



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Etiologia da podridão de escama da cebola no semiárido
brasileiro**

Willams José de Oliveira

RECIFE-PE

2016

WILLAMS JOSÉ DE OLIVEIRA

**ETIOLOGIA DA PODRIDÃO DE ESCAMA DA CEBOLA NO
SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Elineide Barbosa de Souza

Coorientador: Dr. Adriano Márcio Freire Silva

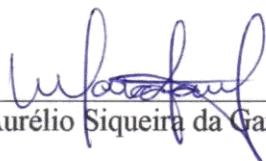
**RECIFE-PE
FEVEREIRO - 2016**

**ETIOLOGIA DA PODRIDÃO DE ESCAMA DA CEBOLA NO SEMIÁRIDO
BRASILEIRO**

WILLAMS JOSÉ DE OLIVEIRA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 19/02/2015.

ORIENTADOR:

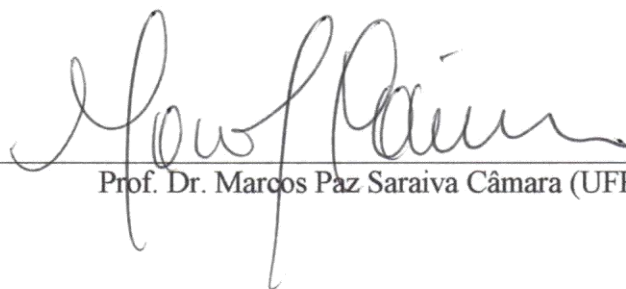


Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)

EXAMINADORES:



Prof. Dr. Jong Hyun Ham (LSU)



Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

**RECIFE-PE
FEVEREIRO-2016**

*Ao meu irmão, **Wanderson Oliveira** pela amizade, incentivo e bons exemplos e a minha noiva **Juliana Melo**, pelo companheirismo, amizade e compreensão nos momentos em que estive ausente.*

OFEREÇO

*Aos meus pais, **Gilvan Oliveira e Luciene Oliveira**, por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse estar aqui, pelo exemplo de caráter e de pessoas determinadas que são.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, que sempre estiveram comigo me iluminando e guiando nas horas difíceis;

À Prof^a Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano, a qual foi a minha primeira orientadora na Fitobacteriologia;

Ao meu orientador Prof Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama e a Prof^a Dra. Elineide Barbosa de Souza, pela amizade, dedicação e ensinamentos que levarei por toda a minha vida;

Ao amigo e coorientador Adriano Marcio Freire Silva, que sempre se empenhou para dar as melhores contribuições a essa pesquisa;

A UFRPE, onde tive a oportunidade de receber toda a minha formação deste curso;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela dedicação e importantíssimos conhecimentos compartilhados ao longo desta trajetória;

Aos funcionários do PPGF, por toda amizade e presteza;

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) pela parceria, permitindo a inestimável colaboração dos pesquisadores/extensionistas MSc. Jonas Araújo Candeia e MSc. Maria Cristina Lemos da Silva, os quais foram essenciais para o desenvolvimento dessa pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo;

A toda minha família e minha noiva que sempre me apoiaram;

A minha grande amiga Katia Cilene da Silva Felix, que contribui muito na minha formação com todo o seu exemplo de profissionalismo;

A todos os amigos que fiz no Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC): André, Alexandre, Ana Dulce, Alessandra, Carla, Conrado, Christiano, Claudeana, Edilaine, Elias, Emanuel, Greecy, Jessica, Joelma, Lendro Victor, Leandro Velez, Nelson, Pedro, Meridiana, Myrzania, Pedro e Walkiria.

Sumário

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO GERAL	9
GENERAL ABSTRACT.....	10
CAPÍTULO I.....	11
INTRODUÇÃO GERAL	10
1. A cultura da cebola.....	10
2. Podridão de escamas da cebola	12
3. Técnicas utilizadas para identificação e caracterização de bactérias	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO II.....	26
Abstract.....	27
Materials and Methods	30
Sampling, isolation and bacterial growth, and strain collection.....	30
Phylogenetic Analysis	31
rep-PCR Analysis.	32
Pathological characterization.....	33
Results	34
Origin of the strains and isolations.	34
Phylogenetic analysis.	35
rep-PCR.	35
Pathological characterization.....	36
Discussion.....	37
References	39
CONCLUSÕES GERAIS	58

RESUMO GERAL

O Brasil produziu aproximadamente 1.601.767 toneladas de cebola na safra de 2014, sendo a região nordeste responsável por 23% dessa produção. A cultura da cebola pode ser acometida por diversas doenças, destacando-se as podridões bacterianas. Dentre os tipos de podridões que ocorrem em bulbos de cebola destaca-se a podridão de escamas, a qual pode causar perdas de até 50% no Brasil. Essa doença está associada a bactérias do complexo *Burkholderia cepacea*, *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*. Visto que para aplicação de medidas de manejo eficientes faz-se necessário o conhecimento da etiologia da doença e que ainda não se sabe ao certo quais são os gêneros e espécies que estão associadas à podridão de escamas da cebola no semiárido nordestino, o presente estudo teve como objetivos: i) identificar as bactérias envolvidas com a doença nessa região por meio de sequenciamento e análise filogenética da região 16S rRNA, ii) avaliar o comportamento genético das espécies identificadas por meio de rep-PCR, e iii) avaliar o comportamento patológico das diferentes espécies identificadas. Para isto foram realizadas coletas nas principais regiões produtoras de cebola do semiárido Pernambucano e Baiano, seguindo-se o isolamento e depósito dos isolados na Coleção de Culturas Rosa Mariano (CRM) do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram obtidos 45 isolados, os quais foram agrupados em três clados: clado I, contendo isolados identificados como sendo do complexo *B. cepacia* (n= 29), clado II, contendo isolados identificados como *B. gladioli* (n=10) e clado III, contendo isolados identificados como *P. aeruginosa* (n=6). Esses isolados foram submetidos a análises de rep-PCR, sendo separados em 31 grupos ao nível de 70 % de similaridade. No entanto, não foi possível identificar esses três clados por meio desta técnica. Quando artificialmente inoculados em escamas de cebola, os isolados do complexo *B. cepacia* e de *B. gladioli* foram significativamente mais agressivos do que os isolados de *P. aeruginosa*. Com base na identificação filogenética realizada no presente estudo, conclui-se que a podridão de escamas de bulbos de cebola no semiárido nordestino brasileiro é causada por isolados do complexo *B. cepacia*, *B. gladioli* e *P. aeruginosa*. Além disso, mais de uma espécie do complexo *B. cepacia* pode estar associada à podridão de escamas nessa região.

Palavras-chave: podridão de bulbos, complexo *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

GENERAL ABSTRACT

It was produced approximately 1,601,767 tons of onions in the 2014 harvest in Brazil, and the northeastern region with approximately 23% of this production. The culture of the onion can be affected by various diseases, among them are the bacterial rot. Between the types of decay occurring in onion bulbs stands out the scales rot because it causes significant losses in Brazil. This disease is associated with bacteria from the *Burkholderia cepacea* complex, *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*. Given that for the application of efficient management measures it is necessary to understand the etiology of the disease and that it is not known for sure what the genera and species that are associated with the rot of onion scales in the semi-arid northeast, the present study have the following objectives: i) identify the bacteria involved with the disease in this region by sequencing and phylogenetic analysis of 16S rRNA region, ii) evaluate the behavior relatedness of the species identified by rep-PCR, and iii) evaluate the pathological behavior of different species identified. For this purpose, samples were taken in the main producing regions of onion in Pernambuco and Bahia semi-arid region, followed by the isolation and storage of strains in Culture Collection Rosa Mariano (CRM) of the Phytobacteriology Laboratory at the Federal Rural University of Pernambuco. We obtained 45 strains which were grouped into three clades: clade I, containing strains identified as *B. cepacia* complex (n = 29), clade II containing strains identified as *B. gladioli* (n = 10) and clade III containing strains identified as *P. aeruginosa* (n = 6). These strains were submitted to analysis of rep-PCR and were separated into 31 groups with level 70% of similarity. However, it was not possible to identify these three clades by this technique. When artificially inoculated in onion scales, strains of *B. cepacia* complex and *B. gladioli* were significantly more aggressive than *P. aeruginosa* strains. Based on phylogenetic identification performed in this study, it is concluded that the rot of onion bulb scales in the Brazilian semi-arid northeast is caused by the strains of *B. cepacia* complex, *B. gladioli* e *P. aeruginosa*. Moreover, more than one species of the *B. cepacia* complex may be associated with rot scales in this region.

Keywords: bulb's rot, *Burkholderia cepacia* complexo, *Burkholderia gladioli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura da cebola

O gênero *Allium* L. é largamente distribuído em áreas temperadas, tropicais e em zonas boreais do hemisfério norte (BREWSTER, 2008). Pertencente à classe Monocotyledoneae, ordem Asparagales e família Alliaceae (APG, 2003), esse gênero possui espécies que são tipicamente cultivadas em áreas abertas, ensolaradas e de clima árido (BREWSTER, 2008). Dentro desse gênero destaca-se a cebola (*Allium cepa* L.), que no Brasil é cultivada principalmente por pequenos agricultores, demandando muita mão de obra e contribuindo para a fixação do homem no campo, fator que reduz a migração para as grandes cidades (RESENDE; COSTA, 2007).

A cebola é cultivada há aproximadamente 4.700 anos e não possui espécie ancestrais selvagens, tendo sido domesticada provavelmente pela primeira vez nas regiões montanhosas do Turcomenistão e norte do Irã, mais precisamente na fronteira com a Suméria. O sudoeste da Ásia é considerado o primeiro centro de domesticação e diversidade desse vegetal, com o mediterrâneo sendo estimado como um centro secundário (HANELT, 1990; FRITSCH; FRIESEN, 2002).

Morfologicamente, a cebola caracteriza-se como uma planta herbácea, cuja parte comercial é um bulbo tunicado, que apresenta variação em formato, cor, pungência, tamanho e conservação pós-colheita. As bainhas foliares nas quais as folhas se inserem projetam-se acima da superfície do solo e formam o pseudocaule da planta (KILL; RESENDE; SOUZA, 2007). O caule verdadeiro deste vegetal caracteriza-se como um disco comprimido, comumente chamado de prato, que se localiza na base da planta. Do prato emergem as raízes, que por sua vez crescem no sentido predominantemente vertical, com maior concentração nos primeiros 30 cm do solo, mas podendo alcançar 60 cm de profundidade (FILGUEIRA, 2008; KILL; RESENDE; SOUZA, 2007).

A cebola é uma planta bienal, com ciclo composto por uma fase vegetativa e uma fase reprodutiva, sendo o fotoperíodo um fator limitante para sua produção. Temperaturas amenas durante o crescimento vegetativo e ligeiramente mais elevadas durante a bulbificação favorecem o desenvolvimento da planta. A cultura adapta-se melhor a solos com textura média, porém apresenta também boa produção em solos arenosos. O pH ideal varia de 5,5 a 6,5 (FILGUEIRA, 2008). As cultivares de cebola

podem ser de ciclo precoce, médio ou tardio. As cultivares precoces, têm um ciclo com duração de 4 a 5 meses e uma exigência de fotoperíodo de 10 a 11 h de luz durante a bulbificação. As cultivares de ciclo médio necessitam de 5 a 6 meses para o seu desenvolvimento e apresentam exigência fotoperiódica de 11 a 13 h. Por sua vez, as cultivares tardiastêm um ciclo com duração de 6 a 8 meses e exigência de fotoperíodo com mais de 13 h de luz (COSTA; RESENDE, 2007; FILGUEIRA, 2008).

A produção mundial de cebola, em 2013, foi de 85,8 milhões de toneladas. Os principais produtores mundiais foram China, Índia, Estados Unidos, Irã e Rússia, os quais produziram juntos cerca de 50 milhões de toneladas (FAO, 2013). Em 2014, foram produzidas cerca de 1.601.767 toneladas de cebola no Brasil, destacando-se o estado de Santa Catarina, com uma produção de 474.709 toneladas. Nesta safra, a região Nordeste foi responsável pela produção de 371.570 toneladas, sendo Pernambuco e Bahia os principais estados produtores, com 48.440 e 323.120 toneladas produzidas, respectivamente (IBGE, 2015).

Em Pernambuco, o período de maior disponibilidade deste produto no Centro de Abastecimento e Logística (CEASA-PE) vai de julho a dezembro. Os principais municípios nordestinos que abastecem o CEASA são Petrolina, Cabrobó e Belém de São Francisco, os quais são localizados no estado de Pernambuco, e Juazeiro, Irecê, Casa Nova e Mucuge, que por sua vez situam-se no estado da Bahia (CEASA, 2015).

Várias doenças podem incidir sobre a cultura da cebola, as quais podem ser causadas por fungos, namatoides, vírus e bactérias. As principais doenças fúngicas que incidem na cultura da cebola são: mancha purpura, causada por *Alternaria porri* e *Stemphylium vesicarium*; mildio, causado por *Peronospora destructor*; queima das pontas, causada por *Botrytis squamosa*; raiz rosada da cebola, causada por *Pyrenochaeta terrestres*; mal de sete voltas, causado por *Colletotrichum gloeosporioides*; e podridão basal, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Por sua vez, os nematoides apresentam-se como um sério problema para a cultura, com destaque para *Meloidogyne* spp e *Ditylenchus dipsaci*, enquanto as viroses sapeca e nanismo amarelo, causadas por *Iris yellow spot virus* (IYSV) e *Onion yellow dwarf virus* (OYLV), respetivamente, foram relatadas causando doenças em cebola (CONN; LUTTON; ROSENBERG, 2012; KOIKE et al., 2007). Dentre as doenças de origem bacteriana destacam-se a podridão mole, associada a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al., *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*

(Broun) Stevens, *Erwinia rhapontici* (Millard) Hauben et al. e *Dickeya chrysanthemi* (Burkholder et al.) Samson et al. (SCHWARTZ; GENT, 2007; WORDELL FILHO; BOFF, 2006) e a podridão de escamas, a qual pode ser causada por espécies do complexo *Burkholderia cepacia* (Palleroni e Holmes) Yabuuchi et al., *Burkholderia gladioli* (Burkholder) Young et al., *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (WORDELL FILHO; BOFF, 2006) e *Serratia marcescens* Bizio (MALAVOLTA JR. et al, 2008).

Dentre as doenças acima descritas, as podridões de bulbos causadas por vários gêneros e espécies bacterianas são de grande importância econômica, pois ocasionam perdas significativas na produção (ZAMBOLIM; VALE; COSTA, 2000). Além disso, não existem estudos sobre a etiologia dessa doença no semiárido nordestino (MALAVOLTA JR. et al., 2008).

2. Podridão de escamas da cebola

Dois tipos de podridões de etiologia bacteriana podem ser comumente observados em bulbos de cebola: podridão mole e podridão de escamas. A podridão-mole ocorre em várias hortaliças e é responsável por causar perda de peso de bulbos de cebola em pós-colheita em regiões de clima tropical e subtropical. A principal bactéria associada a essa doença é *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, embora *P. marginalis* pv. *marginalis*, *E. rhapontici* (WORDELL FILHO; BOFF, 2006) e *D. chrysanthemi* (SCHWARTZ; GENT, 2007) também sejam relatadas como agentes causais de podridão mole em cebola. Adicionalmente, especula-se que *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ocorra em todas as regiões ceboleiras do Brasil. No entanto, não existem estudos que comprovem essa hipótese (WORDELL FILHO; BOFF, 2006).

Os sintomas característicos da podridão mole são manchas de coloração amarelada a marrom claro, que vão ficando amolecidas com o progresso da doença. O bulbo pode apodrecer completamente e um exsudato viscoso, o qual exala um odor desagradável, pode extravasar pela região do pescoço. Com o apodrecimento do bulbo, observa-se murcha e clareamento das folhas (REIS; HENZ; LOPES, 2015; GAVA; TAVARES, 2007). Embora muitos bulbos apresentem-se sadios, internamente as escamas podem estar deterioradas. Com o avanço da doença, micro-organismos

saprofíticos invadem o tecido e a podridão espalha-se por todo o bulbo (WORDELL FILHO; BOFF, 2006).

Por sua vez, a podridão de escamas é uma doença de ocorrência generalizada, podendo causar perdas de até 50% durante a comercialização dos bulbos (WORDELL FILHO; BOFF, 2006). As bactérias associadas a podridões de escamas são *B. cepacea*, *B. gladioli* pv. *alliicola*, *P. aeruginosa* (WORDELL FILHO; BOFF, 2006) e *S. marcescens* (MALAVOLTA JR. et al, 2008). Além dessas bactérias, *Burkholderia multivorans* Vandamme et al. também pode estar envolvida com a podridão de escamas (WORDELL FILHO; BOFF, 2006).

A podridão de escamas está associada a várias espécies de bactérias e, dependendo da espécie envolvida, pode haver diferenças entre a sintomatologia e a nomenclatura da doença. Nesse contexto, quando a infecção é causada por *B. cepacia* a doença é chamada de camisa d'água ou podridão bacteriana da escama, pois está associada às camadas mais externas dos bulbos, não afetando as camadas mais internas (Figura 1A e 1B). 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 expelem odor sulfuroso. Quando a infecção é causada por *P. aeruginosa* a doença é chamada de escurecimento interno do bulbo (Figura 1C). Nesse caso, observa-se uma podridão que não chega a ser mole e as escamas adjacentes permanecem intactas (WORDELL FILHO; BOFF, 2006). Por último, *S. marcescens* tem sido associada à podridão do pescoço e a maceração das escamas externas de bulbinhos destinados ao cultivo de soqueira no estado de São Paulo (MALAVOLTA JR. et al., 2008; WORDELL FILHO; BOFF, 2006).

A primeira ocorrência da podridão em escamas no mundo foi realizada por Burkholder (1950) em 1950, o qual observou a doença sendo causada por *B. cepacia* em campos de produção de cebola no estado de Nova York, nos Estados Unidos. Em 1973, Roberts (1973) realizou o primeiro relato de *B. gladioli*, causando podridão em cebola. Posteriormente, em 1976, *P. aeruginosa* foi relatada como agente causal do apodrecimento interno marrom em bulbos de cebola na Austrália, sendo este o primeiro relato da doença no mundo (COTHER et al., 1976). *S. marcescens* foi isolada pela primeira vez de bulbos de cebola em 1986 (COTHER; DOWLING, 1986).

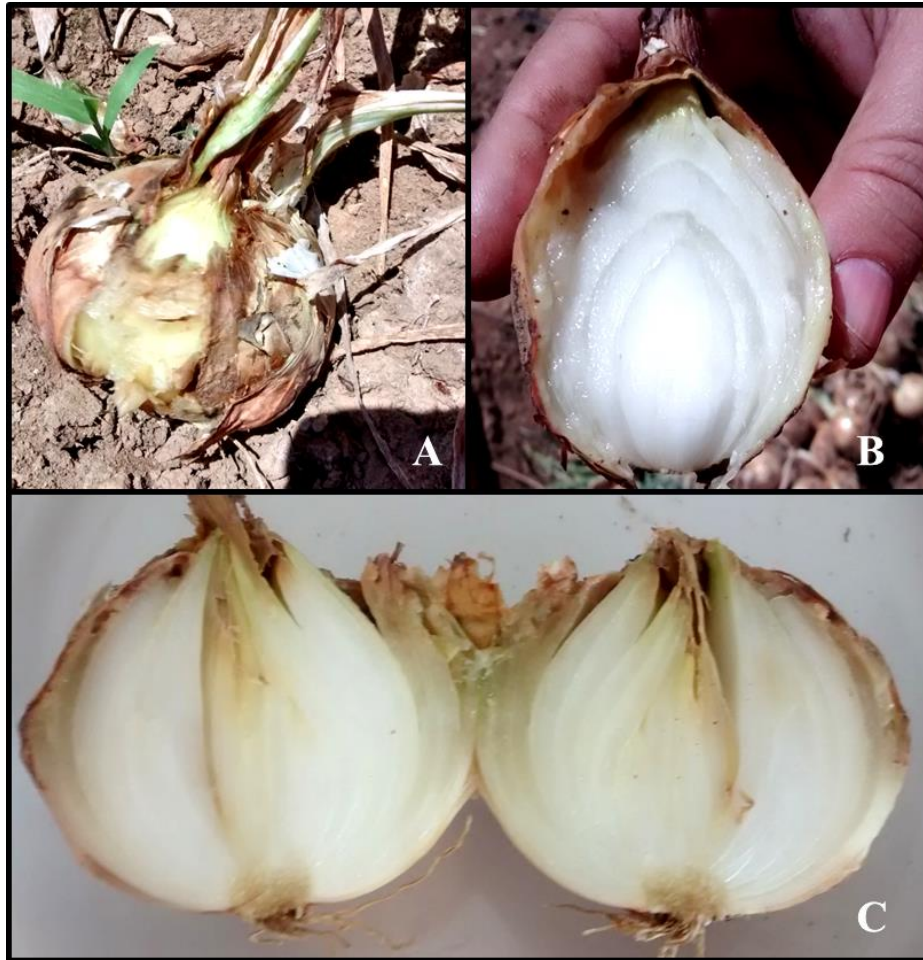


Figura 1. Sintomas de podridão de escamas em bulbos de cebola cv. IPA 11. **A.** Bulbo apresentando sintomas de podridão nas escamas mais externas; **B.** Corte longitudinal mostrando sintomas internos da podridão; e **C.** Bulbo de cebola apresentando podridão nas escamas mais externas e escurecimento interno do bulbo.

Dentre as bactérias descritas acima, *B. cepacea*, *B. gladioli* pv. *alliicola*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *D. chrysanthemi*, *P. aeruginosa* e *S. marcescens* já foram detectadas causando podridão em bulbos de cebola no Brasil (MALAVOLTA JR. et al., 2008).

As bactérias do gênero *Burkholderia* são classificadas no filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Burkholderiales e família Burkholderiaceae (KADO, 2010). São Gram negativas, em formato de bastonetes retos ou curvos com 0,5-1,0 x 1,5-4,0 μm , possuem um ou vários flagelos polares. Apresentam reação positiva para catalase e acumulam ácido poli- β -hidroxibutirato. A maioria das espécies são

estritamente aeróbicas e não produzem pigmentos fluorescentes em condições de deficiência de ferro (CHUN; JONES, 2001).

Estudos filogenéticos demonstraram que *B. cepacia* compreende um complexo formado por 17 espécies estreitamente relacionadas, sendo 10 delas já relatadas em plantas: *B. anthina*, *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. contaminans*, *B. dolosa*, *B. lata*, *B. multivorans*, *B. seminialis*, *B. stabilis* e *B. vietnamiensis* (TORBECK, 2011; VANDAMME; DAWYNDT, 2010). Os membros deste complexo apresentam um alto grau de diversidade catabólica e diferentes propriedades biológicas (MCLOUGHLIN, 1992), podendo atuar como fitopatógenos, patógenos humanos e agentes biocontroladores (PARCKER; GURIAN-SHERMAN, 2001).

A base para a marcante versatilidade ecológica e nutricional do complexo *B. cepacia* é oriunda do seu genoma complexo e incomum. As espécies que compõem esse grupo possuem de 2 a 4 cromossomos (geralmente 3) e um ou mais plasmídeos. O tamanho do genoma completo é de 4 a 9 Mb, cerca de três vezes maior do que o genoma de *Escherichia coli*. Além disso, o número de cromossomos, bem como o tamanho do genoma, podem variar entre isolados de um mesmo genótipo (PARCKER; GURIAN-SHERMAN, 2001).

Os sintomas causados pelo complexo *B. cepacea* em cebola 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 firmes 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). Adicionalmente, bulbos infectados por *B. cepacia* apresentam normalmente odor avinagrado, diferenciando-se daqueles infectados por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, os quais apresentam odor fétido (WORDELL FILHO et al., 2006).

A espécie *B. gladioli*, embora não seja fluorescente, produz pigmentos amarelos difusos que podem ser facilmente observados em meio de cultura (BRADBURY, 1986). A podridão causada por esta bactéria 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 pressionados na base, ejetam a parte central doente. 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 et al., 2006).

O gênero *Pseudomonas* pertence à classe Gammaproteobacteria, família Pseudomonadaceae (KADO, 2010). As bactérias deste gênero são Gram negativas, em forma de bastonetes retos ou curvos, medindo de 0,5-1,0 x 1,5-4,0 µm. A sua motilidade é gerada a partir de um ou vários flagelos inseridos de forma polar, em uma das porções terminais do bastonete. São catalase positivas e estritamente aeróbicas, com exceção daquelas desnitrificantes (BRAUN-KIEWNICK; SANDS, 2001).

P. aeruginosa é descrita como uma bactéria oportunista, sendo comumente isolada a partir de tecidos de cebola apodrecidos em decorrência de infecções causadas por *P. marginalis* e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, sugerindo que pode haver sinergismo entre estas espécies bacterianas (BRADBURY, 1986). Isoladamente, *P. aeruginosa* ocasiona escurecimento das escamas internas dos bulbos de cebola, cuja podridão não chega a ser mole e as escamas adjacentes permanecem intactas. Em humanos, assim como alguns isolados do complexo *B. cepacia*, isolados de *P. aeruginosa* também são capazes de causar infecções, principalmente em pacientes debilitados com infecções pulmonares (FELTMAN et al., 2001).

As bactérias do gênero *Serratia* pertencem à família Enterobacteriaceae, possuem bastonetes retos medindo de 0,5-0,8 x 0,9-2,0 µm, são Gram negativas, geralmente moveis por vários flagelos distribuídos ao redor da célula. São aneróbicas facultativas, reduzem nitrato a nitrito, crescem em temperaturas de 10 a 36° C e pH de 5 a 9 (GRIMONT; GRIMONT, 2004). Em meio de cultura, isolados de *S. marcescens* podem apresentar-se pigmentados (coloração vermelha) e apigmentados. Podem apresentar atividade saprofítica, patogênica, e de promoção de crescimento de plantas (KURZ et al., 2003). Além disso, alguns isolados podem causar infecção generalizada em humanos (WOLF; BOER, 2015). Em cebola, *S. marcescens* provoca podridão do pescoço e maceração das escamas externas (WORDELL FILHO; BOFF, 2006).

O manejo das podridões de escamas em bulbos de cebola deve ser realizado de forma preventiva (REIS; HENZ; LOPES, 2015). Recomenda-se usar bulbos e sementes

sadias; evitar excesso de umidade no solo; não utilizar implementos agrícolas que estiveram em campos onde a doença foi constatada; fazer rotação com espécies de outras famílias botânicas; controlar insetos; evitar ferimentos nas plantas durante os tratamentos culturais; eliminar as plantas com sintomas no campo e descartar bulbos colhidos que pareçam infectados; colher os bulbos somente no estágio de maturação correto; armazenar os bulbos em baixas temperaturas, com baixa umidade do ar e em locais aerados (ROMEIRO, 1995; REIS; HENZ; LOPES, 2015).

Para que o controle possa ser usado com eficiência para redução de perdas, é necessário o conhecimento prévio da etiologia e epidemiologia da doença (WALLER, 2001). Assim, as medidas de controle dependem da identificação adequada das doenças e dos agentes causais, pois do contrário tais medidas podem causar o desperdício de tempo e dinheiro, levando a mais perdas. Portanto, o diagnóstico correto da doença e a identificação do seu agente causal são vitais para o sucesso do controle (RILEY; WILLIAMSON; MALOY, 2002).

3. Técnicas utilizadas para identificação e caracterização de bactérias

A identificação e a caracterização da diversidade de bactérias podem ser realizadas por meio de técnicas convencionais, tais como análise da morfologia da colônia, da célula bacteriana e das características fisiológicas, bioquímicas e patogênicas, bem como através de técnicas moleculares (JANSEN, 2005).

A partir dos anos 80, a identificação de bactérias passou a ser desenvolvida levando-se em consideração relações filogenéticas determinadas por meio de comparações de regiões conservadas do genoma, sendo a região 16S rDNA bastante utilizada para classificação taxonômica (WOESE, 1987) e identificação de diversas espécies de fitobactérias (HAUBEN et al., 1997; SILVA et al., 2012). Assim, a região 16S rDNA foi utilizada de forma bem sucedida para identificar isolados de *B. gladioli* pv. *aliicola* obtidos a partir de bulbos de cebola com sintomas de podridão de escama na Coreia (LEE et al., 2005). No entanto, é importante mencionar que pelo fato de *B. cepacia* ser formada por espécies estreitamente relacionadas, com nível elevado de similaridade nessa região ($\geq 97,5\%$) (COENYE et al., 2001), esta técnica apresentou-se

com baixa precisão para determinação dos relacionamentos filogenéticos entre os membros desse complexo (VANDAMME; DAWYNDT, 2011).

Com o advento da biologia molecular, novas técnicas que permitem mensurar a diversidade de uma população de forma acurada e rápida foram surgindo. Nesse contexto, uma das ferramentas de biologia molecular bastante utilizada é a técnica de rep-PCR (repetitive-PCR). Esta técnica foi desenvolvida com base na ocorrência de sequências repetitivas conservadas específicas: REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e BOX (elementos BOX) (LOUWS et al., 1999).

Os *primers* utilizados na análise de rep-PCR, foram desenvolvidos para amplificar a região do DNA entre dois elementos repetitivos adjacentes, gerando um arranjo complexo de aproximadamente 10 a 30 fragmentos de DNA variando de 200 pb a 6 Kb. Adicionalmente, esta técnica tem sido utilizada para identificar patógenos, diferenciar isolados e estudar diversidade genética de patógenos de plantas (LOUWS et al., 1999).

No desenvolvimento de estratégias de controle de doenças de plantas é imprescindível conhecer o comportamento patogênico dos isolados associados à doença. Nesse contexto, os componentes epidemiológicos da doença caracterizam-se como importantes instrumentos de investigação (BROWN, 1998). Período de incubação, índice de doença, taxa de progresso da doença e área abaixo da curva de progresso da doença constituem importantes instrumentos comparativos e analíticos da intensidade da doença. O período de incubação indica a velocidade com que o patógeno coloniza o hospedeiro; o índice de doença reflete a severidade da doença; a taxa de progresso da doença revela a velocidade de crescimento da severidade da doença no tempo; enquanto a área abaixo da curva de progresso da doença é a melhor representação temporal de uma epidemia, sendo utilizada para sumarizar a curva de progresso da doença (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

Visto que ainda não se sabe ao certo quais são os gêneros e espécies bacterianas que estão associadas à podridão de escamas da cebola no semiárido nordestino, o presente estudo teve como objetivos: i) identificar as bactérias envolvidas com a doença nessa região por meio de sequenciamento e análise filogenética da região 16S rRNA, ii) avaliar o relacionamento genético das espécies identificadas por meio de rep-PCR, e iii) avaliar o comportamento patogênico das diferentes espécies identificadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, D. Aliáceas. In: _____. (Ed.). **Manual de culturas horticolas**. Lisboa: Editora presença, 2006. v. 1, p. 25 -77.

APG (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the angiosperm Phylogeny Group classification of the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**. Londres, v. 141, n. 4, p. 399-343, 2001.

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

BRAUN-KIEWNICK, A; SANDS, D. C. *Pseudomonas*. In: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. (Ed.). **Plant Patogenic Bacteria**. 3. ed. St. Paul: APS, 2001, p. 84 – 120.

BREWSTER, J. L. Onions and outhere vegetable alliums. In: _____. (Ed.). **The classification, origins, distribution and economic importance of the major vegetable crops**. 2. ed. Wallingford: CABI, 2008. v. 1, p. 1–222.

BREWSTER, J. L. Onions and outhere vegetable alliums. In: _____. (Ed.). **Interaction with other organisms: weeds, pests, disease and symbionts**. 2. ed. Wallingford: CABI, 2008. v. 1, p. 171- 250.

BROWN, J. K. M. Surveys of variation in pathogen population and their applications to disease control. In: JONES, G. (Ed.). **The epidemiology of plant disease**. Dordrecht: Kluwer, 1998. p. 73-102.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial roto f Onion Bulbs. **Phytopathology**. Saint Paul, v. 40, n, 1, p. 115-117, 1950.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532 p.

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

CEASA, **Calendário de comercialização de hortifrutigranjeiros**. Disponível em: <<http://www.ceasape.org.br/calend.php>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

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, n. 10, p. 3427–3435, 2001.

CONN, K. E.; LUTTON, J. S.; ROSENBERG, S. A. **Onion disease guide**. Australia: Seminis Plant Health, 2012. 72 p.

COSTA, N.D; RESENDE, G.M. Cultivares. In: _____. (Ed.). **Cultivo da cebola no nordeste**. Brasília, 2007. p. 20–23. (Embrapa-Sistema de produção 3).

COTHER, E.J.; DARBYSHIRE, B.; BREWER, J. *Pseudomonas aeruginosa*: Cause of internal brown rot of onion. **Phytopathology**. Saint Paul, v. 66, n. 7, p. 828-834, 1976.

COTHER, E. J.; DOWLING, V. Bacteria associated with internal breakdown of onion bulbs and their possible role in disease expression. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 35, n. 3, p. 329-336, 1986.

DAVIS, R. M. Sour Skin. In: HOWARD, F. S.; MOHAN, S. K. (Ed.). **Compendium of onion and garlic diseases and pests**. St. Paul: APS, 1995, p. 32–33.

DAVIS, R. M.; AEGERTER, B. J.; LAEMMLEN, F. F.; VOSS, R. E. Onion and garlic, bacterial soft rot, Pathogens: *Erwinia carotovora* sp. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Pseudomonas gladioli*, and *Enterobacter cloacae*. **UC Pest Management Guidelines**.

California: University of California, 2014. Disponível em:

<<http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r584100811.html>>. Acesso em 07 fev. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.

Statistics division. 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>.

Acesso em: 07 fev. 2015.

FELTMAN, H.; SCHULERT, G.; KHAN, S.; JAIN, M.; PETERSON, L.; HAUSER, A.R. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, Reading, v. 147, n. 10, p. 2659-2669, 2001.

FILGUEIRA, F. A. R. Aliáceas: Cebola e outros condimentos. In: _____. (Ed.). **Novo manual de olericultura**. 3º Ed. Viçosa: Editora UFV, 2008, p. 255 – 278.

FRITSCH, R.M.; FRIESEN, N. Evolution, domestication and taxonomy. In:

RABINOWITCH, H. D.; CURRAH, L. **Allium crop science: recent advances**.

Wallingford: CAB International, 2002. p. 5-30.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D.; *Serratia*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.;

STALEY, J.T. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. Michigan:

Springer, 2004. v. 2, p. 799–811.

HAUBEN, L.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; MOORE, E. R. B. Comparison of 16 S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. **International journal**

systematic bacteriology, Londres, 1997, v. 57, n. 2, p. 328-335.

HANELT, P. Taxonomy, evolution and history. In: RABINOWITCH, H.D.;

BREWSTER, J. L. **Onions and allied crops**. Florida: CRC press, 1990. v. 1, p. 1-26.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms.

Microbial ecology, New York, 1998, v. 35, n. 1, p. 1-21.

IBGE, **Indicadores IBGE, estatísticas da produção agrícola (junho – 2015)**. Brasília, 2015, p. 46.

KADO, C. I. Classification of plant-patogenic Bacteria. In: _____. (Ed.). **Plant bacteriology**. St. Paul, 2010, p. 21–62.

KOIKE, S. T.; GLADDERS, P.; PAULUS, A. O. **Vegetable diseases, a colour handbook**. Londres: Manson Publishing , 2007. 437p.

JANSEN, J. D. Phytobacteriology and diagnosis of bacterial diseases of plants. In: _____. (Ed.). **Phytobacteriology principle and practice**. Londres: CABI publishing, 2005. p. 35–79.

KILL, L. H. P.; RESENDE, G.M.; SOUZA, R.J. **Cultivo da cebola no Nordeste: Botânica**. EMBRAPA, 2007. Disponível em:
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/botanica.htm>>. Acesso em: 03 fev. 2016.

KURZ C. L.; CHAUVET S.; ANDRES E.; AUROUZE M.; VALLET I.; MICHEL G. P.; UH M.; CELLI J.; FILLOUX A.; DE BENTZMANN S.; STEINMETZ I.; HOFFMANN J. A.; FINLAY B. B.; GORVEL J. P.; FERRANDON D.; EW BANK J. J. Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. **EMBO Journal**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 1451–1460, 2003.

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**, Clayton, v. 34, n. 3, p. 287 – 292, 2005.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR- Based Genomic Analysis of Phytobacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. **Annual Review Phytopathology**. Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

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**. São Paulo, v. 37, special supplement, p. 9-88, 2008.

MAREFAT, A. **Identification, diversity and detection of *Xanthomonas* strains associated with pistachio dieback in Australia**. 2005. 93 f. Tese (Doutorado em Doença de Plantas) – University of Adelaide, Australia, 2005.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ALVARADO, I. C. M.; SILVA, A. M. F. Bactérias fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, Recife, v. 2, n. 1, p. 121-153, 2005.

MCCLOUGHLIN, T.J.; QUINN, J.P.; BETTERMANN, A.; AND BOOKLAND, R. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. **Applied environmental microbiology**, Washington, v. 58, n. 5, p. 1760-1763, 1992.

MILLER, P. R. New techniques for plant disease surveys and for appraisal of losses. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 44, n. 1, p. 5-11, 1960.

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

MOORE, E. R. B.; MAU, M.; ARNSCHEIDT, A.; BOTTEGER, E. C.; HUTSON, R. A.; COLLINS, M. D.; VAN DE PEER, Y.; DE WACHTER, R.; TIMMIS, K. N. The determination and comparison of the 16 S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas sensu stricto* and estimation of the natural intrageneric relationships. **Systematic and applied microbiology**, Stuttgart, v.19, n. 3, p. 478 – 492, 1996.

OLIVEIRA, V.R. **Cebola**. Brasília, 2012. Disponível em:

<<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cebola/arvore/CONT000gn0iyu2a02wx5ok0liq1mq7mr143w.html>> Acesso em: 27 jan. 2016

PALLERONI, N. J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic Acid Homologies in the Genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Reading, v. 23, n. 4, p. 333-339, 1973.

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

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.htm> Acesso em: 04 fev. 2016.

RILEY, M.B.; WILLIAMSON, M. R.; OTIS, M. Plant disease diagnosis. The Plant Health Instructor. 2002. Disponível em: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/PlantDiseaseDiagnosis.aspx> Acesso em: 09 jan. 2016

ROBERTS, P. A soft rot of imported onions caused by *Pseudomonas alliicola* (Burk.) Starr & Burk. **Plant Pathology**. Saint Paul, v. 22, n. 3, p. 98, 1973.

ROBERTS, S. **Bacterial storage rots in onion caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola***. Warwick: Plant Health Solution, 2013. Disponível em: <http://www.planthealth.co.uk/downloads/Bga_Onions_Poster_2013_A4.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2016.

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.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Editora UFV: Viçosa. 1995. 367 p.

SEO, T. S.; TSUCHIYA, K. PCR-Based identification and characterization of *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 413-419, 2004.

TORBECK, L.; RACASSI, D.; GUILFOYLE, D. E.; FRIEDMAN, R. L. Burkholderiacepacia: This Decision Is Overdue. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, Bethesda, v. 65, n. 5, p. 535-543, 2011.

SYRMIS, M. W.; O'CARROLL, M. R.; SLOOTS, T.P; COULTER, C.; WAINWRIGHT, C. E.; BELL, S. C.; NISSEN, M. D. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. **Journal of Medical Microbiology**, Londres, v. 53, n.11, p. 1089 – 1096, 2004.

VANLAERE, E.; LIPUMA, J. J.; BALDWIN, A.; HENRY, D.; BRANDT, E. D.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 7, p. 1580-1590, 2008.

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

WALKER, S.; GOLDBERG, N.; CRAMER, C. **Onion diseases in New Mexico**. New Mexico: New Mexico State University. 2013. 11 p. (Circular, 538).

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, n. 2, p. 221 – 271, 1987.

WOLF, J.V.D.; BOER, S. H. Phytopatogenic bacteria. In: LUGTENBERG, B. **Principle of plant-microbe interation: microbe for sustainable agriculture.** Londres, 2015. p. 65–77.

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 Immunology**, Amsterdam, v. 36, n. 12, p. 1251 -1275, 1992.

WALLER, J. M. Postharvest diseases. In: WALLER, J.M.; WALLER, L. S. J. **Plant pathologist's pocketbook.** Nova York: CABI publishing, 2001, p. 39–55.

CAPÍTULO II

**ETIOLOGY OF THE ROTTING OF ONION SCALES IN THE
BRAZILIAN NORTHEASTERN SEMI-ARID REGION**

25 *gladioli* were more aggressive to onion scales than those from *P. aeruginosa*. Based on
26 phylogenetic identification performed from this study, we conclude that scale rot of
27 onion bulbs in the semi-arid region of Brazilian northeastern is caused by strains from
28 the *B. cepacia* complex, *B. gladioli* and *P. aeruginosa*. In addition, more than one
29 species from the *B. cepacia* complex may be associated with disease in the semi-arid
30 region of northeastern Brazil. However, further studies are needed to prove this
31 hypothesis.

32

33 The onion (*Allium cepa* L.) production in Brazil was about 1.601.767 ton of
34 bulbs on harvest of 2014 and the Brazilian northeastern semi-arid region was
35 responsible for the about 23% of the production (IBGE 2015). The onion can be
36 affected by several diseases both in the field and in post-harvest stage. Among the types
37 of rotting that occurs on onion bulbs, scale rot has been characterized as a widespread
38 disease and may cause losses of up to 50% on the bulbs trade (Wordell Filho and Boff
39 2006). The bacteria associated with scale rot are the *Burkholderia cepacea* complex
40 (Palleroni and Holmes) Yabuuchi et al., *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* (Burkholder)
41 Young et al., *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (Wordell Filho and Boff
42 2006) and *Serratia marcescens* Bizio (Malavolta jr. et al. 1994). Bulb rot of onion
43 caused by several bacterial species and genus are of great economic importance because
44 it causes significant losses in Brazil (Romeiro 2000). However, the epidemic situation
45 of strains causing scale rot in the the Brazilian northeastern semi-arid region is unknown
46 and this difficult the disease control.

47 Depending on the bacteria associated with the disease there may be differences
48 among the symptoms and the nomenclature of the disease. Thus, when the infection is
49 caused by *B. cepacia* the disease is called sour skin or bacterial scale rot and it is

50 associated with the outer layers of the bulbs. When the infection is caused by *B. gladioli*
51 *pv. alliicola* the disease is called slippery skin, as occurs in the inner scales or the center
52 of the bulb, which becomes softened and expels sulfurous odor. When the infection is
53 caused by *P. aeruginosa* the disease is called bacterial internal browning. In this case,
54 the symptoms are remarkably similar to those of slippery skin (McDonald et al. 2004;
55 Wordell Filho and Boff, 2006). On the other hand, *S. marcescens* has been associated
56 with neck rot and maceration of the outer scales of the little bulbs (Malavolta Jr. et al.
57 2008; Wordell Filho and Boff, 2006). Additionally, all bacteria described above have
58 been already detected as the causal agent of onion rot disease in Brazil (Malavolta Jr. et
59 al. 2008).

60 Phylogenetic analysis based on the sequences of 16S rRNA region has been used
61 both for taxonomic classification (Woese 1987) and for identification of several species
62 of bacterial plant pathogens (Hauben et al. 1997; Silva et al. 2012). In turn, the rep-PCR
63 technique has been used successfully on the characterization of various bacteria,
64 including those of the genera *Pseudomonas* (Louws et al. 1994) and *Burkholderia*
65 (Coenye et al. 2002), and can be useful for rapid identification of bacteria associated
66 with onion scale rot. In addition, is essential to know the pathological behavior of the
67 individual associated with the disease to develop control strategies of plant diseases.
68 Thus, the epidemiological component of the disease constitutes a major research
69 instrument (Brown 1998).

70 Given that it is not known for sure which are the genera and species that are
71 associated with the rotting of onion scales in the Brazilian northeastern semiarid region,
72 this study aimed to: i) identify the bacteria involved in the disease in this region through
73 sequencing and phylogenetic analysis of 16S rRNA region, ii) evaluate the genetic

74 relatedness of the species identified by rep-PCR analysis, and iii) evaluate the
75 pathological behavior of different species.

76

77 **Materials and Methods**

78 **Sampling, isolation and bacterial growth, and strain collection.** Onion bulbs were
79 collected either from onion field or from classification and distribution centers.
80 Production farms and classification and distribution centers located in the cities of
81 Pernambuco (Belém de São Francisco, Petrolândia and Orocó) and Bahia states (Sento
82 Sé, Casa Nova, Mucugê, João Dourado, Juazeiro and Irecê) were visited to collect onion
83 bulbs with onion rot disease. When the samples were collected from the fields the
84 geographic coordinates were determined with Global Position System (model Garmin -
85 *etrex 20*).

86 Pathogens were isolated on TBT media (2.0 g/liter glucose; 1.0 g/liter asparagine; 1.0
87 g/liter NaHCO₃; 0.5 g/liter KH₂PO₄; 0.01 g/liter MgSO₄.7H₂O; 0.05 g/liter trypan blue
88 and 0.02 g/liter tetracycline in ddH₂O), and pathogenicity was tested on individual
89 onion scales (cv. IPA 11) according to Jacobs et al. (2008). To isolate the pathogens
90 from onions bulbs, onion samples were primarily disinfected in paper towels moistened
91 with 70% ethanol for 30 seconds and macerated in sterile distilled water (SDW) due to
92 the sensitivity of microorganisms to hypochlorite. The pathogen was reisolated from
93 typical lesions 48 hours after inoculation, thus completing Koch's Postulates. For the
94 purposes of comparisons, the pathotype strain of *B. cepacia* (IBSBF567), *B. gladioli* pv.
95 *alliicola* (IBSBF534) and *B. gladioli* pv. *gladioli* (IBSBF546) were also included in this
96 study. The strains were subsequently preserved in SDW and by lyophilization and are
97 available now at the Phyto bacteria Culture Collection Rosa Mariano (CRM) housed at
98 the Phyto bacteriology Laboratory at the Universidade Federal Rural de Pernambuco

99 (Pernambuco, Brazil). Bacterial strains for all experiments were cultured on TBT media
100 at 28°C for 36 h.

101 **Phylogenetic Analysis**

102 *Extraction and quantification of DNA.* DNA was extracted from the 48 strains in this
103 study using the MiniPrep Kit for bacterial genomic DNA extraction (Axygen
104 Biosciences, Massachusetts, USA) following the manufacturer's recommendations. The
105 genomic DNA was quantified by comparative analysis with High DNA Mass Ladder
106 (Invitrogen, São Paulo, Brazil) using a mixture containing 4 µl of the concentrated
107 DNA, 2 µl of 6X DNA Loading Dye (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canada) and
108 1.5 µl of SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (10X) (Life Technologies, São Paulo, Brazil).
109 The analysis was performed by gel electrophoresis in a 1% agarose gel prepared in 0.5X
110 TBE buffer (5.4 g Tris-base; 2.75 g boric acid and 0.375 g EDTA in a final volume of
111 1000 ml) for 1.5 h at 80 V. The gel was subsequently photodocumented, and after
112 quantification, the samples were diluted to a final concentration of 20 ng/µl DNA and
113 stored at -20°C.

114

115 *Amplifying and 16 S rRNA sequencing.* Forty five strains obtained from this study were
116 sequenced for 16S rRNA gene. Primers used were developed to amplify a fragment of
117 1.500 bp of the 16S rRNA gene (Weisburg et al. 1991). The reactions contained the
118 following components: 1X of PCR Master Mix 2X, 2 µM of each primer and 200 ng of
119 DNA. The sample were amplified in the thermocycler PTC-100 with the following
120 condition: 2 min at 95° C; followed by 30 cycles of 2 min at 95° C for denaturation, 30
121 seconds at 45° C for annealing of the primers, and 4 min at 72° C for extension of the
122 new strand. A 20-minute cycle at 72°C was performed for the final extension. Negative
123 controls (DNA-free reaction) were included in every experiment for check the presence

124 of contaminants. The amplified fragments were visualized by 1% agarose gel and an
125 electrophoretic run performed for 1.0 hour at 80 V in 0.5X TBE buffer using the
126 GenRuler 100 bp DNA Ladder marker. The PCR products were purified and sequenced
127 by Macrogen[®] (Seoul, South Korea). Quality analysis of the nucleotide sequences and
128 contig assembly were performed using the Staden Package (Staden et al. 1998).

129

130 *Phylogenetic analysis.* The 16S rRNA gene sequences of *Burkholderia* and
131 *Pseudomonas* strains obtained in this study and the sequences of 17 species from the *B.*
132 *cepacia* complex, one sequence of *B. gladioli* pv. *gladioli* and one sequence of
133 *Pseudomonas* downloaded from GenBank (Supplementary table) were compiled with
134 the outgroup *Serratia marcescens*. Sequences were aligned with Muscle (Edgar et al.,
135 2004), available in Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) v. 5.20 (Tamura
136 et al. 2011). Alignments were checked and manual adjustments were made when
137 necessary. Genetic distances were estimated using the Kimura 2-parameter matrix,
138 constructed using MEGA v. 5.20 software. Bayesian analyses were done with MrBayes
139 v.3.2.1 (Ronquist et al. 2012) employing a Markov Chain Monte Carlo (MCMC)
140 method. Four MCMC chains were run simultaneously, starting from random trees for
141 10^6 generations. The first 25% trees were discarded as the burn-in phase of each
142 analysis. The analysis was performed using model of nucleotide substitution GTR+I+G,
143 selected by Bayesian Akaike Information Criterion (AIC) using JModelTest 2.1.3
144 (Posada 2008). Trees were visualized with TreeView (Page 1996).

145

146 **rep-PCR Analysis.** Were performed as described by Louws et al. (1994) for all 45
147 strains and three reference strains (Table 1). The REP, ERIC and BOX reactions
148 contained the following: 1X PCR Master Mix 2X (0,05 U/ μ l of Taq DNA polymerase,

149 reaction buffer, 4 mM of MgCl₂, 0,4 mM of each dNTP), 2 μM each primer and 200 ng
150 of DNA. The samples were amplified in a PTC-100 thermocycler (MJ Research,
151 Waltham, USA). Negative controls (DNA-free reactions) were included in all
152 experiments to assess the presence of contaminants. The amplification reactions were
153 stained as previously described, and the amplified fragments were visualized by
154 electrophoresis in a 1.5% agarose gel for 3 h at 80 V in 0.5X TBE buffer with
155 GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canada) and
156 GeneRuler 1 kb DNA Ladder. The gel was subsequently photodocumented. The
157 analyses were performed in duplicate.

158 The amplification profiles generated with the REP, ERIC and BOX primers
159 were analyzed visually based on the presence (1) or absence (0) of bands from 100 to
160 3000 bp; only reproducible bands (present in both replicates) were recorded. The data
161 from each primer were analyzed separately or combined using MVSP 3.1 (Kovach
162 Computing Services, Wales). To determine the genetic relationships among the strains,
163 we used the Jaccard similarity coefficient (Sneath and Sokal 1973) and unweighted pair-
164 group method using arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis.

165

166 **Pathological characterization.** The 45 strains identified by 16S rRNA sequencing
167 (Table 1) were inoculated on the scale of yellow onion bulb(cv. IPA 11). Quartered
168 individual onion scales were wounded on the inner surface with an entomological pin
169 tip (0.3 cm) and 10 μL of bacterial suspension (10⁸ CFU mL⁻¹) was inoculated into the
170 wound (Jacobs et al. 2008). Onion scales inoculated only with SDW comprised the
171 negative control. After the inoculations, the scales were deposited on Petri dishes and
172 underwent a treatment in a moist chamber for 48 h at 30°C. The onion scales were
173 evaluated every hour during the first 6 h after inoculations and then every 6 h until 48 h

174 after inoculations to determine the incubation period (IP), which is the number of hours
175 from inoculation until the onset of the first disease symptom appearance. At forty eight
176 hours after inoculation, disease incidence (DI), which is defined here as the percentage
177 of inoculation points with macerations symptoms, was evaluated. Disease severity was
178 estimated every 6 h during the first 48 h using a rating scale of 0 to 3 where 0 indicated
179 no maceration, 1 indicated 1 to 33% macerated tissue area, 2 indicated 34% to 66%
180 macerated tissue area, and 3 indicated 67% to 100% macerated tissue area (Jacobs et al.
181 2008); and area under the disease progress curve (AUDPC) (Shaner and Finney 1977)
182 was also determined. The experiment was completely randomized with four replicates
183 per strain and each replicate comprised three onion scales with each onion scale
184 containing one inoculation point. The experiment was performed two times.

185 Considering that no significant ($P=0.05$) differences were observed regarding
186 variance between the two experiments, the data were evaluated as replicates in time.
187 The premises of the analysis of variance (ANOVA) were verified by Shapiro-Wilk and
188 Levene tests using the Statistix 9 software (Tallahassee, Florida, USA). Transformations
189 were made to meet the assumptions of the analysis of variance (ANOVA) when
190 necessary. The means were compared by the Scott-Knott test ($P=0.05$) using the SAEG
191 program version 9.0 (Federal University of Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais,
192 Brazil) and by the Least Significant Difference (LSD) test using the Statistix 9 program.
193

194 **Results**

195 **Origin of the strains and isolations.** All the 14 onion fields visited were prevalent with
196 scale rot. Among 45 strains collected, 34 strains were from production fields located in
197 the state of Pernambuco and 11 strains were from Bahia (Table 1). All strains were able
198 to induce scale rot symptoms on onions (cv. 11 IPA) without symptomatic difference.

199 **Phylogenetic analysis.** Fragments of approximately 1500 bp were generated from 16S
200 rRNA gene. The dataset consisted of 1244 characters (including alignment gaps) for 64
201 ingroup and 1 outgroup taxa. In the phylogenetic analysis three clades (I, II and III)
202 were formed with well-supported branches (posterior probability of 100%): the *B.*
203 *cepacia* complex, *B. gladioli* and *P. aeruginosa*. Twenty nine strains were clustered in
204 clade formed by *B. cepacia* complex, 10 strains were clustered in clade formed by the *B.*
205 *gladioli* and six strains were clustered in clade formed by *P. aeruginosa* (Fig. 1). The
206 distance matrix calculated using the Kimura 2-parameter model showed that the strains
207 grouped in *B. cepacia* complex clade exhibited distances ranging from 0.000 to 0.009
208 nucleotide substitutions per site among themselves, whereas distances from 0.000 to
209 0.001 and 0.000 nucleotide substitutions per site were observed between the strains
210 grouped within the clades formed by *B. gladioli* and *P. aeruginosa*, respectively (data
211 not shown).

212

213 **rep-PCR.** The amplification of DNA from 48 strains by rep-PCR generated 22
214 reproducible bands, which ranged from 100 to 3,000 bp. It was observed 12, 5 and 5
215 bands for the REP, ERIC and BOX markers, respectively. The cluster analysis with
216 REP (Supplementary Figure. S1), ERIC (Supplementary Figure. S2) and BOX
217 (Supplementary Figure S3) markers individually showed the formation of 22, 12 and 9
218 groups at a level of 70% similarity, respectively. The formation of 35, 15 and 12
219 haplotypes were observed with REP, ERIC and BOX markers, respectively.

220 The cluster analysis performed on the combined data of REP, ERIC and BOX
221 markers (rep-PCR analysis) (Fig. 2) allowed the formation of 31 groups at a level of
222 70% similarity. No correlation was observed between the strains and place of origin of

223 the collections. It was not possible to differentiate the strains from the *B. cepacia*
224 complex, *B. gladioli* and *P. aeruginosa* by rep-PCR.

225

226 **Pathological characterization.** Groups I, II and III obtained by Bayesian inference
227 analysis were characterized pathogenically. In group I, the cluster analysis performed
228 with strains of *B. cepacia* complex divided the strains in three and two disease
229 pathological groups based on IP and AUDPC ($P=0.05$), respectively. The ranges of IP
230 and AUDPC within Group I were from 5.91 (CRMB199) to 27 h (CRMB83) and from
231 35.62 (CRM83) to 61.25 (CRM103), respectively (Table 2). There was no formation of
232 groups based on severity and DI.

233 The cluster analysis performed with the strains of group II (*B. gladioli*) allowed
234 the formation of two, three, three and two disease groups based on IP, severity, DI and
235 AUDPC ($P=0.05$), respectively. Ranges for each category were 7.00 (CRMB39) to 16 h
236 (CRMB175) in the IP, 1.50 (CRM39) to 2.70 (CRM165) in severity, 50.00 (CRM39) to
237 90.27% (CRM165) in the DI, and 40.25 (CRM47) to 61.25 (CRM165) in AUDPC
238 (Table 3).

239 The ANOVA performed to investigate the pathological relationships between
240 strains of group III (*P. aeruginosa*) showed significant differences in all variables
241 ($P=0.05$). Ranges observed were 7.28 (CRMB51) to 42 h (CRMB9) in the IP, 1.0
242 (CRM115) to 2.04 (CRM70) in severity, 33.33 (CRM115) to 68.05 (CRM70) in the DI
243 and 9.00 (CRM115) to 50.50 (CRM159) in AUDPC (Table 4).

244 The ANOVA performed to investigate the pathological relationships between
245 the different groups (species) showed no significant differences between *B. gladioli* and
246 strains from the *B. cepacia* complex ($P=0.05$), which showed to be more aggressive on
247 onion scales (Table 5). However, these two bacteria differed significantly from *P.*

248 *aeruginosa*, which, in turn, had the lowest severity values, DI and AUDPC and the
249 highest values of PI.

250

251 **Discussion**

252 Scale rot of onion bulbs is a widespread disease in Brazil (Wordell Filho and
253 Boff, 2006), although it has never been officially marked in the semi-arid region of
254 Brazilian northeastern. To prove the occurrence of the disease in the northeastern semi-
255 arid area, 45 bacterial strains obtained from onions with symptoms of onion rot disease
256 were analyzed in this study. The pathogenicity tests showed that all strains were able to
257 cause rotting in onion scales without obvious symptomatic difference.

258 The scale rot of onion bulbs is a complex disease because it involves more than
259 one species of bacteria (Lopes 2016; McDonald et al. 2004; Wordell Filho and Boff,
260 2006). Since the 16S rRNA gene is a ubiquitous molecular marker and considered as a
261 useful tool for identifying unknown bacteria (Srinivasan et al. 2015), DNA sequence
262 information of this region was used for the identification of different bacteria associated
263 with scales rot. The phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene grouped with 100%
264 of posterior probability 29 strains within the clade formed by the *B. cepacia* complex,
265 10 strains in the clade formed by *B. gladioli* and six strains within the clade formed by
266 *P. aeruginosa* (Fig. 1), proving that scale rot of onion bulbs is endemic on the semi-arid
267 region of Brazilian northeastern. In addition, it was demonstrated that strains from the
268 *B. cepacia* complex followed by those of *B. gladioli* were most prevalent in this region.

269 Unlikely from the strains grouped within the clades consisting of *B. gladioli* and
270 *P. aeruginosa*, which showed lower variations of nucleotide substitutions per site
271 (0.000-0.001 and 0.000, respectively), highest nucleotide substitutions per site (0.000-
272 0.009) were observed among the strains within the group of the *B. cepacia* complex.

273 These results suggest that possibly more than one species from the *B. cepacia* complex
274 may be associated with disease in the semi-arid region of northeastern Brazil. *B.*
275 *multivorans* has also been known to be associated to scale rot (Wordell Filho and Boff
276 2006), which strengthens this hypothesis. However, strains of the *B. cepacia* complex are
277 phylogenetically very closely related species that share a high level of 16S rRNA gene
278 sequence similarity (>97.5%) and they cannot be identified at the species level by
279 means of simple comparison of 16S rRNA gene sequences (Vandamme and; Dawyndt
280 2011). Thus, further studies are needed for correct identification these strains

281 rep-PCR usually show good reproducibility, require low cost and is easy to use
282 (Coenye and Lipuma 2007), sohas been successfully utilized to characterize bacterial
283 plant pathogens (Coenye et al. 2002; Louws et al. 1994; Rademaker et al. 2005). We
284 evaluated the discriminatory power of rep-PCR analysis to try separating the three
285 groups (the *B. cepacia* complex, *B. gladioli* and *P. aeruginosa*) identified by
286 phylogenetic identification. However, it was not possible to differentiate the strains
287 using this technique because some strains from the *B. cepacia* complex were grouped in
288 either *B. gladioli* clade or *P. aeruginosa* clade.

289 We were able to observe differences between *P. aeruginosa* strains and the
290 strains from the *B. cepacia* complex and *B. gladioli* in relation to velocity for the onset
291 of the first symptoms and intensity of the disease. This results are in agreement with the
292 fact that *P. aeruginosa* was reported as an opportunistic pathogen that is capable of
293 infecting plants only after adverse conditions (McDonald et al. 2004).

294 The *Burkholderia* species can be found in both natural and agricultural
295 ecosystems and have been recognized for their actions on human, animal and plant
296 (Compant et al. 2008) or for their functions as a biocontrol agent (Parker and Gurian-
297 Sherman 2001). Additionally, both strains from the *B. cepacia* complex and strains of *P.*

298 *aeruginosa* have been reported to cause infections in humans and plants (McDonald et
299 al. 2004).

300 Based on phylogenetic identification performed from this study, we conclude
301 that scale rot of onion bulbs in the semi-arid region of Brazilian northeastern is caused
302 by strains from the *B. cepacia* complex, *B. gladioli* and *P. aeruginosa*. In addition, more
303 than one species from the *B. cepacia* complex may be associated with the disease in the
304 semi-arid region of northeastern Brazil. Nevertheless, further studies are needed to
305 prove this hypothesis.

306

307 **Acknowledgments**

308 We thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)
309 for the scholarships awarded to Willams José de Oliveira, Adriano Márcio Freire Silva
310 and Elineide B. Souza. We thank Alessandra J. G Moraes, Edilaine A. Melo and
311 Walkiria A. Silva (Phylobacteriology Laboratory, Universidade Federal Rural de
312 Pernambuco, Pernambuco, Brazil) for technical support.

313

314 **References**

315 Brown, J. K. M. 1998. Surveys of variation in pathogen population and their
316 applications to disease control. Pages 73-102 In: The epidemiology of plant disease,
317 Jones, G. eds. Kluwer, Dordrecht.

318 Coenye, T., Spilker, T., Martin, A., and LiPuma, J. 2002. Comparative
319 assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia*
320 genomovar III. Journal of Clinical Microbiology. 40:3300-3307.

- 321 Coenye, T., and Lipuma, J. 2007. Epidemiology, typing and population genetics
322 of *Burkholderia* species. Pages 29-52 In: *Burkholderia: Molecular Microbiology and*
323 *Genomics*, Vandamme. P. and Coenye, T. Horizon bioscience, Norfolk.
- 324 Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C., and Barka, E. A. 2008.
325 Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS*
326 *Microbiology Review*. 32:607-626.
- 327 Edgar, R. C. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy
328 and high throughput. *Nucleic Acid Research*. 25:1792-1797.
- 329 Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J. and Moore, E. R. B. 1997. Comparison of
330 16 S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *International journal*
331 *systematic bacteriology*. 57: 328-335.
- 332 IBGE, 2015. Indicadores IBGE, estatísticas da produção agrícola (junho –
333 2015). Brasília.
- 334 Jacobs, J. L., Fasi, A. C., Ramette, A., Smith, J. J., Hammerschmidt, R., and
335 Sudin, G.W. 2008. Identification and onion Pathogenicity of *Burkholderia cepacia*
336 Complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. *Applied and*
337 *environmental microbiology*. 74:3121-3129.
- 338 Lee, Y.A., Chao, C.S., and Jung, C. H. 2013. Combination of a simple
339 differential medium and toxA-specific PCR for isolation and identification of
340 phytopathogenic *Burkholderia gladioli*. *European Journal Plant Pathology*. 136:523-533.
- 341 Lopes, C. A. Podridão das escamas. Retrieved 07 January 2016 from
342 [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cebola/arvore/CONT000gnnmz1al02wx5](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cebola/arvore/CONT000gnnmz1al02wx5ok0cdjvscoy5dw2s.html)
343 [ok0cdjvscoy5dw2s.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cebola/arvore/CONT000gnnmz1al02wx5ok0cdjvscoy5dw2s.html).

- 344 Louws, E. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., and Bruijn, F. J. 1994. Specific
345 genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars
346 and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:
347 2286-2295
- 348 Malavolta Jr., V. A., Beriam, L. O. S., Almeida, I. M. G., Rodrigues Neto, J.,
349 Robbs, C. F. 2008. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização.
350 *Summa Phytopathologica.* 37:9-88.
- 351 McDonald, M. R., Jaime, M. A., and Hovius, M. H. Y. 2004. Management of
352 Diseases of Onions and Garlic. Pages 149-200. In: *Diseases of Fruits and Vegetables*,
353 vol II. Naqvi, S. A.M. H. ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- 354 Page, R.D. 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on
355 personal computers. *Comput. Appl. Biosc.* 12:57-358.
- 356 Parcker, J. L., Gurian-Sherman, D. 2001. Diversity of the *Burkholderia*
357 *cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains.
358 *Annual Reviews Phytopathology.* 39:225-258.
- 359 Posada, D. 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular*
360 *Ecology Notes.* 6:288-295.
- 361 Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L.,
362 Swings, J. and Bruijn, F. J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic
363 framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology.* 95: 1098-1111.
- 364 Romeiro, R. S. 2000. Doenças causadas por bactérias em alho e cebola. Pages
365 43-81 In: Zambolim, L.; Vale F. X. R.; Costa, H, eds. *Controle de Doenças de Plantas*
366 *Hortaliças.* Viçosa: Editora UFV.
- 367 Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S,
368 Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes v. 3.2: efficient

- 369 Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space.
370 *Systematic Biology*. v. 61: p 539–542.
- 371 Shaner, G., Finney, R.E., 1977. The effect of nitrogen fertilization on the
372 expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67, 1051–
373 1056.
- 374 Silva, K., Cassetari, A. S., Lima, A. S., De Brandt, E., Pinnock, E.,
375 Vandamme, P., and Moreira, F. M. S. 2012. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated
376 from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity.
377 *Systematic and Applied Microbiology* 35:253-262.
- 378 Sneath, P. H. A., and Sokal, R. R. Ed. 1973. *Numerical Taxonomy: The*
379 *Principles and Practice of Numerical Classification*. W. H. Freeman and Company, San
380 Francisco.
- 381 Srinivassan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M.,
382 Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E. L. and Lynch, S. V. 2015. Use of 16S rRNA Gene
383 for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *Plos*
384 *One*. 10:1-22.
- 385 Staden, R., Beal, K. F., and Bonfield, J.K. 1998. The Standen Package. Pages
386 115-130. In: *Bioinformatics methods and protocols*. Misener S. and Krawetz, S. A.
387 Hulmana Press, New York.
- 388 Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G. and Nei. 2011. M. MEGA 5:
389 molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary
390 distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolutionary*,
391 28:2731-2739.

- 392 Vandamme, P. and Dawyndt, P. 2011. Classification and identification of the
393 *Butkholderia cepacia* complex: Past, presente and future. Systematic and Applied
394 Microbiology, 34:87-95.
- 395 Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. 1991. 16S
396 Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. Journal of Bacteriology, 173:
397 697- 703.
- 398 Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. Microbiological reviews, 51:221 – 271.
- 399 Wordell Filho, J. A., and Boff, P. 2006. Doenças de origem parasitária. Pages
400 19-126 In: Manejo fitossanitário da cebola. Wordell Filho, J. A., Rowe, E., Gonçalves,
401 P. A. S., Debarba, J. F., Boff, P., and Thomazelli, L.F. EPAGRI, Florianópolis.

Table 1. Description of the strains related to the onion scale rot used in this study

Strain ^w	Species	Host	City/State	Country
CRM6	<i>Burkholderia cepacia</i> complex (CBC)	<i>Allium</i> <i>cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM7	<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM8	CBC	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM16	CBC	<i>A. cepa</i>	Belém S. Francisco-PE	Brazil
CRM17	CBC	<i>A. cepa</i>	Belém S. Francisco-PE	Brazil
CRM29	CBC	<i>A. cepa</i>	Orocó-PE	Brazil
CRM30	CBC	<i>A. cepa</i>	Belém S. Francisco-PE	Brazil
CRM31	CBC	<i>A. cepa</i>	Belém S. Francisco-PE	Brazil
CRM33	CBC	<i>A. cepa</i>	Orocó-PE	Brazil
CRM38	<i>B. gladioli</i>	<i>A. cepa</i>	Orocó-PE	Brazil
CRM39	<i>B. agladioli</i>	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM47	<i>B. gladioli</i>	<i>A. cepa</i>	Belém S. Francisco-PE	Brazil
CRM48	CBC	<i>A. cepa</i>	Belém S. Francisco-PE	Brazil
CRM52	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM55	CBC	<i>A. cepa</i>	Belém S. Francisco-PE	Brazil
CRM67	CBC	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM69	CBC	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM70	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM71	CBC	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM76	CBC	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil

CRM81	CBC	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM83	CBC	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM89	<i>B. gladioli</i>	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM90	CBC	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM91	CBC	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM93	CBC	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM94	CBC	<i>A. cepa</i>	Petrolândia-PE	Brazil
CRM98	CBC	<i>A. cepa</i>	Orocó-PE	Brazil
CRM106	CBC	<i>A. cepa</i>	Orocó-PE	Brazil
CRM109	CBC	<i>A. cepa</i>	Orocó-PE	Brazil
CRM115	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. cepa</i>	Orocó-PE	Brazil
CRM125	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. cepa</i>	Belém S. Francisco-PE	Brazil
CRM132	CBC	<i>A. cepa</i>	Belém S. Francisco-PE	Brazil
CRM159	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. cepa</i>	Juazeiro-BA	Brazil
CRM165	<i>B. gladioli</i>	<i>A. cepa</i>	Casa Nova-BA	Brazil
CRM171	CBC	<i>A. cepa</i>	Casa Nova-BA	Brazil
CRM172	<i>B. gladioli</i>	<i>A. cepa</i>	Casa Nova-BA	Brazil
CRM175	<i>B. gladioli</i>	<i>A. cepa</i>	Mucugê-BA	Brazil
CRM190	CBC	<i>A. cepa</i>	Sento Sé-BA	Brazil
CRM194	<i>B. gladioli</i>	<i>A. cepa</i>	Casa Nova-BA	Brazil
CRM199	CBC	<i>A. cepa</i>	Sento Sé-BA	Brazil
CRM212	<i>B. gladioli</i>	<i>A. cepa</i>	Casa Nova-BA	Brazil
CRM222	CBC	<i>A. cepa</i>	Casa Nova-BA	Brazil
CRM259	CBC	<i>A. cepa</i>	Mucugê-BA	Brazil

IBSBF534 ^x	<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>alliicola</i>	<i>A. cepa</i>	--	USA
IBSBF546 ^y	<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	<i>Gladiolus</i> sp.	--	USA
IBSBF567 ^z	<i>Burkholderia cepacia</i>	-	--	USA

^wCRM: Phylobacteria Culture Collection Rosa Mariano; IBSBF534 = ATCC19302; IBSBF546 = ATCC 10248 and IBSBF567 = ATCC 10856. IBSBF: Phylobacteria Culture Collection of Instituto Biológico, São Paulo, Brazil; ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. All strains are available at the Phylobacteria Culture Collection Rosa Mariano (CRM) housed at the Phylobacteriology Laboratory at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Pernambuco, Brazil).

^xPathovar reference strain of *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*.

^yPathovar reference strain of *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*.

^zStrain of *Pseudomonas aeruginosa*.

Table 2. Pathological characterization of the scale rot caused by the strains of the *Burkholderia cepacia* complex, which were artificially inoculated into yellow onion scales (cv. IPA 11) by the scale injury method

Strain ^v	IP (hours) ^w	AUDPC ^x
CRM6	6,50 c ^y	55,50 a
CRM8	12,58 b	50,12 a
CRM16	9,75 c	59,75 a
CRM17	12,50 b	58,75 a
CRM29	7,16 c	51,00 a
CRM30	14,00 b	58,75 a
CRM31	22,25 a	43,12 b
CRM33	14,00 b	61,00 a
CRM48	8,37c	55,62 a
CRM55	16,75 b	41,12 b
CRM67	13,25 b	58,87 a
CRM69	10,75 b	51,75 a
CRM71	13,25 b	52,12 a
CRM76	11,87 b	58,37 a
CRM81	12,75 b	50,25 a
CRM83	27,00 a	35,62 b
CRM90	12,00 b	60,87 a
CRM91	21,08 a	37,13 b
CRM93	8,00 c	55,50 a
CRM94	14,00 b	46,37 a

CRM98	18,50 a	55,50 a
CRM106	11,66 b	61,25 a
CRM109	7,66 c	41,87 b
CRM132	20,12 a	45,12 a
CRM171	8,41 c	56,25 a
CRM190	12,00 b	52,25 a
CRM199	5,91 c	59,75 a
CRM222	18,25 a	40,75 b
CRM259	16,40 b	51,00 b
<hr/>		
VC ^z (%)	24,38	17,99

^yPhytobacteria Culture Collection Rosa Mariano (CRM) housed at the Phytobacteriology Laboratory at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Pernambuco, Brazil).

^wIP = Incubation period: number of hours from inoculation to appearance of first symptoms.

^xAUDPC: Area under the disease progress curve (Shaner and Finney 1977).

^yAverages followed by the same letter in the column are not significantly different, as measured by Scott-Knott test ($P = 0.05$).

^zVC: variation coefficient.

Table 3. Pathological characterization of the scale rot caused by *Burkholderia gladioli* strains, which were artificially inoculated into yellow onion scale (cv. IPA 11) by the scale injury method

Strains ^t	IP (h) ^u	Severity ^v	DI (%) ^w	AUDPC ^x
CRM7	10,83 b ^y	2,20 b	73,61 b	50,37 b
CRM38	10,83 b	2,20 b	73,61 b	50,37 b
CRM 39	7,00 b	1,50 c	50,00 c	40,25 b
CRM47	15,00 a	1,58 c	55,55 c	40,25 b
CRM89	12,00 b	2,50 a	83,33 a	57,75 a
CRM165	11,00b	2,70 a	90,27 a	61,25 a
CRM172	12,50 b	2,16 b	72,22 b	55,25 a
CRM175	16,00 a	2,00 b	66,67b	40,50 b
CRM194	11,00 b	2,70 a	90,27 a	61,25 a
CRM212	12,00 b	1,75 c	66,66 b	46,50 b
VC ^z (%)	17,00	12,50	12,89	10,95

^tPhytopacteria Culture Collection Rosa Mariano (CRM) housed at the Phytobacteriology Laboratory at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Pernambuco, Brazil).

^uIP = Incubation period: number of hours from inoculation to appearance of first symptoms.

^vSeverity: Evaluated by descriptive scale (Jacobs et al., 2008) 48 h after inoculation

^wID: Index disease.

^xAUDPC: Area under the disease progress curve (Shaner and Finney 1977).

^yAverages followed by the same letter in the column are not significantly different, as measured by Scott-Knott test ($P = 0.05$).

^zVC: variation coefficient.

Table 4. Pathological characterization of the scale rot caused by *Pseudomonas aeruginosa*, which were artificially inoculated into yellow onion scale (cv. IPA 11) by the scaleinjury method

Strain^t	IP (h)^u	Severity^v	DI (%)^w	AUDPC^x
CRM9	42,00 a ^y	1,50 ab	48,61 ab	10,50 b
CRM52	7,28 cd	1,95 a	65,07 ab	33,28 b
CRM70	12,58 cd	2,04 a	68,05 a	50,12 a
CRM115	36,00 a	1,00 a	33,33 b	9,00 b
CRM125	24,58 b	1,45 ab	49,99 ab	24,37 b
CRM159	16,00 bc	2,00 a	66,67 a	50,50 a
VC ^z (%)	23,40	21,34	21,34	32,11

^tPhytopathogen Culture Collection Rosa Mariano (CRM) housed at the Phytopathology Laboratory at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Pernambuco, Brazil).

^uIP = Incubation period: number of hours from inoculation to appearance of first symptoms.

^vSeverity: Evaluated by descriptive scale (Jacobs et al. 2008) 48 hours after inoculation

^wID: Index disease.

^xAUDPC: Area under the disease progress curve (Shaner and Finney 1977).

^yAverages followed by the same letter in the column are not significantly different, as measured by LSD ($P = 0.05$).

^zVC: variation coefficient.

Table 5. Pathological comparison of different bacterial species causing rotting of onion scales in the semi-arid region of Brazilian northeastern, which were artificially inoculated into yellow onion scale (cv. IPA 11) by the scale injury method

Specie	IP (hours)^u	Severity^v	DI (%)^w	AUDPC^x
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19,66 a ^y	1,75 b	58,49 b	34,32 b
<i>Burkholderia gladioli</i>	11,59 b	2,14 a	72,51 a	51,36 a
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	13,18 b	2,23 a	74,79 a	51,97a
VC ^z (%)	2,74	3,17	2,81	8,95

^uIP = Incubation period: number of hours from inoculation to appearance of first symptoms.

^vSeverity: Evaluated by descriptive scale (Jacobs et al. 2008) 48 hours after inoculation.

^wID: Index disease.

^xAUDPC: Area under the disease progress curve (Shaner and Finney 1977).

^yAverages followed by the same letter in the column are not significantly different, as measured by LSD ($P = 0.05$).

^zVC: variation coefficient.

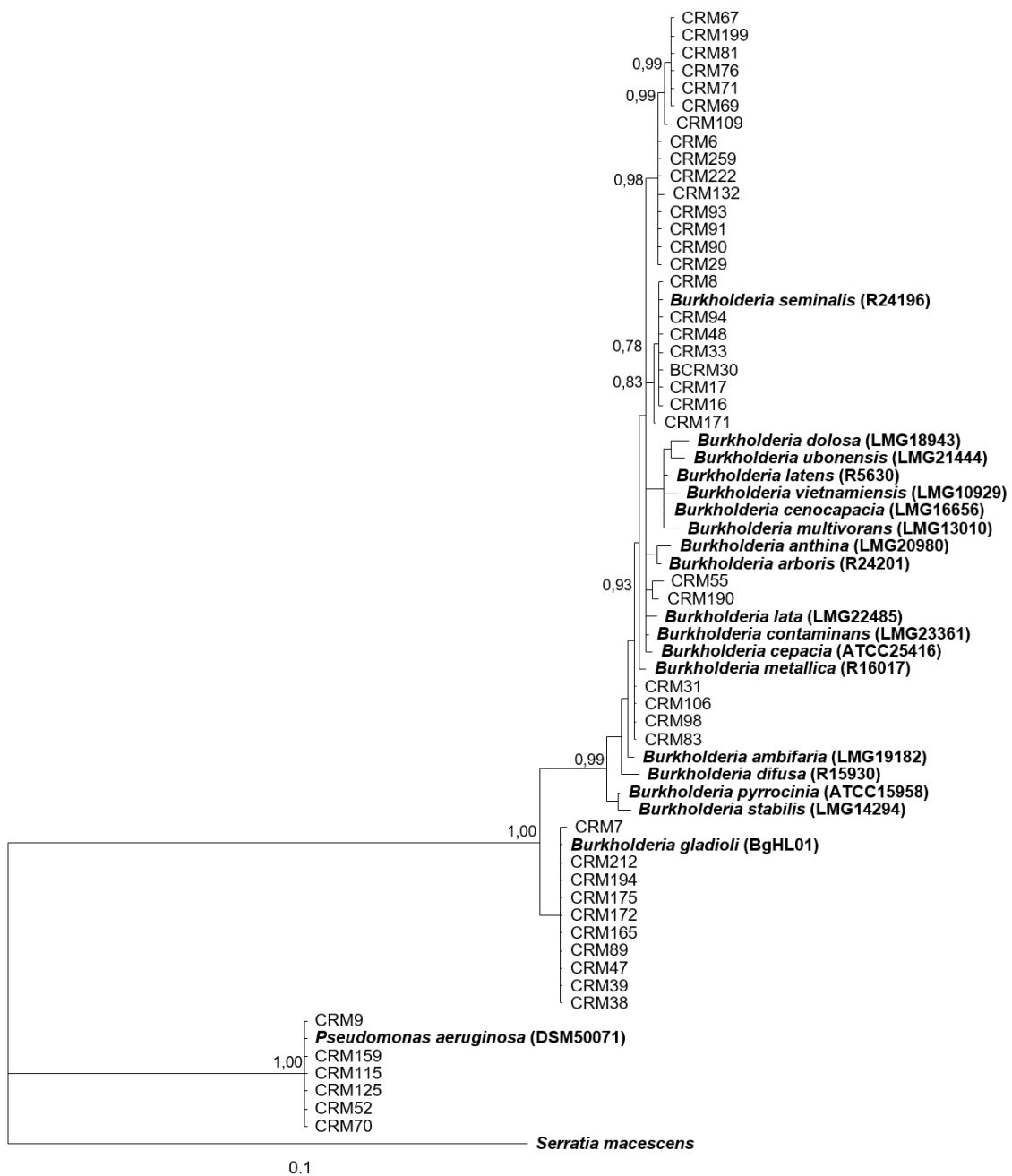


Fig. 1. The Bayesian inference phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences, showing the relationships of the *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia gladioli* and *Pseudomonas aeruginosa* species and representatives. *Serratia marcescens* was used as outgroup. The access numbers in international collection are given in parentheses. Posterior probabilities above 70% are indicated. Scale bar shows the inferred number of changes per site.

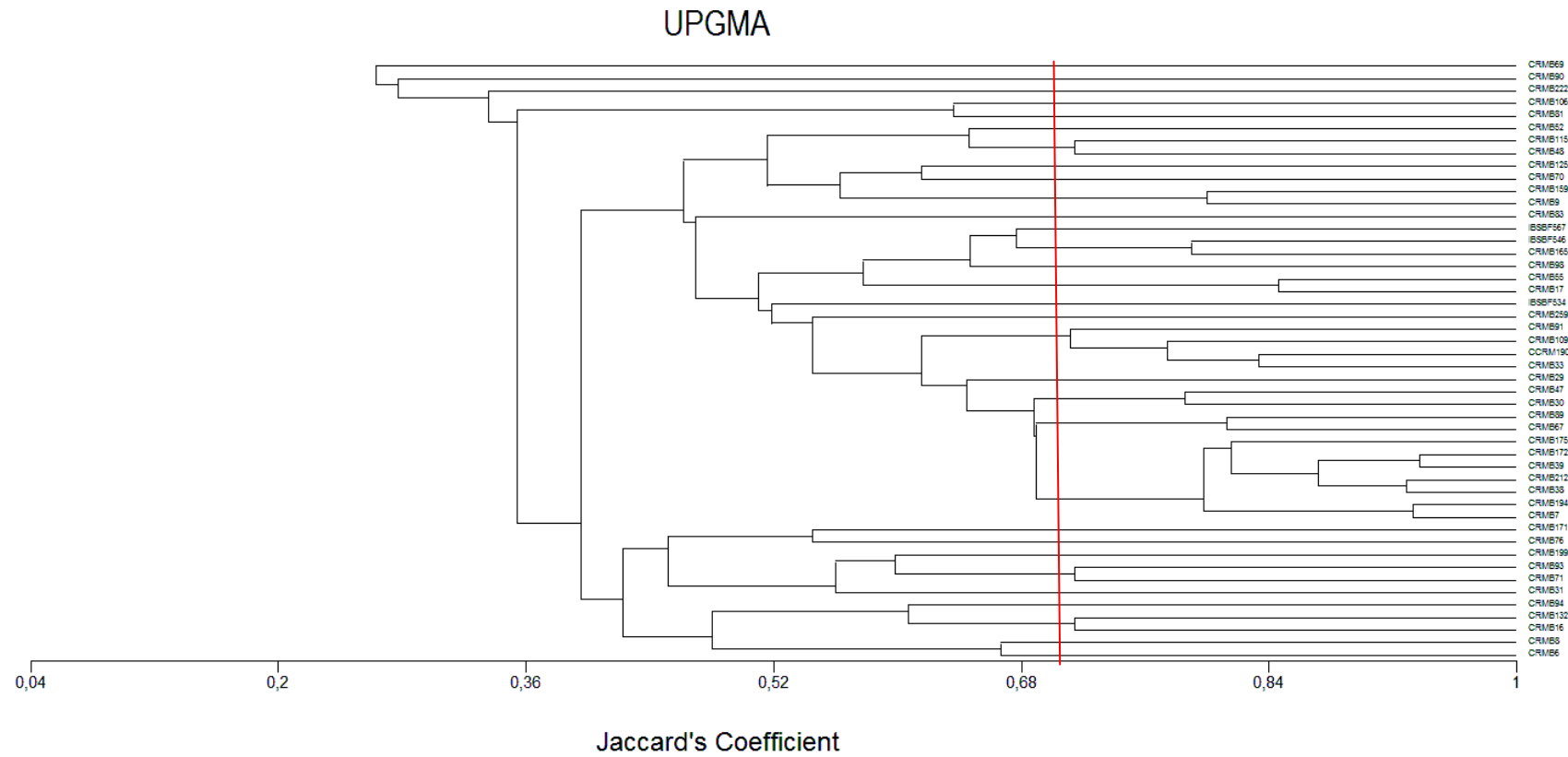
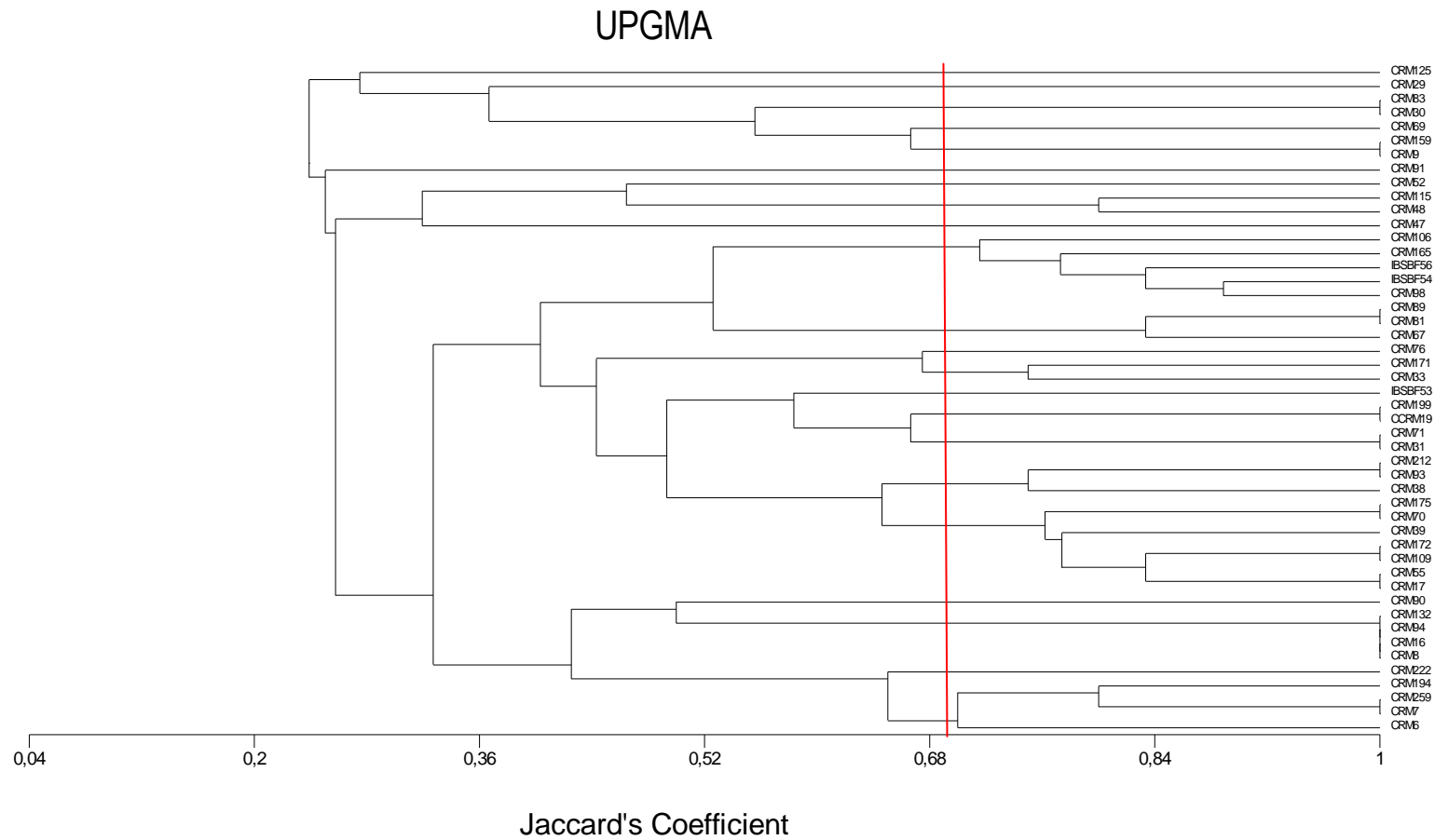
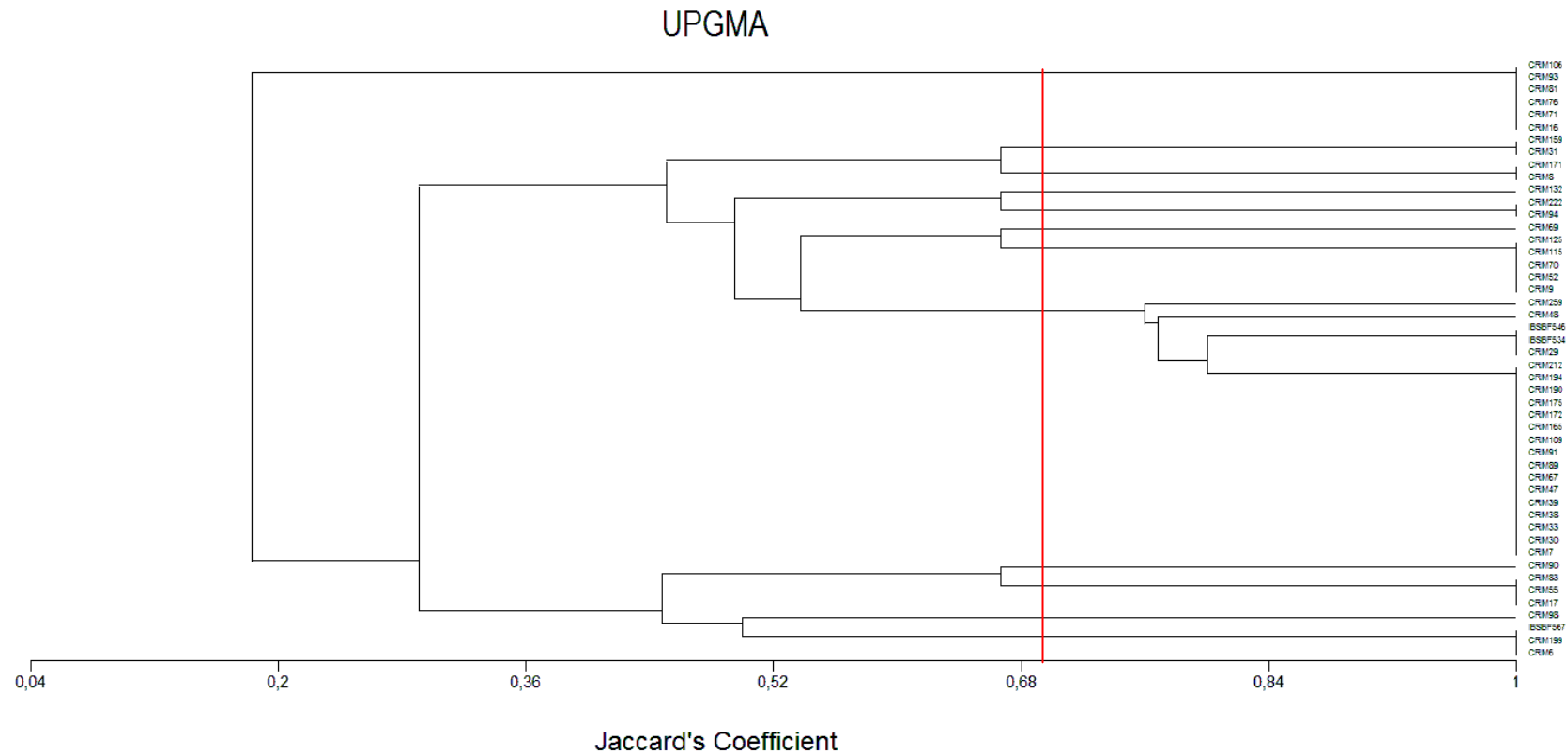


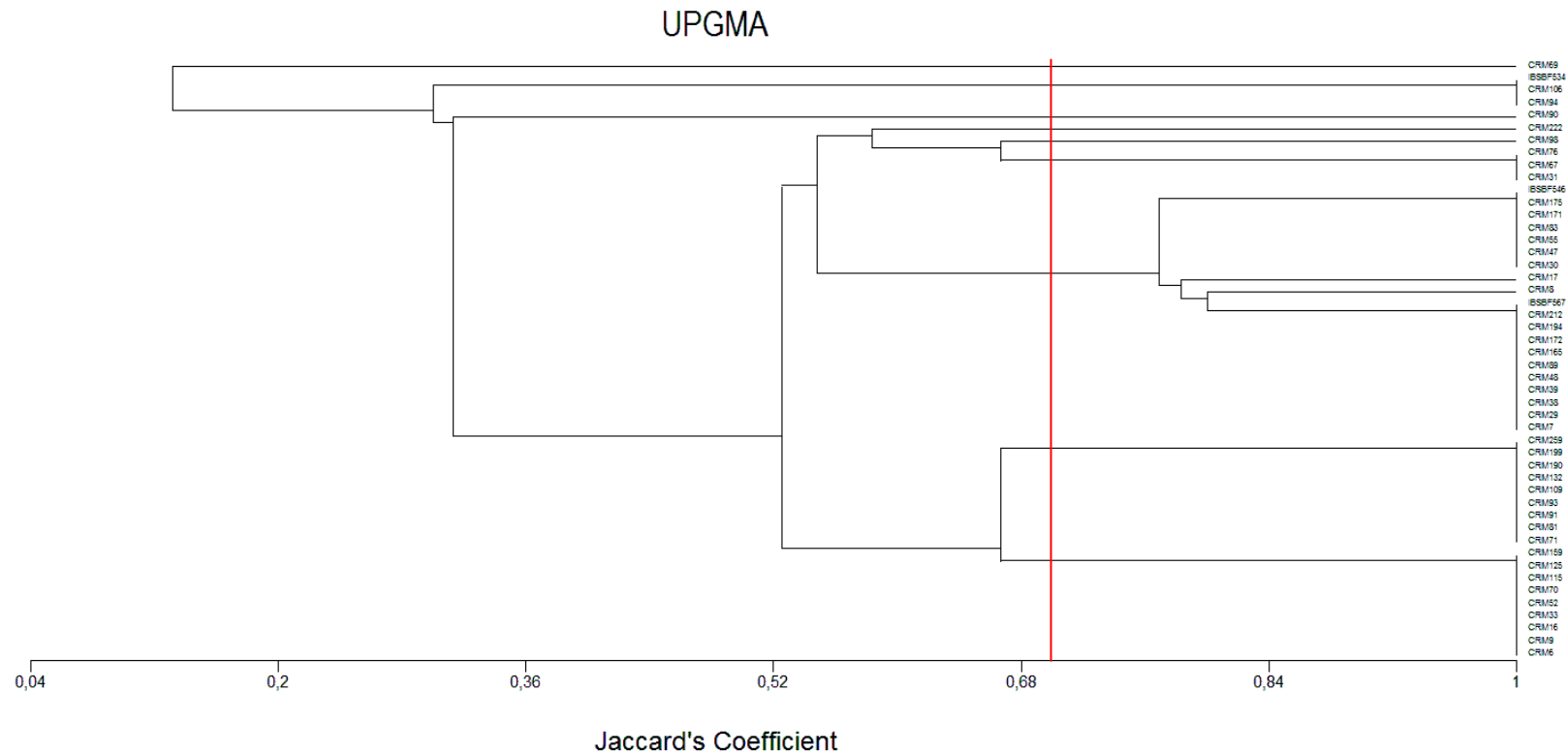
Fig. 2. The dendrogram of DNA fingerprints generated by rep-PCR of *B. cepacia* complex, *Burkholderia gladioli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains from Brazilian semi-arid northeast and the strains, IBSBF546, IBSBF534 and IBSBF567.



Supplementary Fig. S1: The dendrogram of DNA fingerprints generated by REP-PCR of the *B. cepacia* complex, *Burkholderia gladioli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains from Brazilian semi-arid northeast and the strains IBSBF546, IBSBF534 and IBSBF567.



Supplementary Fig. S2 : The dendrogram of DNA fingerprints generated by ERIC-PCR of the *B. cepacia* complex, *Burkholderia gladioli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains from Brazilian semi-arid northeast and the strains IBSBF546, IBSBF534 and IBSBF567.



Supplementary Fig. S3: The dendrogram of DNA fingerprints generated by BOX-PCR of the *B. cepacia* complex, *Burkholderia gladioli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains from Brazilian semi-arid northeast and the strains IBSBF546, IBSBF534 and IBSBF567.

Supplementary Table 1. Sequences of reference strains used for tree construction

Strain	Specie	Id. Sequence ^x	Adicional Information ^y
LMG20980 ^z	<i>Burkholderia anthina</i>	JX986972	Type strain
R24201	<i>Burkholderia arboris</i>	AM747630	Type strain
ATCC25416	<i>Burkholderia cepacia</i>	U96927	Type strain
LMG23361	<i>Burkholderia contaminans</i>	JX986975	Type strain
LMG23361	<i>Burkholderia difusa</i>	AM747629	Type strain
MLG18943	<i>Burkholderia dolosa</i>	JX986970	Type strain
R5630	<i>Burkholderia latens</i>	AM747628	Type strain
R16017	<i>Burkholderia metallica</i>	AM747632	Type strain
LMG13010	<i>Burkholderia multivorans</i>	Y18703	Type strain
GTC-P3-415	<i>Burkholderia ubonensis</i>	AB030584	Type strain
BhHL01	<i>Burkholderia gladioli</i>	JX566503	Lee et al. (2013)
ATCC15958	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	AB021369	Type strain
ATCC53795	<i>Burkholderia ambifaria</i>	CP000440	Type strain
LMG16656	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	AF148556	Type strain
ATCC 17760	<i>Burkholderi alata</i>	CP000150	Type strain
LMG10929	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	AF097534	Type strain
LMG14294	<i>Burkholderi astabilis</i>	AF097533	Type strain
DSM2351	<i>Burkholderi aseminalis</i>	AM747631	Type strain
DSM50071	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HE978271	Type strain
DSM30121	<i>Serratia marcescens</i>	AJ233431	Type strain

^xAccess number of sequence in GenBank.

^yAdditional information relation to strain.

^zDeposited strains in international collection culture.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- Foi constatada prevalência de 100% da podridão de escamas de cebola nas principais áreas produtoras de cebola do semiárido do nordeste brasileiro;
- A podridão de escamas de cebola no semiárido do nordeste brasileiro é causada pelas bactérias do complexo *B. cepacia*, *B. gladioli* e *P. aeruginosa*;
- Não foi possível identificar quais as espécies do complexo *B.cepacia* estão relacionadas à podridão de escamas de cebola por meio do sequenciamento da região 16S rRNA;
- Não foi possível diferenciar os isolados do complexo *B. cepacia*, *B. gladioli* e *P. aeruginosa* por meio da técnica de rep-PCR;
- Isolados do complexo *B. cepacia* e de *B. gladioli* foram mais agressivos a escamas de cebola do que isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.