39:225-258.  
658
- 659 Peeters, C., Zlosnik, J. E. A., Spilker, T., Hird, T. J., LiPuma, J. J., e Vandamme, P. 2013.  
660 *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species  
661 from human respiratory samples and the rhizosphere. Syst. Appl. Microbiol. 36:483–489.  
662
- 663 Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B.,  
664 Liu, L., Suchard, M. A., e Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: eficiente Bayesian  
665 phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61:539-542.  
666
- 667 Sneath, P. H. A., Sokal, R. R., e Freeman, W. H. 1973. Numerical taxonomy. the principles  
668 and practice of numerical classification. Systematic Zoology. 24:263-268.  
669
- 670 Speert, D. P., Henry, D., Vandamme, P., Corey, M., e Mahenthiralingam, E. 2002.  
671 Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada.  
672 Emerging Infect. Dis. 8:181–187.  
673
- 674 Spilker, T., Baldwin, A., Bumford, A., Dowson, C. G., Mahenthiralingam, E., e LiPuma, J. J.  
675 2009. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia species*. J. Clin. Microbiol.  
676 47:2607-2610.  
677

- 678 Staden, R., Beal, K. F., e Bonfield, J. K. 2000. The Staden Package, 1998. Pages 115-130 in:  
679 Bioinformatics methods and protocols. S. Misener and S. A. Krawetz, eds. Hulmana Press,  
680 New York.
- 681
- 682 Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of  
683 large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312-1313.
- 684
- 685 Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., e Fisher,  
686 M. C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet.*  
687 *Biol.* 31:21-32.
- 688
- 689 Vandamme, P., and e Dawyndt, P. 2011. Classification and identification of the *Burkholderia*  
690 *cepacia* complex: past, present and future. *Syst. Appl. Microbiol.* 34:87–95.
- 691
- 692 Vandamme, P., Holmes, B., Coenye, T., Goris, J., Mahenthiralingam, E., LiPuma, J. J., e  
693 Govan, J. R. W. 2003. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.—a new twist to an old story. *Res.*  
694 *Microbiol.* 154:91–96.
- 695
- 696 Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H.,  
697 Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K., e Govan, J. R. 1997. Occurrence of multiple genomovars  
698 of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans*  
699 sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1188-1200.
- 700
- 701 Vanlaere, E., Baldwin, A., Gevers, D., Henry, D., de Brandt, E., LiPuma, J.J.,  
702 Mahenthiralingam, E., Speert, D. P., Dowson, C., e Vandamme, P. 2009. Táxon K, a complex  
703 within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia*  
704 *contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:102–  
705 111.
- 706
- 707 Wigley, P., e Burton, N. F. 1999. Genotypic and phenotypic relationships in *Burkholderia*  
708 *cepacia* isolated from cystic fibrosis patients and the environment. *J. Appl. Microbiol.*  
709 86:460–468.
- 710

- 711 Wordell Filho, J. A., e Boff, P. 2006. Doenças de origem parasitária. Pages 19-126 in: Manejo  
712 fitossanitário da cebola., J. A. Wordell Filho, E. Rowe, P. A. S. Gonçalves, J. F. Debarba, P.  
713 Boff, and L. F. Thomazelli, eds. Epagri, Florianópolis, BR.  
714
- 715 Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., e  
716 Arakawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the  
717 genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia*  
718 *cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol. 36:1251-1275.  
719
- 720 Zhang, L., e Guanlin, X. 2007. Diversity and distribution of *Burkholderia cepacia* complex in  
721 the rhizosphere of rice and maize. FEMS Microbiol. Lett. 266:231-235.  
722

723 **Tabela 1.** Descrição de isolados causadores de podridão das escamas no Nordeste brasileiro

Isolado <sup>x</sup>	Espécies CBC	Cidade/Estado	Grupo de rep-PCR	Severidade <sup>z</sup>
CCRMBC60 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Petrolândia-PE	12	26,20 a <sup>w</sup>
CCRMBC129	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Petrolândia-PE	41	25,74 a
CCRMBC103 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	19	25,52 a
CCRMBC94	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	19	24,54 a
CCRMBC74 <sup>y</sup>	<i>Burkholderia</i> sp.	Belém de São Francisco-PE	28	24,49 a
CCRMBC61 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIA	Belém de São Francisco-PE	28	24,29 a
CCRMBC63	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Orocó-PE	10	23,76 a
CCRMBC83	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Orocó-PE	36	23,58 a
CCRMBC65 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Orocó-PE	35	23,38 a
CCRMBC196 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Orocó-PE	35	23,09 a
CCRMBC25 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Orocó-PE	40	23,02 a
CCRMBC91	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Orocó-PE	40	22,55 a
CCRMBC171 <sup>y</sup>	<i>Burkholderia</i> sp.	Belém de São Francisco-PE	17	22,49 a
CCRMBC45 <sup>y</sup>	<i>Burkholderia</i> sp.	Belém de São Francisco-PE	35	22,20 a
CCRMBC23	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Orocó-PE	17	22,12 a
CCRMBC89 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Orocó-PE	17	21,57 a
CCRMBC90 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Orocó-PE	39	21,39 a
CCRMBC106	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Orocó-PE	34	21,26 a
CCRMBC64 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	33	20,93 a
CCRMBC138 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	03	20,66 a
CCRMBC192	<i>B. cenosepacia</i> IIIA	Petrolândia-PE	25	20,65 a
CCRMBC48 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	25	20,56 a
CCRMBC02 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIA	Belém de São Francisco-PE	25	20,56 a
CCRMBC238 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	25	20,54 a
CCRMBC66	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	25	20,36 a
CCRMBC18 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	17	20,31 a
CCRMBC34	<i>Burkholderia</i> sp.	Belém de São Francisco-PE	08	20,00 a
CCRMBC68 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	04	19,96 a
CCRMBC81 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	07	19,47 a
CCRMBC33 <sup>y</sup>	<i>Burkholderia</i> sp.	Belém de São Francisco-PE	07	19,39 a
CCRMBC29 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	07	19,35 a
CCRMBC16 <sup>y</sup>	<i>Burkholderia</i> sp.	Petrolândia-PE	07	19,18 a
CCRMBC108 <sup>y</sup>	<i>B. cenosepacia</i> IIIB	Petrolândia-PE	07	18,47 a

CCRMBC170	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Petrolândia-PE	09	18,14 a
CCRMBC85	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Petrolândia-PE	31	17,71 a
CCRMBC86	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Petrolândia-PE	30	17,15 a
CCRMBC146	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Petrolândia-PE	42	17,08 a
CCRMBC98 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Petrolândia-PE	42	16,78 a
CCRMBC75	<i>Burkholderia</i> sp.	Petrolândia-PE	42	16,46 b
CCRMBC139 <sup>y</sup>	<i>Burkholderia</i> sp.	Petrolândia-PE	42	16,26 b
CCRMBC22 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Petrolândia-PE	18	15,90 b
CCRMBC71	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Petrolândia-PE	18	15,75 b
CCRMBC115 <sup>y</sup>	<i>Burkholderia</i> sp.	Petrolândia-PE	07	15,75 b
CCRMBC69 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Petrolândia-PE	07	15,59 b
CCRMBC52	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Petrolândia-PE	08	15,48 b
CCRMBC93	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Petrolândia-PE	30	15,48 b
CCRMBC199 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Petrolândia-PE	38	15,21 b
CCRMBC30	<i>Burkholderia</i> sp.	Petrolândia-PE	29	14,94 b
CCRMBC241 <sup>y</sup>	<i>Burkholderia</i> sp.	Petrolândia-PE	38	14,88 b
CCRMBC78	<i>Burkholderia</i> sp.	Petrolândia-PE	37	14,84 b
CCRMBC76	<i>Burkholderia</i> sp.	Petrolândia-PE	38	14,41 b
CCRMBC67 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Petrolândia-PE	30	14,41 b
CCRMBC57	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Orocó-PE	27	13,90 b
CCRMBC156 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Orocó-PE	12	13,69 b
CCRMBC259 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Orocó-PE	37	13,48 b
CCRMBC132	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Orocó-PE	37	13,15 b
CCRMBC27	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Orocó-PE	38	13,14 b
CCRMBC59	<i>Burkholderia</i> sp.	Orocó-PE	38	13,03 b
CCRMBC79 <sup>y</sup>	<i>Burkholderia</i> sp.	Orocó-PE	38	12,88 b
CCRMBC114	<i>Burkholderia</i> sp.	Orocó-PE	16	12,86 b
CCRMBC56	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Orocó-PE	16	12,74 b
CCRMBC31 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	30	12,61 b
CCRMBC99 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Belém de São Francisco-PE	14	12,55 b
CCRMBC55 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Belém de São Francisco-PE	29	12,55 b
CCRMBC157 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Belém de São Francisco-PE	29	12,48 b
CCRMBC190	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Belém de São Francisco-PE	15	12,10 b
CCRMBC162 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Belém de São Francisco-PE	142	12,09 b
CCRMBC73	<i>Burkholderia</i> sp.	Sento Sé-BA	23	12,07 b
CCRMBC40 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Sento Sé-BA	22	11,99 b
CCRMBC21 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Mucugê-BA	02	11,73 b
CCRMBC51 <sup>y</sup>	<i>Burkholderia</i> sp.	Casa Nova-BA	20	11,21 b
CCRMBC200 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Casa Nova-BA	20	11,17 b
CCRMBC17 <sup>y</sup>	<i>Burkholderia</i> sp.	Casa Nova-BA	26	11,05 b
CCRMBC131 <sup>y</sup>	<i>Burkholderia</i> sp.	Sento Sé-BA	23	10,93 b
CCRMBC142	<i>Burkholderia</i> sp.	Casa Nova-BA	24	10,91 b

CCRMBC112 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Casa Nova-BA	11	10,61 b
CCRMBC19	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Sento Sé-BA	22	10,43 b
CCRMBC58 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Sento Sé-BA	22	9,52 b
CCRMBC06 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Casa Nova-BA	24	8,99 b
CCRMBC169 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Sento Sé-BA	22	7,81 b
CCRMBC179	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Sento Sé-BA	21	7,81 b
CCRMBC147	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Casa Nova-BA	32	7,55 b
CCRMBC109	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Casa Nova-BA	13	6,53 b
CCRMBC152 <sup>y</sup>	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Mucugê-BA	01	3,25 b
IBSBF567	-	-	43	-

724

725 <sup>x</sup>CCRMBC: Isolados de *Burkholderia cepacia* da Coleção de Culturas Rosa Mariano; IBSBF567 = ATCC 10856.

726 IBSBF: Coleção de Cultura de Fitobactérias do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil; ATCC: American Type

727 Culture Collection, Rockville, MD, USA. Todos os isolados estão disponíveis na Coleção de Culturas de

728 Fitobactérias Rosa Mariano, do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco

729 (Pernambuco, Brasil).

730 <sup>y</sup>Isolados utilizados para o sequenciamento de um fragmento de 376 pb do gene *recA* de acordo com Ginther et

731 al. (2015). Os demais isolados foram identificados com base na semelhança entre os isolados de acordo com os

732 grupos formados pela técnica rep-PCR.

733 <sup>z</sup>Severidade: médias obtidas com base no desenvolvimento da lesão (mm) causadas pelos os isolados do734 complexo *B. cepacia*.735 <sup>w</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de736 Scott-Knott ( $P \leq 0.05$ ).

737

738 **Tabela 2.** Sequências tipos (STs) e o perfil alélico das espécies usadas na MLSA disponíveis  
 739 no banco de dados do pubMLST

Espécie	Isolado	ST	Genes						
			<i>atpD</i>	<i>gltB</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>lepA</i>	<i>phaC</i>	<i>trpB</i>
<i>B. contaminans</i>	LMG 23361 <sup>T</sup>	102	64	80	80	89	105	97	70
<i>B. lata</i>	LMG 22485 <sup>T</sup>	101	63	46	38	44	30	33	42
<i>B. metallica</i>	LMG 24068 <sup>T</sup>	511	239	189	268	187	202	153	242
<i>B. cepacia</i>	LMG1222 <sup>T</sup>	10	5	4	44	4	4	4	48
<i>B. arboris</i>	LMG 24066 <sup>T</sup>	492	169	193	415	149	316	154	239
<i>B. pyrrocinia</i>	LMG 14191 <sup>T</sup>	41	70	88	250	108	98	28	86
<i>B. stabilis</i>	LMG 14294 <sup>T</sup>	50	26	18	14	21	70	10	16
<i>B. seminalis</i>	LMG 24067 <sup>T</sup>	473	203	161	386	144	286	123	240
<i>B. cenocepacia</i> IIIC	LMG 21462	44	65	49	41	47	33	36	44
<i>B. cenocepacia</i> IIID	LMG 19230	102	64	80	76	89	105	97	70
<i>B. cenocepacia</i> IIIB	LMG 18830	39	16	108	121	49	94	41	9
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	LMG 16656 <sup>T</sup>	31	15	11	9	14	11	6	79
<i>B. anthina</i>	LMG 20980 <sup>T</sup>	86	41	31	26	31	19	19	28
<i>B. ambifaria</i>	LMG 19182 <sup>T</sup>	77	35	25	123	98	103	59	49
<i>B. diffusa</i>	LMG 24065 <sup>T</sup>	164	98	42	68	87	53	50	41
<i>B. vietnamensis</i>	LMG 10929 <sup>T</sup>	65	27	19	15	23	35	56	17
<i>B. latens</i>	LMG 24064 <sup>T</sup>	238	96	169	209	150	176	99	150
<i>B. territorii</i>	LMG 28158 <sup>T</sup>	794	331	384	570	351	398	306	386
<i>B. pseudomultivorans</i>	LMG 26883 <sup>T</sup>	536	150	204	205	250	171	163	304
<i>B. multivorans</i>	LMG 13010 <sup>T</sup>	397	11	60	117	81	37	86	97
<i>B. dolosa</i>	LMG 18943 <sup>T</sup>	72	30	21	18	24	72	13	20
<i>B. ubonensis</i>	LMG 20358 <sup>T</sup>	299	137	229	200	216	243	177	153
<i>B. stagnalis</i>	LMG 28156 <sup>T</sup>	787	170	197	564	345	300	213	381
<i>B. puraquae</i>	LMG 29660 <sup>T</sup>	1065	378	451	690	404	459	290	450
<i>B. fungorum</i>	LMG 16225 <sup>T</sup>	499	1	4	3	3	1	3	1
<i>Burkholderia</i> sp.	-	1058	377	449	687	403	457	340	448

741 **Tabela 3.** Comparação dos perfis alélicos entre isolados do complexo *Burkholderia cepacia* obtidos de cebolas com podridão das escamas e  
 742 perfis de isolados depositados no PubMLST do complexo *B. cepacia*

Isolado	País	Fonte	<i>atpD</i>	<i>gltB</i>	<i>gyrB</i>	<i>lepA</i>	<i>phaC</i>	<i>recA</i>	<i>trpB</i>	ST
<b><i>B. cenocepacia</i> IIIA</b>										
CCRMBC199	Brasil	Cebola	16 <sup>b</sup>	11	582	11	6	14	147	1528 <sup>c</sup>
CCRMBC157	Brasil	Cebola	15	11	510 <sup>b</sup>	11	6	14	147	1529 <sup>c</sup>
7716 <sup>a</sup>	Índia	Fibrose cística (FC)	15 <sup>b</sup>	11	582 <sup>b</sup>	11	6	14	147	826
CCRMBC02, CCRMBC99	Brasil	Cebola	16	11	184 <sup>b</sup>	11	6	14	12	1530 <sup>c</sup>
CEP0224	Reino Unido	Clínico não FC	16	11	228 <sup>b</sup>	11	6	14	12	242
<b><i>B. cenocepacia</i> IIIB</b>										
CCRMBC18, CCRMBC31, CCRMBC45,CCRMBC259	Brasil	Cebola	16	16	580 <sup>b</sup>	68	41	19	13	1531 <sup>c</sup>
CEP0136	Reino Unido	Ambiente	16	16	177 <sup>b</sup>	68	41	19	13	204
CCRMBC60, CCRMBC64, CCRMBC67,CCRMBC81	Brasil	Cebola	16	108	326	68	185	49	226	395
OBC13-81	França	Clínico não FC	16	108	326	68	185	49	226	395
<b><i>Burkholderia</i> sp. (1)</b>										
CCRMBC74,CCRMBC171	Brasil	Cebola	320	568 <sup>b</sup>	858	223	295	339	205	1532 <sup>c</sup>
CCRMBCB33	Brasil	Cebola	320	367	854	385 <sup>b</sup>	403	485	205	1533 <sup>c</sup>
AU16482	EUA	FC	320	367 <sup>b</sup>	854	528 <sup>b</sup>	403	485	205	1304
<b><i>Burkholderiasp.</i> (2)</b>										
CCRMBC51	Brasil	Cebola	377	449	300 <sup>b</sup>	457	340	403	448	1534 <sup>c</sup>
R-66763	Brasil	FC	377	449	687 <sup>b</sup>	457	340	403	448	1058

- 743 <sup>a</sup> isolados depositados no PubMLST do complexo *B. cepacia*.
- 744 <sup>b</sup> Diferenças alélicas entre os isolados
- 745 <sup>c</sup> Novas ST



N-acetil- $\beta$ -D-Manaúcar	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil-D-Galactosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil ácido neuramínico	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 1% de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11 4% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 8% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-Metil Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	+	-	-	+	-	-	-	+	+
L-Fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inosina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sódio a 1% Lactato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido fusídico	+	+	+	-	+	+	+	+	-
D-Serina	+		-	-		-	-	-	-
D-Sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+







747 “+” reações positivas e “-“ reações negativas

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

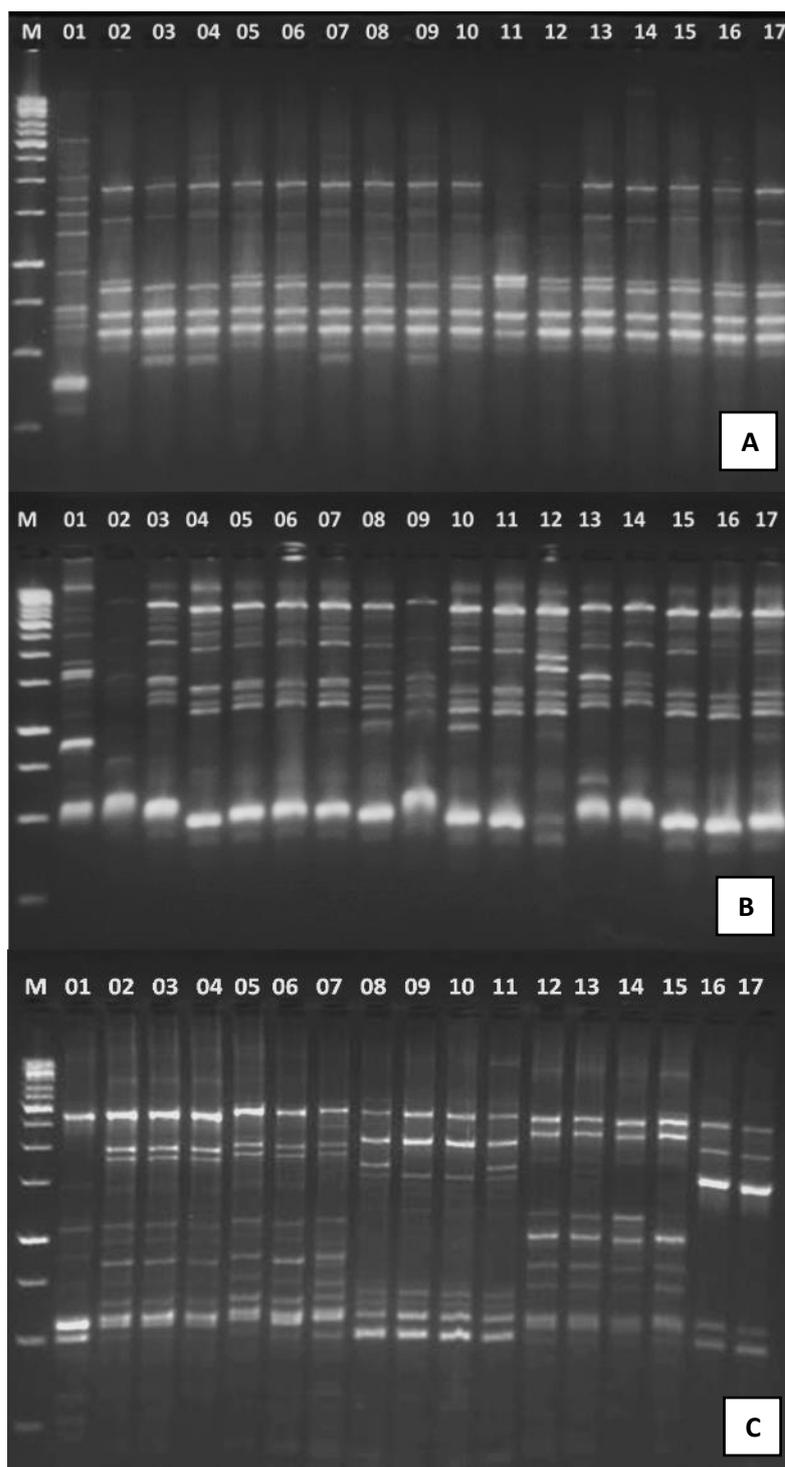
767

768

769

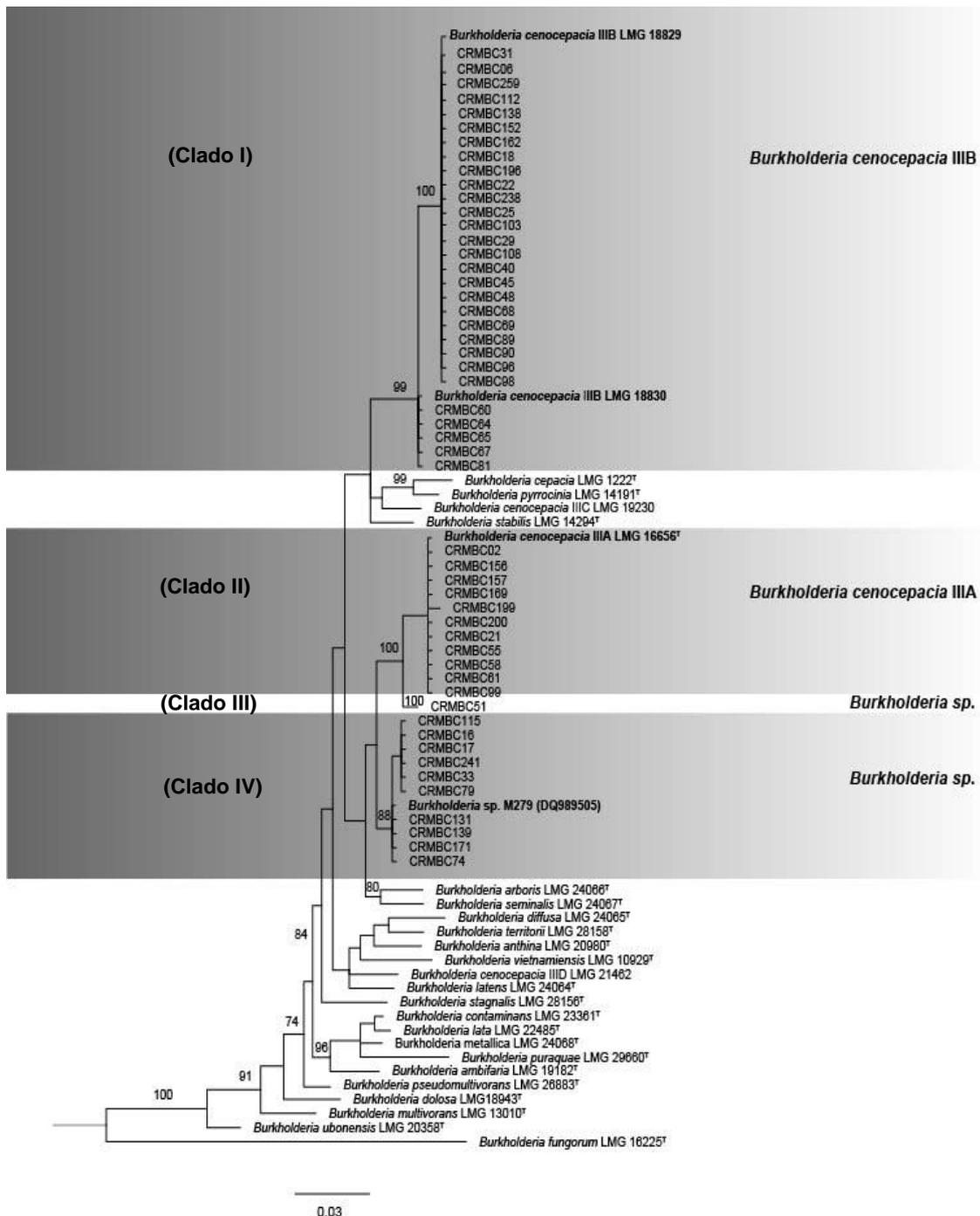
770

771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804



**Figura 1.** Géis de agarose mostrando os perfis genômicos dos isolados de *Burkholderia* spp. gerados com os marcadores BOX (A), ERIC (B) e REP (C). M = marcador molecular MassRuler 1k DNA Ladder; 1- Isolado IBSBF567<sup>TS</sup>; poços 02 a 17 = isolados do complexo *B. cepacia* (*Burkholderia cenocepacia* e *Burkholderia* sp.) pertencentes à Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM).



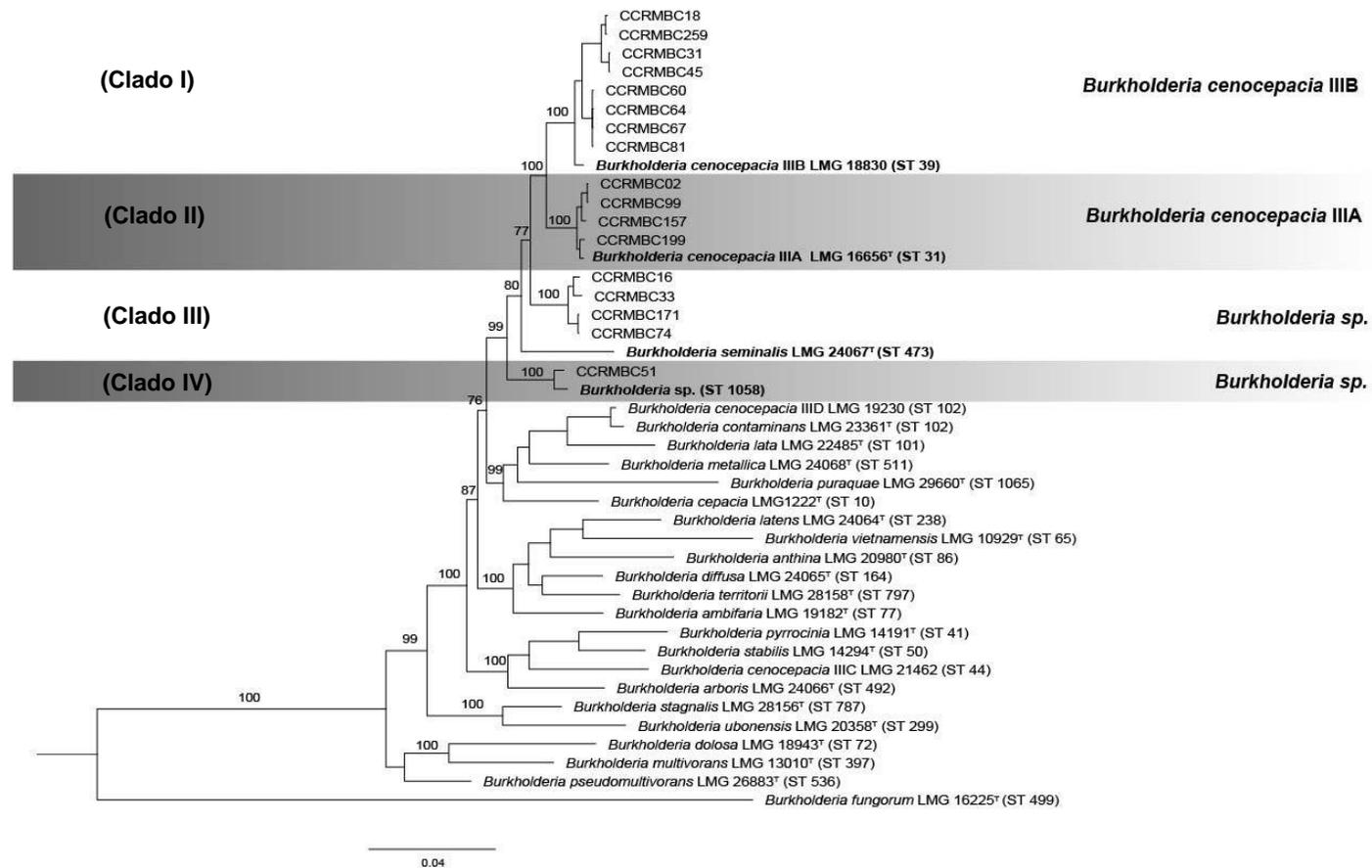


809

810 **Figura 3.** Árvore filogenética de Inferência Baesiana baseada em sequências do gene  
 811 *recA*, mostrando as relações dos isolados do complexo *B. cepacia* associados a podridão  
 812 das escamas no semiárido brasileiro e os taxas relacionadas. *Burkholderia fungorum* foi  
 813 o outgroup usado. Os suportes de probabilidade posterior e bootstrap são mostrados  
 814 nos ramos para valores  $\geq 0.95$  e  $\geq 70\%$ , respectivamente.

815

816



817

818 **Figura 4.** Árvore filogenética concatenada de Inferência Baeyiana baseada nas sequências dos genes *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *lepA*, *phaC*, *recA* e *trpB*,  
 819 mostrando as relações dos isolados do complexo *B. cepacia* associados a podridão das escamas no semiárido brasileiro e os taxos relacionados.  
 820 *Burkholderia fungorum* foi o outgroup usado. Os suportes de probabilidade posterior e bootstrap são mostrados nos ramos para valores  $\geq 0.95$   
 821  $e \geq 70\%$ , respectivamente.

---

**CAPÍTULO IV**  
**Conclusões gerais**

## CONCLUSÕES GERAIS

- Os isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* apresentaram variabilidade morfológica, sendo observados isolados pigmentados e não pigmentados;
- Os *primers* específicos CMG-23-1 e G-23-2 para *B. gladioli* não amplificaram todos os isolados do estudo, demonstrando baixa eficiência em detectar a variabilidade encontrada entre os isolados;
- Foi observada uma alta variabilidade genética entre os isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* por meio da técnica rep-PCR;
- Os sequenciamentos e análises filogenéticas com o gene *recA* e a MLSA permitiram o posicionamento taxonômico dos isolados como *B. gladioli*;
- Os isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* apresentaram variabilidade bioquímica e patogênica elevada, com diferenças na agressividade entre os isolados pigmentados e não pigmentados;
- A elevada variabilidade genética entre os isolados do CBC, observada por meio da técnica rep-PCR, foi explicada pela presença de várias espécies do CBC causando podridão das escamas, conforme demonstrado pelas análises filogenéticas com o gene *recA* e MLSA, as quais demonstraram a ocorrência de *B. cenocepacia* linhagens IIIA e IIIB, com destaque para a linhagem IIIA, a qual foi relatada pela primeira vez causando doença em plantas, bem como a ocorrência de duas novas espécies que serão descritas futuramente;
- A análise de MLST permitiu a detecção de sete novas sequências tipos;
- Foi observada variabilidade bioquímica e patogênica entre os isolados do CBC, pois houveram formação de diferentes grupos de patogenicidade bem como diferenças entre as 8 STs encontrada entre os isolados.