



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
FITOPATOLOGIA**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Tese de Doutorado

**ESTRUTURA POPULACIONAL E OBTENÇÃO DE
primers ESPECÍFICOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
*Burkholderia cenocepacia***

Willams José de Oliveira

**Recife – PE
2019**

WILLAMS JOSÉ DE OLIVEIRA

**ESTRUTURA POPULACIONAL E OBTENÇÃO DE *primers* ESPECÍFICOS
PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *Burkholderia cenocepacia***

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. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

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

**RECIFE-PE
AGOSTO – 2019**

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

O48e Oliveira, Willams José de.
Estrutura populacional e obtenção de *primers* específicos para a identificação de *Burkholderia cenocepacia* / Willams José de Oliveira. - Recife, Recife, 2019.
85 f.: il.

Orientador(a): Marco Aurélio Siqueira da Gama.
Coorientador(a): Elineide Barbosa de Souza.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Fitopatologia, Recife, BR-PE,
2019.

Inclui referências.

1. Cebola 2. Cebola – Doenças e pragas 3. Complexo de *Burkholderia cenocepacia* I. Gama, Marco Aurélio Siqueira da, orient. II. Souza, Elineide Barbosa de, coorient. III. Título

CDD 574

**ESTRUTURA POPULACIONAL E OBTENÇÃO DE *primers* ESPECÍFICOS
PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *Burkholderia cenocepacia***

WILLAMS JOSÉ DE OLIVEIRA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 13 de agosto de 2019.

ORIENTADOR:

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

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Adriano Márcio Freire Silva (UFAL)

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

Prof. Dr. Jonas Alberto Rios (UFRPE)

Profa. Dra. Flávia Figueira Aburjaile (UFPE)

RECIFE-PE

ABRIL – 2019

*Aos meus pais, **Gilvan Oliveira e Luciene Oliveira***

OFEREÇO

*A minha esposa **Juliana Oliveira**, pelo seu amor, companheirismo, amizade, paciência e compreensão nos momentos em que estive ausente.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, que me iluminam, guiam e protegem nas horas difíceis;

Aos meus pais, pelos ensinamentos, pelo exemplo, por todo esforço incondicional dispensado e por toda a dedicação que sempre tiveram para comigo;

À minha esposa, que sempre esteve comigo, em todas as horas;

Ao meu irmão Wanderson Oliveira, pelos conselhos e exemplo;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde tive a oportunidade de receber toda a minha formação acadêmica;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de um ano de bolsa de Doutorado;

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama, pelos ensinamentos, pela paciência e amizade;

À minha coorientadora Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza, por tudo que fez durante a minha formação;

Ao amigo Adriano Márcio Freire Silva, pelo empenho e amizade;

À Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon e a Profa. Dra. Flávia Figueira Aburjaile, pela colaboração na construção deste trabalho;

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 Dr. Djalma Euzébio Simões Neto pelo apoio e compreensão e a todos os colegas da Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina;

A toda equipe do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC).

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	9
GENERAL ABSTRACT.....	10
CAPÍTULO I.....	11
INTRODUÇÃO GERAL	12
1. Cultura da cebola	12
2. Podridão das escamas da cebola na região Nordeste do Brasil	13
3. <i>Burkholderia cenocepacia</i>	14
4. Estrutura de populações.....	16
5. Análise pangenômica para identificação de <i>Burkholderia cenocepacia</i>	18
6. Desenho de <i>primers</i> para a detecção de <i>Burkholderia cenocepacia</i>	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO II	33
Resumo	34
Abstract.....	35
Introdução.....	36
Material e Métodos.....	38
Origem dos isolados e condições de cultivo.....	38
Extração do DNA genômico.....	39
rep-PCR	39
Variabilidade genética de <i>Burkholderia cenocepacia</i>	39
Estrutura genética de <i>Burkholderia cenocepacia</i>	40
Análises	41
Resultados.....	41
REP-PCR e BOX-PCR.....	41
Variabilidade genética de <i>B. cenocepacia</i>	41
Estrutura populacional de isolados de <i>B. cenocepacia</i>	42
Discussão	43
Agradecimentos	46
Referências	46

CAPÍTULO III.....	60
Resumo	61
Abstract.....	62
Introdução	63
Origem dos isolados	65
Teste de patogenicidade.....	65
Extração e dosagem do DNA genômico.....	66
Obtenção e reanotação de genomas e desenho de primers de <i>B. cenocepacia</i>	66
Especificidade e eficiência dos <i>primers</i> desenhados	67
Resultados.....	68
Teste de patogenicidade.....	68
Obtenção e reanotação de genomas <i>B. cenocepacia</i>	68
Desenho de <i>primers</i> para detecção e identificação de <i>B. cenocepacia</i>	68
Teste de especificidade e eficiência dos <i>primers</i> desenhados	68
Teste de reprodutibilidade	69
Discussão	69
Agradecimentos	71
Referências	71
CONCLUSÕES GERAIS	85

RESUMO GERAL

A produção brasileira de cebola (*Allium cepa*) em 2017 foi de 1,72 milhões de toneladas. No nordeste do Brasil, o agropolo da região do Vale do São Francisco foi responsável pela produção de 99,16% de toda a região Nordeste nesta mesma safra. Porém, algumas perdas podem acontecer durante o cultivo e a fase pós-colheita desta hortaliça, como aquelas ocasionadas pela podridão das escamas, as quais podem chegar a 50%. Portanto, este trabalho teve como objetivos estudar a estrutura de uma população de isolados de *B. cenocepacia* oriundos do Vale do São Francisco e desenhar *primers* específicos para a identificação de *B. cenocepacia* linhagens IIIA e IIIB. Para tal, foram analisados perfis genômicos de 63 isolados com base em dados de REP e BOX-PCR, sendo definidas subpopulações de isolados oriundos de Petrolândia, Belém de São Francisco, Orocó e Casa Nova. O estudo de variabilidade e de estrutura genética da população revelaram variação significativa entre e dentro das subpopulações. O teste de Mantel demonstrou que 26% da variabilidade da população é explicada pela distância espacial, enquanto os índices de diversidade genética refletiram a variabilidade moderada das populações de *B. cenocepacia*. Já ocorrência de fluxo gênico entre as subpopulações, verificada pelo número de migrantes (N_m) e haplótipos compartilhados, demonstrou a ocorrência de fluxo gênico entre todas as subpopulações. Para a identificação das linhagens IIIB e IIIA de *B. cenocepacia* foram desenhados *primers* baseados em sequências obtidas a partir de análises de pangenômica do genoma completo de 17 isolados disponíveis no NCBI. Foram desenhados cinco pares de *primers*, sendo que dois pares foram eficientes na identificação e separação das linhagens. Com a compreensão da estrutura da população de *B. cenocepacia* no Vale do São Francisco e a dinâmica pela qual ela evolui, bem como a correta identificação do patógeno, medidas de controle mais assertivas poderão ser adotadas.

Palavras-chave: Cebola, estrutura de população, complexo *Burkholderia cepacia*.

GENERAL ABSTRACT

Brazilian production of onion (*Allium cepa*) in 2017 was 1.72 million tons. In the northeast of Brazil, the agropolo of the San Francisco Valley was responsible for the production of 99.16% of the Northeast region in this same harvest. Losses caused by scale rot can reach 50%. However, some losses may occur during the cultivation and postharvest phase of this vegetable. This work aimed to study the structure of a population of *B. cenocepacia* isolates from the São Francisco Valley and to design specific primers to identify *B. cenocepacia* strains IIIA and IIIB. For this, genomic profiles of 63 isolates were analyzed based on REP and BOX-PCR data in the subpopulations of Petrolândia, Belém de São Francisco, Orocó e Casa Nova. Population variability and genetic structure study revealed significant variation between and inside of the subpopulations. The mantel test showed that 26% of population variability is explained by spatial distance. The genetic diversity index reflected the moderate variability of *B. cenocepacia* populations. The occurrence of gene flow between subpopulations was verified by the number of migrants (N_m) and shared haplotypes, demonstrated gene flow between all subpopulations. For the identification of *B. cenocepacia* from lineage IIIB and IIIA, were designed primers based on sequences obtained from pangenomic analysis of the complete genome of 17 isolates available from NCBI. Five pairs of primers were obtained, and two pairs were efficient in identifying and separating the lineage. With the understanding of the population structure of *B. cenocepacia* in the São Francisco Valley and the dynamics through which it evolves and the correct identification of the pathogen, control measures will be adopted more accurately.

Keywords: Onion, population structure, *Burkholderia cepacia* complex

CAPÍTULO I



Introdução Geral

ESTRUTURA POPULACIONAL E OBTENÇÃO DE *primers* ESPECÍFICOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *Burkholderia cenocepacia*

INTRODUÇÃO GERAL

1. Cultura da cebola

A cebola (*Allium cepa* L.) caracteriza-se por ser uma espécie botânica que possui diversas variedades ou também chamados grupos hortícolas (ALMEIDA, 2006). Esta hortaliça é botanicamente classificada como pertencente à classe Monocotyledoneae, ordem Asparagales, família Alliaceae (BOITEUX; MELO, 2004).

A espécie *A. cepa* é descrita morfológicamente como uma planta herbácea, cuja parte comercial é um bulbo tunicado. O bulbo é formado pela disposição das bainhas das folhas, que apresentam variação em formato, cor, pungência, tamanho e conservação pós-colheita. As folhas se inserem nas bainhas foliares, que por sua vez projetam-se acima da superfície do solo e formam o pseudocaule, o “pescoço” da planta (KILL; RESENDE; SOUZA, 2007). O caule verdadeiro é formado por um disco comprimido, localizado na base da planta denominado “prato”, local de onde emergem folhas, que são denominadas de catafilos ou escamas, e as raízes. As raízes fasciculadas apresentam predominantemente um crescimento no sentido vertical e se concentram de forma cilíndrica a aproximadamente 60 cm de profundidade por 25 cm de diâmetro no solo (FILGUEIRA, 2008; KILL; RESENDE; SOUZA, 2007).

O processo de domesticação desta planta ocorreu entre 5000 a 6000 anos atrás (ALMEIDA, 2006; BOITEUX; MELO, 2004; MEHTA, 2017). Atualmente, é considerada uma “cultigen”, pois não existem relatos da ocorrência de populações dessa hortaliça fora da esfera da domesticação humana. O centro de origem exato de *A. cepa* ainda permanece obscuro (BOITEUX; MELO, 2004). Contudo, baseado em evidências botânicas, acredita-se que tal centro está localizado em regiões desérticas da Ásia central, compreendendo hoje as regiões do Paquistão e Irã (ALMEIDA, 2006; BOITEUX; MELO, 2004).

A produção mundial de cebola, em 2017, foi de 97,86 milhões de toneladas, sendo os principais produtores mundiais a China, Índia, Estados Unidos, Iran e Egito (FAO, 2019). No Brasil, a produção total de bulbos alcançou em 2017 a marca de 1,72

milhões de toneladas, representando uma alta de 3,8% em relação à safra anterior. O estado de Santa Catarina, responsável por produzir 509.389 toneladas de todo o montante nacional. A região Nordeste produziu 360.699 toneladas, sendo o agropolo da região do Vale do Submédio São Francisco, compreendido por municípios dos estados de Pernambuco e da Bahia, responsável pela produção de 99,16% de toda a região Nordeste (ARAÚJO; CORREIA, 2007; IBGE, 2017).

A seleção da cultivar a ser plantada varia em função da região de cultivo, das exigências do mercado quanto ao tipo de cor do bulbo (roxo ou amarelo), pungência e de plantio (primeiro ou segundo semestre) (RESENDE; COSTA, 2007). O plantio nesta região é realizado durante todo ano, os melhores preços do produto são alcançados quando a realização do plantio ocorre entre os meses de janeiro e março (CANDEIA; SILVA; MENEZES, 2008).

2. Podridão das escamas da cebola na região Nordeste do Brasil

A podridão das escamas da cebola é uma doença bacteriana que pode ocasionar perdas de até 50% da produção (OLIVEIRA, 2016; WORDELL FILHO; BOFF, 2006). A doença pode ser causada por diferentes bactérias, sendo elas: *B. cenocepacia* (OLIVEIRA et al., 2017), *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes) Yabuuchi et al., *B. gladioli* pv. *alliicola* (Burkholder) Young et al. (WORDELL FILHO; BOFF, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula e *Serratia marcescens* Bizio (Marques et al., 1994). 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. Pelo fato de apresentar um perceptível odor avinagrado nos bulbos doentes, o autor chamou a doença de “sour skin” (BURKHOLDER, 1950).

Prospecções realizadas em cultivo de cebola no nordeste do Brasil revelaram que de 45 isolados bacterianos obtidos de bulbos com sintomas de podridão das escamas, 64,4% pertenciam a espécies do complexo *Burkholderia cepacia* (CBC), 22,2% eram da espécie *B. gladioli* pv. *alliicola* e 13,3 % pertenciam a espécie *P. aeruginosa* (OLIVEIRA, 2016). Posteriormente, um estudo polifásico sobre a diversidade de espécies de *Burkholderia* revelou uma predominância de isolados de *B. cenocepacia*, linhagens IIIA e IIIB, nas áreas de produção de cebola do Nordeste do Brasil (BAIA,

2019).

O quadro sintomatológico da podridão das escamas da cebola, ocasionadas pelas bactérias do CBC, a exemplo de *B. cenocepacia*, apresenta-se como uma podridão viscosa, porém firme, de coloração variável do amarelo ao marrom claro, uma ou poucas escamas do bulbo podem se desprender (MOHAN, 1995). As escamas próximas àquelas que estão infectadas podem continuar firmes e, embora a podridão das escamas ocorra de forma individual, todo o bulbo é comprometido (DAVIS et al., 2014; ROBERTS, 2013). A porção externa dos bulbos pode apresentar-se sadia, mas a região do pescoço pode ficar mole quando as folhas entram em colapso, e com o avançar da doença para estágios mais severos, as escamas saudáveis podem se soltar durante o manuseio (MOHAN, 1995). Adicionalmente, bulbos infectados por espécies de *Burkholderia* apresentam normalmente odor avinagrado (WORDELL FILHO; BOOF, 2006).

3. *Burkholderia cenocepacia*

O gênero *Burkholderia* pertence ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Burkholderiales e família Burkholderiaceae (KADO, 2010). Essas bactérias caracterizam-se como células Gram negativas, com a morfologia em formato de bastonetes retos ou curvos, medindo de 0,5 a 1,0 µm de largura e 1,5 a 4,0 µm de comprimento. As espécies desse gênero podem apresentar um ou mais flagelos polares. Apresentam reação positiva para catalase e oxidase, sendo a maioria das espécies estritamente aeróbicas e não produtoras de pigmentos fluorescentes em condições de deficiência de ferro. Algumas espécies deste grupo podem se multiplicar na temperatura de 4° C e até mesmo em temperaturas de 42° C, porém a maioria das espécies são mesófilas e apresentam temperatura ótima entre 30 e 37° C (LIPUMA et al., 2011).

Burkholderia cepacia foi inicialmente alocada no gênero *Pseudomonas* por Walter Burkholder, em 1950. No entanto, no ano de 1980, o epíteto *P. cepacia* foi excluído da “Approved Lists of Bacterial Names”, perdendo a sua validade (SKERMAN et al., 1980), sendo revalidado no ano seguinte (PALLERONI; HOLMES 1981). Posteriormente, o gênero *Burkholderia* foi proposto para alocar as espécies de *Pseudomonas* que compunham o grupo II de homologia, determinado com base em

sequências do 16S rRNA, valores de homologia DNA-DNA, composição de lipídios celulares e ácidos graxos e características fenotípicas (YABUUCHI et al., 1992).

O complexo *B. cepacia* (CBC) é atualmente composto por 22 espécies de *Burkholderia* (MARTINA et al., 2018) que ocupam diferentes nichos ecológicos (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001) e apresentam elevada similaridade quando são comparadas por meio de sequências da região 16S rDNA (98-100%) e *recA* (94-95%), apresentam níveis moderados de hibridação DNA-DNA (30-50%) (COENYE et al., 2001) e valores de identidade média de nucleotídeos (average nucleotide identity - ANI) do genoma que variam de 85,04 a 89,92% (PEETERS et al., 2013; VANLAERE et al., 2009).

Burkholderia cenocepacia é uma espécie pertencente ao CBC, tendo sido descrita a partir da reclassificação realizada com base na hibridização DNA-DNA de isolados representantes da espécie *B. cepacia* genomovar III (VANDAMME et al., 2003). Esta bactéria subdivide-se em quatro diferentes linhagens filogenéticas denominadas IIIA, IIIB, IIIC e IIID, definidas com base no sequenciamento do gene *recA* (VANDAMME et al., 2003). Isolados da linhagem IIIA, além de serem patogênicos a cebola (BAIA, 2019), podem também estar associados como oportunistas em pacientes acometidos por fibrose cística e imunodeprimidos (VANDAMME et al., 2003). Isolados da linhagem IIIB foram detectados causando podridão das escamas em cebola na região semiárida do Nordeste do Brasil (OLIVEIRA et al., 2017) e em pacientes portadores de fibrose cística, além de terem sido encontrados em amostras do ambiente, tais como, amostras de solo rizosférico de plantios de cebola, banana e milho (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000; VANDAMME et al., 2003). Por sua vez, os isolados da linhagem IIIC foram obtidos apenas de amostras de solo (VANDAMME et al., 2003), enquanto os isolados pertencentes a linhagem IIID foram encontrados em amostras clínicas (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000; VANDAMME et al., 2003)

Poucos estudos foram realizados com isolados de *B. cenocepacia* causadores de podridão em bulbos de cebola. Logo, nota-se a importância de conhecer mais adequadamente as populações fitopatogênicas desta espécie. Adicionalmente, é importante relatar que os estudos recentes demonstraram a presença (OLIVEIRA et al., 2017) e a predominância (BAIA, 2019) de isolados de *B. cenocepacia* causadores de podridões em cebola no semiárido brasileiro. Portanto, torna-se evidente a importância da realização de pesquisas avaliando a estrutura populacional de isolados de *B.*

cenocepacia, bem como o desenvolvimento de ferramentas eficientes para a detecção e identificação das linhagens IIIA e IIIB de *B. cenocepacia*.

4. Estrutura de populações

A estrutura genética de uma população pode ser definida como a quantidade e distribuição da variação genética existente dentro e entre populações. Que por sua vez é resultante da interação entre as forças que atuam no processo evolutivo, sendo elas: seleção, mutação, deriva, fluxo gênico e recombinação (MCDONALD; LINDE, 2002). Adicionalmente, com o estudo da estrutura populacional de fitopatógenos podem ser realizadas a quantificação da variação genética entre indivíduos que compõem a mesma população, determinada a distribuição da variação ao longo do tempo, do espaço e das relações genéticas que os indivíduos possuem tanto dentro das linhagens, quanto entre os isolados da população. Pode-se demonstrar também se a fonte de inóculo está a curta ou longas distâncias, qual o movimento e a dinâmica das populações de diferentes genótipos, a eficácia das medidas de controle e, em alguns casos, tem sido possível descrever a origem de um fitopatógeno (HALLIN; DEPLANO; STRUELENS, 2012; MILGROOM, 2015; SCORTICHINI, 2005) e a adequação dos protocolos de detecção do fluxo de fitopatógenos (FERRANTE; SCORTICHINI, 2015).

A estrutura genética de populações é estudada, na maioria das vezes, por meio da abordagem frequentista de Wright (WRIGHT, 1931; WRIGHT, 1949). Nessa abordagem, para determinação das populações, a frequência dos alelos e genótipos em cada uma destas populações é analisada (MANK; AVISE, 2004).

Nesse contexto, a análise da reação em cadeia da polimerase com sequências palindrômicas extragênicas repetidas (rep-PCR) tem sido utilizada com sucesso na geração de perfis genômicos (MELO, 2016; MORAIS, 2018). O método baseia-se na amplificação do DNA e constitui-se como uma técnica extremamente confiável, reprodutível, rápida e altamente discriminatória (VERSALOVIC et al., 1994; LOUWS et al., 1996).

Para determinação da variabilidade pode-se calcular a riqueza genotípica estimada ao menor número de amostras (N), a diversidade genotípica, o índice de equitabilidade genotípica, a diversidade gênica, o índice de diversidade genotípica, os índices de Shannon-Wiener, associação (I_A) e r_{barD} (r_d). Para a estrutura genética de

uma população estimam-se alguns parâmetros, como a diferença genética (F_{ST}), variância molecular (AMOVA) (NYBOM; BARTISH, 2000). Existe um quadro conceitual e matemático que descreve a distribuição da variância genética que ocorre dentro de uma espécie por meio dos coeficientes de endogamia, a saber: coeficiente de *inbreeding* (F_{IS}), Índice de fixação (F_{ST}) e coeficiente de *inbreeding* total (F_{IT}), que é conhecida como estatística F (WRIGHT, 1931). Estas medidas calculam o déficit de heterozigotos em relação às proporções esperadas de Hardy-Weinberg na população-base especificada (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Assim, F é a proporção pela qual a heterozigosidade é reduzida em relação à homozigosidade em uma população de acasalamento aleatório. O índice F_{ST} é uma medida da divergência de frequência de alelos entre as subpopulações que determina a proporção da variância genética total contida em uma subpopulação, em relação a variância genética total da população (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Como método de diferenciação dos valores de F_{ST} utiliza-se a definição de Wright (1978), que determina os intervalos para classificar o nível de diferenciação genética, sendo os valores entre 0,00 e 0,05 indicativos de uma pequena diferenciação genética; entre 0,05 e 0,15, indicativo de uma moderada diferenciação genética; entre 0,15 e 0,25, indicativo de uma alta diferenciação genética e $>0,25$ indicativo de uma elevada diferenciação genética. Adicionalmente, o F_{ST} tem sido utilizado para estimar a estrutura genética, a qual também pode ser estimada por meio da análise de variância molecular (AMOVA). De ambas as formas os resultados encontrados são bastante semelhantes (NYBOM; BARTISH, 2000).

A AMOVA caracteriza-se por ser uma metodologia que analisa a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações, gerando estimativas sobre os componentes da variância, que traduzem a correlação que tem com a diversidade dos genótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica (EXCOFFIER et al., 1992). A AMOVA pode ser aplicada em diversas situações, caracterizando-a como uma ferramenta coerente e flexível para análises moleculares (ZUCCHI et al., 2005).

A diversidade genética total (H_t) é utilizada para descrever como ocorre a distribuição da variabilidade genética que está contida em populações subdivididas (NEI, 1973). Nesse contexto, a equação de Nei (1973) pode ser aplicada a diferentes níveis da classificação hierárquica, tais como, populações dentro de uma região geográfica, subpopulações dentro de populações e indivíduos dentro de subpopulações

(HARTL; CLARK, 2010).

A variável do percentual de polimorfismo (P) traduz de forma quantitativa à proporção que ocorrem os loci polimórficos de uma população ou de uma amostra. Este índice é baseado na razão do número de loci polimórficos pelo número total de loci analisados da população ou amostra, o que permite verificar a quantidade existente de variação genética em uma população e a sua comparação com outras populações (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

O índice de Shannon-Wiener (1949) é utilizado em estudos de ecologia e indica a diversidade de espécies em uma área (LEWONTIN, 1995), sendo adequado para análise de amostras coletadas ao acaso em grandes comunidades (BROWN; WEIR, 1983). O desequilíbrio de ligação é um fenômeno biológico onipresente, sendo compreendido como a associação entre alelos em diferentes loci, que pode ser ocasionado por diferentes processos biológicos. Segundo Agapow e Burt (2001), nestes processos está incluído a diferenciação da população e o isolamento pela distância, reprodução assexuada e seleção natural. O índice de associação (I_A) é uma métrica comum para avaliação de desequilíbrio de ligação de multilocus (MAYNARD SMITH et al., 1993). Este índice é dependente do tamanho da amostra e se baseia na variância de distâncias emparelhadas entre os indivíduos, ou seja, no número de loci em que eles diferem, comparando a variância dessas distâncias com àquelas esperadas se não houver desequilíbrio gamético entre os pares de loci. Uma modificação de I_A que remove a dependência do tamanho da amostra é o r_{barD} (r_d), que caracteriza-se como menos sensível à variação no número de loci e portanto, facilita as comparações entre populações (AGAPOW; BURT, 2001).

5. Análise pangenômica para identificação de *Burkholderia cenocepacia*

O pangenoma é definido como o repertório gênico de um grupo específico em estudo (TETTELIN et al., 2005). Nesse contexto, o pangenoma de cada gênero ou espécie pode ser considerado aberto (infinito) ou fechado (finito), de acordo com a capacidade da espécie em adquirir DNA exógeno (MEDINI et al., 2005) através de diversos mecanismos, como por exemplo a transferência horizontal de genes (BROWN, 2003).

A abordagem pangenômica utiliza sequências genômicas disponíveis para isolados de uma determinada espécie ou gênero de interesse e identifica um conjunto de genes cujos padrões de presença ou ausência proporcionam a melhor discriminação entre os isolados analisados (YANG et al., 2013). A discriminação é ainda mais bem alcançada com a análise do core genoma ou genoma central, o qual compreende todas as sequências nucleotídicas essenciais, compartilhadas por todos os indivíduos do grupo (TETTELIN et al., 2005).

Nos últimos anos, diversas pesquisas têm sido realizadas com o foco no core genoma, demonstrando as funções específicas e o papel dos genes compartilhados entre um mesmo gênero ou espécie (THONMSEN et al., 2017; WU et al., 2018). Nesse contexto, o gênero *Comamonas* Davis e Park, pertencente a ordem Burkholderiales, possui uma grande versatilidade catabólica, está presente em diferentes ambientes, e a análise do core genoma identificou vias responsáveis pelo metabolismo de diferentes fontes de carbono e nutrientes para a obtenção de energia, sendo estas conservadas. Os genes que estão envolvidos no processo de desnitrificação e amonificação também estão presentes de forma abundante no core genoma desses micro-organismos. Adicionalmente, importantes fatores de virulência também foram identificados no genoma central (WU et al., 2018).

O pangenoma também tem sido descrito como importante método para a triagem de candidatos alvos em multiplex-PCR. Neste sentido, um estudo de análise pangenômica foi realizado a fim de desenvolver uma PCR Multiplex TaqMan em tempo real para identificação e detecção específica de *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (TAMBONG et al., 2016). A utilização de metodologias que se baseiam em informações do pangenoma, permite o direcionamento das técnicas moleculares, apresentando vantagens, como economia de tempo e orçamento, além de alta performance na detecção e identificação de espécies do gênero *Burkholderia* (HO et al., 2011).

6. Desenho de *primers* para a detecção de *Burkholderia cenocepacia*

O desenho de *primers* visa a obtenção de um equilíbrio entre dois objetivos: especificidade e eficiência de amplificação. Especificidade é definida como a frequência com que ocorre um evento de anelamento inespecífico (DIEFFENBACH; LOWE;

DVEKSLER, 1993). Para que se possa alcançar o nível de especificidade adequado, é necessário o conhecimento da sequência alvo, bem como da região de interesse a ser amplificada (LOPEZ et al., 2009). *Primers* com média para baixa especificidade tendem a produzir produtos de PCR com *amplicons* extra não relacionados e indesejáveis. A eficiência de amplificação é definida como quão próximo um par de *primers* é capaz de amplificar um produto para o ótimo teórico de um aumento de duas vezes do produto para cada ciclo de PCR (DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1993).

Os *primers* para a PCR devem manter a proporção de G + C em torno de 50% e aproximadamente 20 oligonucleotídeos. Nessas condições, os *primers* geralmente apresentam valores de temperatura de melting TM na faixa de 56 a 62° C, o que fornece uma janela térmica suficiente para um anelamento eficiente. Adicionalmente, o conteúdo de G + C e T_m devem ser bem combinados (DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1993).

Na técnica de PCR, os *primers* utilizados podem ser específicos, aleatórios ou complementares a sequências repetitivas do DNA. Os *primers* específicos são propositalmente projetados para amplificar uma sequência em particular (YOU et. al., 2008). Quando os *primers* são aleatórios ou complementares geram *fingerprintings* do DNA genômico, os quais são analisados por meio de programas computacionais para identificação do patógeno (BRIOSO et al., 2001).

Os *primers* desenhados podem ser utilizados em diversas técnicas dependentes de PCR, tais como, random amplified polymorphic DNA (RAPD) e amplified fragment length polymorphism (AFLP) (MONDAL; SHANMUGAM, 2013). Essas técnicas permitem a discriminação a um baixo nível taxonômico, ou seja, permite a detecção de variações genéticas entre espécies estreitamente relacionadas ou entre indivíduos da mesma espécie (WOLSKA; SZWEDA, 2012).

Podem ser utilizados também alguns protocolos que são modificações na PCR para detecção e identificação de fitobactérias, tais como Multiplex-PCR e Nested-PCR (BERTOLINI et al. 2003a, BERTOLINI et al. 2003b). A Multiplex-PCR consiste na amplificação de mais de um segmento genômico em uma única reação. Por sua vez, a técnica de Nested-PCR é utilizada com o objetivo de melhorar a eficiência e o grau de especificidade da reação, sendo realizada uma amplificação preliminar utilizando-se um par de *primers* universal, seguindo-se uma segunda amplificação utilizando-se um par de *primers* específicos para a realização da PCR (MONDAL; SHANMUGAM, 2013).

Em alguns casos, a sensibilidade de um ensaio de detecção baseado em PCR pode ser melhorada por meio da adição de uma etapa para enriquecimento em meio de cultura antes da amplificação por PCR, o que se denomina como Bio-PCR (SCHAAD et al., 1995). Adicionalmente, a especificidade da técnica de PCR depende da concepção de *primers* que são exclusivos para patógenos alvo (MONDAL; SHANMUGAM, 2013).

O desenho de *primers* utilizados na PCR, pode ser realizado de diversas formas para detecção e identificação específica de fitobactérias. Nesse contexto, alguns autores realizaram a construção de *primers* específicos para a detecção de bactérias fitopatogênicas, como por exemplo, Kang et. al. (2016), baseado nas regiões 16S e 23S rDNA, desenharam *primers* específicos para detecção e identificação de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* e *B. glumae*, e utilizaram a sequência do gene da transposase A para desenhar *primers* para detecção e identificação de *X. oryzae* pv. *oryzae* em sementes de arroz.

Estudos vem sendo realizado no sentido de desenho de *primers* com alta sensibilidade para a detecção de isolados do gênero *Burkholderia* em cebola (ASSELIN; BONASERA; BEER, 2016), bem como para detecção de *B. glumae* e *B. gladioli* em sementes de arroz (LEE et al., 2018).

Diante do exposto, esta tese teve com objetivos: 1. Estudar a estrutura de populações de *B. cenoseptica* do Vale do São Francisco; 2. Desenhar *primers* específicos para a detecção e identificação das linhagens IIIA e IIIB de *B. cenoseptica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSELIN, J. A. E.; BONASSERA, J. M.; BEER, S. V. PCR *primers* for detection of *Pontoea anantis*, *Burkholderia* spp., and *Enterobacter* sp. from onion. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n. 4, p. 836-846. 2016.

AGAPOW, P. M.; BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Notes**, Malden, v.1, p.101-102. 2001.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G.; AITKEN, S. N. **Conservation and the genetics of populations**. 2ªed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2013. 663 p.

ALMEIDA, D. Aliáceas. In: _____. **Manual de culturas hortícolas**. Lisboa: Editorial presença, v. 1, 2006, p. 25 -77.

ARAÚJO, J. L. P.; CORREIA, R. C.: Custos. In: COSTA, N. D.; RESENDE, G. M. **Cutivo da cebola no Nordeste**. 2007, p. 10-14.

BAIA, A. D. B. **Diversidade de espécies de *Burkholderia* causadoras de podridão em bulbos de cebolas no semiárido brasileiro**. 2019, 112 f. Tese (Doutorado em fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife 2019.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 155-165, 2002.

BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; L´OPEZ, M. M.; CAMBRA, M. Multiplex nested RT-PCR in a single closed tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 3, p. 286-292, 2003a.

BERTOLINI, E.; PENYALVER, R.; GARC´IA, A.; OLMOS, A.; Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 261-266, 2003b.

BOITEUX; L. S.; MELO, P. C. T. **Sistema de produção de cebola (*Allium cepa* L.)**. Embrapa, 2004. Disponível em:< <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/> >. Acesso em: 23 mar. 2019.

BRIOSO, P. S. T.; POZZER, L.; MONTANO, H. G.; PIMENTEL, J. P. Uso atual e futuro da Biologia molecular na fitopatologia. Parte I- Aplicações em fitopatógenos e vetores. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p. 79-118, 2001.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of Onion bulbs. **Phytopathology**,

Saint Paul, v. 40, n. 1, p. 115-117, 1950

BROWN, A. H.; WEIR, B. S. **Measuring genetic variability in plant populations**. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding, part A**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1983. v.1, cap.3, p.219-239.

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

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.

CRUZ, C.; FERREIRA, F.; PESSONI, L. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: Editora UFV, v. 1, 2011. 620 p.

DAVIS, G. H. G.; PARK, R. W. A. A Taxonomic study of certain bacteria currently classified as vibrio species. **Journal of general microbiology**, Londres, v. 27, n. 1, p. 101-119, 1962.

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: <<https://www2.ipm.ucanr.edu/agriculture/onion-and-garlic/bacterial-soft-rot/>>. Acesso em 23 mar. 2019.

DIEFFENBACH, C. W.; LOWE, T. M. J.; DVEKSLER, G. S. General Concepts for PCR Primer Design. 1993

ELLIS, C. N.; COOPER, V. S. Experimental Adaptation of *Burkholderia cenocepacia* to Onion Medium Reduces Host Range. **Applied and Environmental Microbiology**,

Washington, n. 8, v. 76, p. 2387 – 2396, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Bethesda, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FERRANTE, P.; SCORTICHINI, M. Redefining the global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* based on pathogenic, molecular and phenotypic characteristics. **Plant Pathology**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 51-62, 2015.

FILGUEIRA, F. A. R. Aliáceas: Cebola e outros condimentos. In: _____. **Novo Manual de Olericultura**. Viçosa, 2008, p. 255 – 278.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistics division**. 2013. Disponível em: <
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 23 mar. 2019

HALLIN, M.; DEPLANO, A.; STRUELENS, M. J. **Molecular typing of bacterial pathogens**: a tool for the epidemiological studies and control of infectious diseases. In MORAND, S.; BEAUDEAU, F.; CABARET, J. **New frontiers of molecular epidemiology of infectious diseases**. Netherlands: Springer Science & Business media. 2012. p. 9-25.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de População**. 4^o ed. Sunderland: Sinauer associates Sunderland. 2010. 659 p.

HO, C. C.; WU, A. K. L.; TSE, C. W. S.; YUEN, K. Y.; LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y. Automated Pangenomic Analysis in Target Selection for PCR Detection and Identification of Bacteria by Use of ssGeneFinder Webserver and Its Application to *Salmonella enterica* Serovar Typhi. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 3, p. 814 – 821, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017. Indicadores IBGE, estatísticas da produção agrícola (dezembro – 2017). Brasília, BR.

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

KANG, I. J.; KANG, M. H.; NOH, T. H.; SHIM, H. K.; SHIN, D. B.; HEU, S. Simultaneous Detection of Three Bacterial Seed-Borne Diseases in Rice Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. **The Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 32, n. 6, p. 575-579, 2016.

KILL, L. H. P.; RESENDE, G.M.; SOUZA, R.J. **Cultivo da cebola no Nordeste: Botânica**. EMBRAPA, 2007. Disponível em: < http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spcebola/botanica.htm >. Acesso em: 23 mar. 2019

LEE, C.; LEE H. H.; MANNAA, M.; KIM, N.; PARK, J.; KIM, J.; SEO, Y. S. Genomics-based Sensitive and Specific Novel *Primers* for Simultaneous Detection of *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* in Rice Seeds. **The Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 34, n. 6, p. 490-498, 2018.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary biology**. Chicago: Springer, 1995. p. 381-398.

LIPUMMA, J. J.; CURRIE, B. J.; PEACOCK, S. J.; VANDAMME, P. A. R. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, and *Acidovorax*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (Eds.) **Manual of Clinical Microbiology**, Washington: ASM Press, 2011. v. 10, cap. 41, p. 692 – 713.

LIPUMA, J. J.; CURRIE, B. J.; PEACOCK, S. J.; VANDAMME, P. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*,

Delftia and *Acidovorax*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (Eds.) **Manual of Clinical Microbiology**. ASM Press: Washington DC, p. 692-713, 2011.

LOUWS, F. J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J. Assessing genetic diversity of microbes using repetitive sequence-based PCR (rep-PCR). **Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Environmental Samples**, Lancaster, p. 63-94, 1996.

MANK, J. E.; AVISE, J. C. Individual organisms as units of analysis: Bayesianclustering alternatives in population genetics. **Genetical Research**, London, v. 84, n. 3, p. 135-143, 2004.

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.

MARTINA P.; LEGUIZAMON M.; PRIETO C. I.; SOUSA S. A.; MONTANARO, P.; DRAGHI, W. O.; STÄMMLER, M.; Bettiol M, DE 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 Microbiolog**, Reading, v. 68, n. 1, p. 14-20, 2018.

MAYNARD SMITH J.; SMITH N. H.; O’ROURKE M.; SPRATT B.G. (1993). How clonal are bacteria?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90 n. 10, p. 4384-4388.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo alto, v. 40, n. 1, p.

349-379, 2002.

MONDAL, K. K.; SHANMUGAM, V. Advancements in the diagnosis of bacterial plant pathogens: An overview. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2013.

MEDINI, D.; DONATI, C.; TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; RAPPUOLI, R. The microbial pan-genome. **Current Opinion in Genetics & Development**, Londres, v. 15, n. 6, p. 589–594, 2005.

MEHTA, I. Origin and History of Onions. **IOSR Journal Of Humanities And Social Science**, v. 22, n. 9, p. 07-10, 2017.

MELO, E. A. **Estrutura de população e caracterização filogenética de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco**. 2016, 82 f. Tese (Doutorado em fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife 2016.

MILGROOM, M. G. **Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology and Evolution**. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, 2015. 399 p.

MOHAN, S. K. Leaf Streak and Bulb Rot. In: SCHWARTZ, H. F.; MOHAN, S. K. **Compendium of onion and garlic diseases**. St. Paul, 1995, p. 31.

MORAIS, R. F. **Estrutura genética de *Ralstonia pseudosolanacearum* no estado de Pernambuco**. 2018, 60 f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife 2018.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NYBOM, H.; BARTISH, I. V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in plant ecology, evolution and systematics**, Jena, v. 3, n. 2, p. 93-114, 2000.

OLIVEIRA, W. J.; SILVA, A. M. S.; 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**, St. Paul, v. 101, n. 11, p. 1950, 2017.

OLIVEIRA, W. J. **Etiologia da podridão de escama da cebola no semiárido brasileiro**. 2016, 59 f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife 2016.

PALLERONI, N. J.; HOLMES, B. *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev. **International journal of systematic bacteriology**, Reading, v. 31, n. 4, 479-481, 1981.

PARKE, 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, n. 1, p. 225-258, 2001.

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.

RADEMAKER, J.L.W.; HOSTE, B.; LOUWS, F.J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J., VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; DE BRUIJIN, F.J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.50. p. 665-677. 2000.

RESENDE, G. M.; COSTA, N. D. **Cultivo de cebola do nordeste: socioeconomia**. EMBRAPA, 2007. Disponível em:
<http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spcebola/socioeconomia.htm>.

Acesso em: 23 mar. 2019.

ROBERTS, S. **Bacterial storage rots in onion caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliiicola***. Warwick: Plant Health Solution, 2013. Disponível em: <http://www.planthealth.co.uk/downloads/Bga_Onions_Poster_2013_A4.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2019.

SCHAAD, N. W.; CHEONG, S. S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N. J. A Combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 243-248, 1995.

SCORTICHINI, M. The population structure of some plant pathogenic bacteria: an ecological and adaptive perspective. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 87, n. 1, p. 5-12, 2005.

SPRINGMAN, A. C.; JACOBS, J. L.; SOMVANSI, V. S.; SUNDIN, G. W.; MULKS, M. H.; WHITTAM, T. S.; VISWANATHAN, P.; GRAY, R. L.; LIPUMA, J. J.; CICHE, T. A. Genetic diversity and multihost pathogenicity of clinical and environmental strains of *Burkholderia cenocepacia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 16, v. 75, p. 5250 – 5260, 2009.

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.

TAMBONG, J. T.; XU, R.; DAAYF, F.; BRIERE, S.; BILODEAU, G. J.; TROPIANO, R.; HARTKE, A.; REID, L. M.; COTT, M.; COTE, T.; AGARKOVA, I. Genome Analysis and development of a multiplex TaqMan Real-Time PCR for specific identification and detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*. **Bacteriology**, Saint Paul, v. 106, n. 2, p. 1473 – 1485, 2016.

TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; CIESLEWICZ, M. J.; DONATI C.; MEDINI, D.;

WARD, N. L.; ANGIUOLI, S. V.; CRABTREE, J.; JONES, A. L.; DURKIN, A. S.; DEBOY, R. T.; DAVIDSEN, T. M.; NORA, M.; SCARSELLI, M.; ROS, I. M.; PETERSON, J. D.; HAUSER, C. R.; SUNDARAM, J. P.; NELSON, W. C.; MADUPU, R.; BRINKAC, L. M.; DODSON, R. J.; ROSOVITZ, M. J.; SULLIVAN, S. A.; DAUGHERTY, S. C.; HAFT, D. H.; SELENGUT, J.; GWINN, M. L.; ZHOOU, L.; ZAFAR, N.; KHOURI, H.; RADUNE, D.; DIMITROV, G.; WATKINS, K.; O'CONNOR, K. J. B.; SMITH, S.; UTTERBACK, T. R.; OWEN, W.; RUBENS, C. E.; GRANDI, G.; MADOFF, L. C.; KASPER, D. L.; TELFORD, J. L.; WESSELS, M. R.; RAPPUOLLI, R.; FRASER, C. M. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 39, p. 13950–13955, 2005.

THOMSEN, M. C. F.; HASMAN, H.; WESTH, H.; KAYA, H.; LUND, O. RUCS: Rapid identification of PCR primers for unique core sequences. **Bioinformatics**, v. 33, n. 24, p. 3917–3921, 2017.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; LIPUMA, 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.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; COENYE, T.; GORIS, J.; MAHENTHIRALIGAM, E.; LIPUMA, J. J.; OVAN, J. R. W. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.—a new twist to an old story. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, n. 2, p. 91-96, 2003.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUJIN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and cellular biology**, London, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.

WOLSKA, K.; SZWEDA, P. Genotyping techniques for determining the diversity of microorganisms. In: CALISKAN, M. (Ed.). **Genetic diversity in microorganisms**. Croatia: In Tech, 2012. p. 53-94

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.

WRIGHT, S. Statistical methods in biology. **Journal of the American Statistical Association**, v. 26, n. 173, p. 155-163, 1931.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**. Chicago: University of Chicago, 1978. 511p.

WU, Y.; ZAIDEN, N.; CAO, B. The core- and pan-genomic analyses of the genus *Comamonas*: from environmental adaptation to potential virulence. **Frontiers in microbiology**, New York, v. 9, n. 1, p. 1 – 12, 2018.

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.

YANG, J. Y.; BROOKS, S.; MEYER, J. A.; BLAKESLEY, R. R.; ZELAZNY, A. M.; SEGRE, J. A.; SNITKIN, E. S. Pan-PCR, a Computational Method for Designing Bacterium-Typing Assays Based on Whole-Genome Sequence Data. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 51, n. 3, p. 752–758, 2013.

YOU, F. M.; HUO, N.; GU, Y. Q.; LUO, M. C.; MA, Y.; HANE, D.; LAZO, G. R.; DVORAK, J.; ANDERSON, O. D. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. **BMC Bioinformatics**, v. 29, n. 9, p. 253, 2008.

ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; COUTO, M. A.; MORAIS, L. K. D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 10, p. 975-980, 2005.

CAPÍTULO II

VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
Burkholderia cenocepacia **DO VALE DO SÃO FRANCISCO**

1 **VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE**
2 ***Burkholderia cenocepacia* DO VALE DO SÃO FRANCISCO**

3
4
5 Willams José de Oliveira¹, Adriano Marcio Freire Silva², Ana Dulce Botelho Baia¹,
6 Elineide Barbosa de Souza, Marco Aurélio Siqueira da Gama¹

7
8
9 ¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900,
10 Recife – PE

11 ²Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, 55100-000, Rio Largo -
12 AL

13 E-mail: marco.gama@ufrpe.br

14
15 **Resumo**

16 A cebola (*Allium cepa* L.) é uma importante hortaliça para a agricultura mundial,
17 podendo ser acometida pela podridão das escamas, a qual é causada, na região do Vale
18 do São Francisco, principalmente por *Burkholderia cenocepacia*. Ainda não foram
19 realizados estudos para analisar a variabilidade e estrutura genética desta bactéria nesta
20 região. Sendo assim, este estudo teve como objetivo determinar a estrutura populacional
21 dos isolados de *B. cenocepacia* das linhagens IIIA e IIIB, oriundos de áreas de plantio
22 de cebola do Vale do São Francisco (Petrolândia, Belém de São Francisco, Orocó e
23 Casa Nova). Foram calculados os índices de diversidade e o desequilíbrio de ligação. A
24 estrutura genética da população foi determinada pelo índice F_{ST} e a pela AMOVA, que
25 revelou uma significativa variabilidade entre dentro das subpopulações. O teste de
26 Mantel foi utilizado para calcular a relação entre distância genética e geográfica,
27 demonstrando que 26% da variabilidade da população é explicada pela distância
28 espacial. Os índices de diversidade genética refletiram a variabilidade moderada nos
29 diferentes municípios produtores de cebola do Vale do São Francisco. Não foi
30 observado equilíbrio de ligação entre as subpopulações estudadas, indicando que o
31 processo de recombinação nas subpopulações estudadas ocorre em baixa frequência. A
32 ocorrência de fluxo gênico entre as subpopulações avaliadas foi verificada pelo número
33 de migrantes (N_m) e haplótipos compartilhados, sendo consideravelmente menores

34 entre a subpopulação de Casa Nova e as demais subpopulações. A população total
35 apresentou uma variação significativa entre subpopulações (25,28%), ocorreu alta
36 diferenciação genética entre a subpopulação de Casa Nova das demais. A subpopulação
37 de Petrolândia foi altamente diferente da subpopulação de Orocó e moderadamente
38 diferente da subpopulação de Belém de São Francisco. A subpopulação de Orocó e
39 Belém de São Francisco apresentaram diferença genética baixa. Com a compreensão da
40 estrutura da população de *B. cenocepacia* no Vale do São Francisco e dinâmica pela
41 qual ela evolui, as medidas de controle podem ser adotadas de forma mais assertiva,
42 pois o conhecimento da população presente pode direcionar o desenvolvimento de
43 medidas legislativas, como a criação de barreiras para regular o transito de materiais
44 entre áreas, as quais podem ser montadas de forma estratégica. Além disso, o
45 conhecimento da diversidade do patógeno também será útil para apoiar o
46 desenvolvimento de possíveis variedades resistentes.

47

48 **Palavras-chave:** *Burkholderia cenocepacia*; ceboliculura; podridão das escamas

49

50 **Abstract**

51

52 The onion (*Allium cepa* L.) is an important vegetable for world agriculture. This
53 vegetable can be affected by scales rot, caused in the region of the San Francisco Valley
54 mainly by *Burkholderia cenocepacia*. No studies have yet been performed to analyze
55 the variability and genetic structure of this bacterium in the region. Thus, this study
56 aimed to determine the population structure of isolates of *B. cenocepacia* strains IIIA
57 and IIIB, coming from onion planting areas of the São Francisco Valley (Petrolândia,
58 Belém de São Francisco, Orocó and Casa Nova). To study variability, diversity index
59 and linkage disequilibrium were calculated. The genetic structure of the population was
60 determined by the FST index and the AMOVA index, which revealed a significant
61 variation between subpopulations and within subpopulations. The Mantel test was used
62 to calculate the relationship between genetic and geographical distance of *B.*
63 *cenocepacia* subpopulations, showing that 26% of population variability is explained by
64 spatial distance. The genetic diversity indices reflected the moderate variability of *B.*
65 *cenocepacia* populations in the different onion producing municipalities of the São

66 Francisco Valley. No binding equilibrium was observed between the studied
67 subpopulations, indicating that the recombination process in the studied subpopulations
68 occurs at low frequency. The occurrence of gene flow between the evaluated
69 subpopulations was verified by the number of migrants (N_m) and haplotypes.
70 considerably smaller between the Casa Nova subpopulation and the other
71 subpopulations. The population presents a significant variation between subpopulations
72 (25.28%), there was a high genetic differentiation between the subpopulation of Casa
73 Nova and the others. The Petrolândia subpopulation was highly different from the
74 Orocó subpopulation and moderately different from the Belém de São Francisco
75 subpopulation. The subpopulation of Orocó and Belém de São Francisco showed a low
76 genetic difference. With an understanding of the population structure of *B. cenocepacia*
77 in the São Francisco Valley and the dynamics through which it evolves, control
78 measures can be adopted more assertively, since knowledge of the present population it
79 can be the basis for the development of legislative, as the creation of barriers to regulate
80 the transit of materials between these areas, which can be strategically set up. In
81 addition, knowledge of pathogen diversity will also be useful to support the
82 development of possible resistant varieties.

83

84 **Keywords:** *Burkholderia cenocepacia*; onion growth; sour skin

85

86 **Introdução**

87

88 A cebola (*Allium cepa* L.) apresenta-se como uma hortaliça de grande
89 importância, alcançando uma produção mundial, em 2017, de cerca de 97,86 milhões de
90 toneladas de bulbos (FAO, 2019). Por sua vez, no Brasil, foram produzidas 1,2 milhões
91 toneladas no ano de 2017, sendo a região Nordeste responsável por uma produção de
92 aproximadamente 360 mil toneladas de bulbos (IBGE, 2017). Porém, alguns problemas
93 fitossanitários de grande importância podem trazer danos para a cultura, como a
94 podridão das escamas da cebola, causada por espécies de *Burkholderia*, destacando-se
95 *B. cenocepacia* como a mais prevalente no Nordeste brasileiro (Baia, 2019).

96 A presença de *B. cenocepacia* na região Nordeste foi observada recentemente
97 (Oliveira et al. 2017), e estudos sobre a diversidade de espécies de *Burkholderia* nas
98 áreas produtoras de cebola do semiárido nordestino vem sendo realizados nos últimos

99 anos. Nesse contexto, Baia (2019) caracterizou a diversidade de diferentes grupos de
100 isolados, e verificou que a espécie associada a podridão das escamas que apresenta a
101 maior prevalência é *B. cenocepacia*.

102 Diante de estudos baseados em hibridização DNA-DNA, os isolados de *B.*
103 *cepacia* genomovar III, foram reclassificados e descritos como *B. cenocepacia*
104 (VANDAMME et al., 2003), a qual pertence ao complexo *Burkholderia cepacia* (CBC),
105 que por sua vez caracteriza-se por possuir uma grande versatilidade, ocupando
106 diferentes nichos ecológicos (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001), e sendo composto
107 por 22 espécies (MARTINA et al., 2018). Atualmente esta espécie subdivide-se em
108 quatro diferentes linhagens filogenéticas, denominadas IIIA, IIIB, IIIC e IIID,
109 determinadas com base no sequenciamento do gene *recA* (VANDAMME et al., 2003).
110 Isolados da linhagem IIIA, além de serem patogênicos a cebola (BAIA, 2019), podem
111 também estar associados como oportunistas em pacientes acometidos por fibrose cística
112 (VANDAMME et al., 2003). Os isolados da linhagem IIIB foram detectados causando
113 podridão das escamas em cebola na região semiárida do Nordeste do Brasil (OLIVEIRA
114 et al., 2017). Por sua vez, isolados pertencentes a linhagem IIIC foram até então
115 isolados apenas de amostras de solo (VANDAMME et al., 2003), enquanto os isolados
116 bacterianos pertencentes a linhagem IIID foram encontrados em amostras clínicas
117 (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000; VANDAMME et al., 2003).

118 A variabilidade genética caracteriza-se como o resultado da quantidade de lócus
119 e alelos envolvidos na expressão de um determinado caráter numa população da mesma
120 espécie (SOUZA, 2002). Nesse contexto, as fitobactérias possuem eficientes
121 mecanismos de geração de variabilidade (ROMEIRO, 2005), destacando-se as pequenas
122 mudanças pontuais nas sequências de nucleotídeos do genoma, recombinação, e
123 rearranjo intragenômico de regiões do genoma (ARBER, 2000; BEDENDO;
124 BELASQUE, 2018). Mudanças pontuais no genoma são denominadas de mutação,
125 envolvem a substituição, inserção ou deleção de nucleotídeos na sequência de DNA,
126 enquanto a recombinação em fitobactérias consiste nos processos de conjugação,
127 transformação e transdução. Por sua vez, o rearranjo intragenômico está associado
128 a sequências de inserção e elementos genéticos móveis (BEDENDO; BELASQUE,
129 2018).

130 A estrutura genética da população de um patógeno refere-se à quantidade e
131 distribuição da variação genética entre populações e dentro da população

132 (MCDONALD; LINDE, 2002). Por sua vez, a variação existente é consequência da
133 história evolutiva dessa população, a história evolutiva é resultante da atuação de forças
134 combinadas de seleção, mutação, deriva, fluxo gênico e recombinação (MCDONALD;
135 LINDE, 2002).

136 O conhecimento da estrutura de uma população de patógenos é um passo
137 importante para que seja possível realizar inferências sobre a diversidade genética e
138 origem de uma epidemia, determinações de linhagens clonais, avaliações do
139 surgimento ou ressurgimento de novas populações, análises da eficácia de novas
140 medidas de controle (HALLIN; DEPLANO; STRUELENS, 2012) e da adequação dos
141 protocolos de detecção do fluxo de fitopatógenos (FERRANTE; SCORTICHINI,
142 2015). Portanto, a compreensão da genética de população de *B. cenosepacia*
143 caracteriza-se como importante do ponto de vista epidemiológico, pois poderá
144 apresentar implicações diretas no manejo da doença, tendo em vista que a genética de
145 população revela a variabilidade entre e dentro da população. Logo, este estudo teve
146 como objetivo determinar a variabilidade e a estrutura genética de populações de *B.*
147 *cenosepacia* linhagens IIIA e IIIB, oriundas de áreas de plantio de cebola do Nordeste
148 brasileiro.

149

150 **Material e Métodos**

151

152 **Origem dos isolados e condições de cultivo**

153

154 Foram utilizados 63 isolados de *B. cenosepacia* pertencentes a Coleção de
155 Culturas Rosa Mariano, do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) da
156 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As informações sobre os
157 hospedeiros e municípios de obtenção dos isolados encontram-se na Tabela 1.

158 Os isolados foram reativados a partir de preservações em água destilada
159 esterilizada (ADE) em placas de Petri contendo meio de cultura NYDA (ágar nutritivo
160 20 g; dextrose 10 g; extrato de levedura 5 g; extrato de carne 3 g e peptona 5 g,
161 completando-se até 1000 mL com água destilada). Em seguida, as placas foram
162 incubadas em Biochemical Oxygen Demand - B.O.D, a uma temperatura de 30° C,
163 durante 48.

164

165 **Extração do DNA genômico**

166

167 A extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando-se o protocolo proposto
168 por Gama e Covello (2016). O DNA foi quantificado através de Biodrop (Biodrop™,
169 Cambridge, Canadá), e a integridade do DNA foi verificada através da eletroforese em
170 gel de agarose a 1%. Posteriormente, a concentração de DNA foi ajustada para 10
171 ng/μL, sendo armazenado a - 20°C.

172

173 **rep-PCR**

174

175 As reações de rep-PCR (REP-e BOX-PCR) foram compostas por 1X de PCR
176 Master Mix 2X (Promega Corporation, Wisconsin, EUA) (0,05 U/μl de Taq DNA
177 polimerase, tampão de reação, 4 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP), 2 μM de cada
178 *primer* e 200 ng de DNA. As amostras foram amplificadas em termociclador modelo
179 SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). O
180 controle negativo foi composto por amostras livre de DNA para verificar a presença de
181 possíveis contaminantes. Os produtos da PCR foram corados com SYBR® Safe
182 (Ivitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), posteriormente foi feita
183 uma eletroforese para a separação das bandas em gel de agarose 1,5%, durante 3 h a 80
184 V, em tampão de corrida TBE 0,5X (0,045 M de Tris, 0,045 M de Ácido bórico e 0,001
185 M de EDTA). Os marcadores utilizados para verificar o tamanho dos fragmentos
186 gerados foram GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Ontario,
187 Canada) e GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canada).
188 Por fim, os géis foram fotodocumentados. Todas as reações foram realizadas duas
189 vezes.

190

191 **Variabilidade genética de *Burkholderia cenocepacia***

192

193 A população total constituída por 63 isolados foi analisada isoladamente e em
194 subpopulações formadas por isolados oriundos dos municípios de Petrolândia, Belém de
195 São Francisco, Orocó e Casa Nova.

196

A variabilidade das subpopulações do Vale do São Francisco foi inferida por

197 meio dos parâmetros diversidade genotípica (G), que se refere ao número e a frequência
198 de combinações alélicas que podem ser feitas entre loci diferentes, calculada conforme
199 o índice G de Stoddart e Taylor (1998) para cada subpopulação, com *bootstrap* de 1000
200 repetições; diversidade gênica (H_e), que infere sobre o número e frequência de alelos
201 em loci individuais em uma população, calculada pelo índice de Shannon-Wiener
202 (1949). Fração clonal, que se refere ao percentual de clones na população, estimada pela
203 fórmula $(N-G)/N$, em que N é o tamanho da amostra e G o número de genótipos (ZHAN
204 et al., 2002). A riqueza genotípica $E(g_n)$, que é o número de genótipos presente em uma
205 população e aequitabilidade genotípica (E_s), a qual mede como os genótipos estão
206 distribuídos na amostra (LUDWIG; REYNOLDS, 1988; GRÜNWALD et al., 2003) O
207 número de haplótipos e o índice de diversidade de Simpson (Λ), que avalia a
208 heterogeneidade da população (HE; HU, 2005). Adicionalmente, o G , H_e , E_s e o índice
209 de diversidade de Simpson foram estimados utilizando curvas de rarefação
210 (GRÜNWALD et al., 2003). Para analisar o desequilíbrio de ligação em todas as
211 subpopulações foi calculado o índice de associação (I_A), este índice baseia-se na
212 variância de distâncias emparelhadas entre os indivíduos, ou seja, o número de loci em
213 que eles diferem, comparando a variância dessas distâncias com àquelas esperadas se
214 não houvesse desequilíbrio gamético entre os pares de loci e é dependente do tamanho
215 da amostra. (MAYNARD SMITH et al., 1993) e o índice alternativo r_{bD} (r_d), que
216 consiste em uma modificação de I_A , que remove a dependência do tamanho da amostra,
217 sendo menos sensível à variação no número de loci e devendo, portanto, facilitar
218 comparações entre populações (AGAPOW; BURT, 2001).

219 Uma curva de acumulação de genótipos foi gerada para verificar se o número de
220 marcas moleculares obtidas através dos marcadores foi suficiente para detectar toda a
221 variabilidade contida na população de *B. cenocepacia*.

222

223 **Estrutura genética de *Burkholderia cenocepacia***

224

225 A estrutura genética da população foi determinada pela análise de variância
226 molecular (AMOVA), que caracteriza-se pela análise da distribuição da variabilidade
227 genética entre e dentro das populações, gerando estimativas dos componentes de
228 variância que refletem a correlação da diversidade dos genótipos em diferentes níveis de
229 subdivisão hierárquica (EXCOFFIER et al., 1992), bem como pelas análises de

230 diferenciação genética entre populações aos pares pelo índice F_{ST} , que calcula o déficit
231 de heterozigotos em relação as proporções esperadas, caso a população esteja em
232 equilíbrio de Hardy-Weinbrg (WRIGHT, 1931). A classificação da diferenciação dos
233 valores de F_{ST} utilizada foi a proposta por Wright (1978), em que valores entre 0,00 e
234 0,05; 0,05 e 0,15; 0,15 e 0,25 e $> 0,25$ indicam pequena, moderada, alta e elevada
235 diferenciação genética, respectivamente. Ppor fim, a dependência entre distância
236 genética e geográfica das subpopulações de *B. cenocepacia*, foi analisada utilizando o
237 teste de Mantel (SMOUSE et al., 1986).

238

239 **Análises**

240

241 As análises foram realizadas com auxílio do programa Alerquin versão 3.5.2.2
242 (EXCOFFIER et al., 2005) e o programa R versão 2.15.0 (R Development Core Team
243 2011), sendo utilizados os pacotes poppr, dplyr, mmod e vegan.

244

245 **Resultados**

246

247 **REP-PCR e BOX-PCR**

248

249 A amplificação do DNA de 63 isolados (Tabela 1) utilizando os marcadores
250 REP e BOX-PCR gerou 29 lócus, identificados por meio da quantidade de bandas
251 reprodutíveis, em um intervalo de 100 a 3000 pb. Foram gerados 14 lócus por meio do
252 marcador REP e 15 lócus por meio marcador BOX.

253 A curva de acumulação de genótipos indicou que 100% dos genótipos foram
254 detectados por meio do marcador REP e BOX-PCR, sendo observado a formação de um
255 platô, que é a formação observada no gráfico da curva de acumulação de genótipos,
256 após 100% dos genótipos da população serem detectados com 21 lócus (Figura 1).

257

258 **Variabilidade genética de *B. cenocepacia***

259

260 Após a observação de indícios de subdivisões, a população de *B. cenocepacia*,
261 foi dividida em quatro subpopulações, que foram denominadas de Petrolândia, Belém

262 de São Francisco, Orocó e Casa Nova.

263 Os índices de diversidade genética (Tabela 2) correspondentes as quatro
264 subpopulações de *B. cenocepacia* dos diferentes municípios produtores de cebola do
265 Vale do São Francisco demonstraram que a população total apresenta uma diversidade
266 moderada.

267 Foram observados 28 haplótipos na população total. A maior riqueza genotípica
268 foi constatada na subpopulação de Belém de São Francisco e a menor riqueza
269 genotípica encontrada na subpopulação de Casa Nova, sendo $E (g_{15})$ igual a 9,62 e 6,0
270 respectivamente. Os níveis de diversidade genotípica (G) encontrados variaram de 3,57
271 a 7,77. Já o índice que representa a equitabilidade genotípica (E_5), apresentou uma
272 variação de 0,69 a 0,88, sendo o menor índice observado na subpopulação de
273 Petrolândia e o maior na subpopulação de Belém de São Francisco.

274 A diversidade gênica (H_E) encontrada foi de 1,87, 2,15, 2,03 e 1,52 para as
275 subpopulações de Petrolândia, Belém de São Francisco, Orocó e Casa Nova
276 respectivamente. O maior Índice de Simpson encontrado, foi de 0,87 para a população
277 de Belém de São Francisco e o A fração clonal calculada foi de 0,45 para a
278 subpopulação de Petrolândia, 0,38 para a subpopulação de Belém de São Francisco, 0,4
279 para a subpopulação de Orocó e 0,6 para a subpopulação de Casa Nova.

280 O índice de associação (I_a) e o índice alternativo r_{barD} (rd) para todas as
281 subpopulações avaliadas foram significativamente diferentes de 0 ($P < 0,0001$),
282 indicando que a população está em desequilíbrio de ligação

283 A ocorrência de fluxo gênico entre as subpopulações avaliadas foi verificada
284 pelo número de migrantes (N_m) e haplótipos compartilhados, sendo consideravelmente
285 menores entre a subpopulação de Casa Nova e as demais subpopulações (Figura 2).
286 Dentre os haplótipos identificados na subpopulação de Casa Nova, nenhum foi
287 compartilhado entre as subpopulações avaliadas. Nas subpopulações de Petrolândia,
288 Belém de São Francisco e Orocó e Casa Nova foram encontrados haplótipos unitários,
289 enquanto a subpopulação de Casa Nova não compartilhou haplótipos com nenhuma
290 outra subpopulação (Figura 2).

291

292 **Estrutura populacional de isolados de *B. cenocepacia***

293

294 O resultado da AMOVA revelou a existência de uma variação significativa entre

295 subpopulações (25,28%), ainda que a variação dentro das subpopulações tenha sido
296 maior (74,72%) (Tabela 3). A diferenciação genética avaliada por meio do índice de
297 fixação F_{ST} (Tabela 4), demonstrou que a subpopulação de Casa Nova foi extremamente
298 diferenciada das demais. A subpopulação de Petrolândia foi altamente diferente da
299 subpopulação de Orocó e moderadamente diferente da subpopulação de Belém de São
300 Francisco. A subpopulação de Orocó e Belém de São Francisco apresentaram uma
301 diferença genética baixa.

302 O teste de Mantel indicou que existe uma associação entre distância genética e a
303 distância geográfica ($r = 0,2689$; $P = 0,001$) (Figura 3).

304

305 **Discussão**

306

307 A podridão das escamas é uma importante doença para a cultura da cebola,
308 podendo causar perdas de até 50% na produção (WORDELL FILHO; BOFF, 2006). A
309 doença está presente em diversas áreas de cultivo no Brasil e nas principais regiões
310 produtoras do Nordeste, sendo causada por *Burkholderia cenocepacia*, *B. cepacia*, *B.*
311 *gladioli* pv. *aliicola* (WORDELL FILHO; BOFF, 2006; OLIVEIRA, 2016;
312 OLIVEIRA, et al., 2017). Porém, foi relatado que a prevalência é de *B. cenocepacia*,
313 que foi identificada pela primeira vez a linhagem IIIB desta bactéria causando doença
314 em cebola (OLIVEIRA et. al., 2017), embora a linhagem IIIA também esteja presente, a
315 maior parte dos isolados pertencem a linhagem IIIB (BAIA, 2019).

316 Os isolados utilizados no presente estudo foram coletados nos principais
317 municípios produtores de cebola do Nordeste, a saber: Petrolândia, Belém de São
318 Francisco, Orocó e Casa Nova, por apresentar indícios de subdivisão nas análises
319 realizadas considerando como uma população total, esta população foi descrita em
320 quatro subpopulações, sendo considerado uma subpopulação para cada município que
321 foram realizadas as coletas.

322 Marcadores como rep-PCR, são de fácil utilização, apresentam boa
323 reprodutibilidade e são de baixo custo (COENYE; LIPUMA, 2007). Estes marcadores
324 têm sido utilizados com sucesso nos estudos de variabilidade e estrutura genética de
325 populações de fitobactérias (VANCHEVA et. al., 2018; MORAIS, 2018). Utilizando a
326 análise conjunta dos perfis de REP e BOX-PCR foi possível observar a presença de 28

327 haplótipos, revelando uma variabilidade moderada na população de *B. cenocepacia*
328 oriunda do Vale do São Francisco. No presente estudo, o marcador ERIC não foi
329 utilizado, pois, os marcadores REP e BOX foram capazes de detectar a diversidade total
330 da população.

331 A variabilidade moderada encontrada na população estudada é uma
332 característica inerente aos patógenos de plantas, o que garante a perpetuação da espécie.
333 Pois, se toda a população apresentasse a mesma composição alélica, qualquer alteração
334 externa capaz de afetar a população representaria um risco de extinção de todas os
335 indivíduos da mesma (MIZUBUTI; CERESINI, 2018).

336 Os índices de diversidade genética refletiram a variabilidade das populações de
337 *B. cenocepacia* nos diferentes municípios produtores de cebola do Nordeste brasileiro.
338 Quando comparada com as demais subpopulações, a subpopulação de Casa Nova
339 caracterizou-se por apresentar maior proporção de clones. Seguindo esta tendência, a
340 subpopulação de Belém de São Francisco, apresentou valores mais altos de diversidade
341 gênica, genotípica e riqueza genotípica. A compreensão da diversidade genética, tal
342 como a obtida neste trabalho, particionada em estruturas genéticas distintas auxilia na
343 determinação dos fatores bióticos ou abióticos que afetam a evolução das populações do
344 fitopatógeno (LIN et al. 2014).

345 As estimativas para o desequilíbrio de ligação obtidas para todas as
346 subpopulações de *B. cenocepacia*, demonstraram que o processo de recombinação nas
347 subpopulações estudadas ocorre em baixa frequência. A recombinação em bactérias
348 não é um processo obrigatório e os mecanismos de recombinação estão sujeitos a
349 muitos fatores biológicos e ecológicos que podem variar mesmo em diferentes
350 populações da mesma espécie (TANG et. al., 2009). A frequência com que ocorrem os
351 eventos de recombinação é também determinada pela disponibilidade e eficiência dos
352 mecanismos de troca genética, incluindo a transformação, transdução e conjugação
353 (FEIL; SPRATT, 2001). Sendo assim, diante da baixa ocorrência de eventos de
354 recombinação nas populações, pode-se dizer que o principal fator gerador de
355 variabilidade nas mesmas tem sido a mutação, que por sua vez caracteriza-se como a
356 principal fonte de variação genética para que mudanças evolutivas ocorram (HARTL;
357 CLARK, 2007).’

358 A combinação de diversidade genética moderada e baixa frequência de
359 recombinação encontrada no presente estudo sugere que a estrutura genética desta

360 bactéria no Vale do São Francisco está em concordância com o modelo epidêmico
361 proposto por MAYNARD SMITH et. al., (1993), onde o cruzamento aleatório fornece
362 variabilidade genética, mas múltiplos ciclos assexuados levam ao desequilíbrios de
363 ligação e uma tendência à aumentar a quantidade de clones na população.

364 A ocorrência de migração entre as subpopulações, a exemplo do que ocorre entre
365 as subpopulações de Orocó e Belém de São Francisco com maior intensidade, mas
366 também ocorre entre as demais subpopulações estudadas, indica que a bactéria está
367 sendo disseminada entre as áreas de cultivo. A disseminação de fitobactérias a longas
368 distância é realizada pelo homem, transportando e comercializando partes vegetativas
369 das plantas (ROMEIRO, 2005).

370 Os cebolicultores do Vale do São Francisco se deslocam durante o cultivo entre
371 as áreas produtoras, transportando material propagativo, ferramentas, maquinários e
372 materiais de irrigação com solo aderido, o que leva a introdução de novos haplótipos
373 nas subpopulações. Entretanto, o número de migrantes estimado foi muito baixo entre a
374 subpopulação de Casa Nova e as demais subpopulações, o que permitiu a divergência
375 entre as estas subpopulações, pois o fluxo gênico, ou seja, a entrada de novos isolados
376 na mesma foi insuficiente para contrapor os efeitos da deriva genética.

377 A ausência de diferenciação genética entre as subpopulações de Orocó e Belém
378 de São Francisco relacionou-se a ocorrência de alto fluxo gênico e pode ser explicada,
379 entre outros fatores, pela proximidade entre os dois municípios. Estudo de estrutura de
380 população de isolados do complexo *R. solanacearum* realizado em diferentes regiões da
381 ilha de Trinidad, Trinidad e Tobago, mostrou que a proximidade entre as regiões foi
382 responsável pela não estruturação da população, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico,
383 seja por meio de redes de irrigação ou pelo movimento de pessoas, equipamentos e
384 materiais vegetais (RAMSUBHAG et. al., 2012).

385 O cultivo de cebola na Região do Submédio do Vale do São Francisco, teve
386 início nas cidades de Belém de São Francisco, Cabrobó, e Orocó, só depois migrando
387 para a Bahia. Portanto, é provável que essa migração para outras áreas, tenha provocado
388 um efeito fundador na população, indivíduos vindo de Pernambuco fundaram uma outra
389 população no município de Casa Nova. Em todas as subpopulações ocorre o efeito da
390 deriva genética, que traz consequências como a mudança aleatória na frequência de
391 alelos, a diminuição da variação dentro da subpopulação, devido a extinção de alelos e
392 divergência genética, que acontece devido as mudanças aleatórias que ocorrem

393 independentemente (MILGRON, 2015). Devido a separação espacial entre estas
394 subpopulações, ocorreu também a diminuição do fluxo gênico entre as populações dos
395 municípios Pernambucanos e a subpopulação de Casa Nova na Bahia.

396 Neste trabalho foi possível observar uma associação entre a distância genética e
397 a distância geográfica, que, por sua vez, tem sido apontada como determinante para o
398 aumento da diferenciação genética, uma vez que pode influenciar na variação e na
399 estrutura genética da população devido à redução no fluxo gênico (LIU et. al., 2009;
400 NORMAN et. al., 2009; TOUKAM et. al., 2009). A diminuição da semelhança entre
401 membros de uma comunidade com o aumento da distância geográfica é um padrão
402 biogeográfico universal, observado para todos os domínios da vida, principalmente em
403 organismos com dispersão limitada (MARTINY et. al., 2011).

404 A partir da compreensão da estrutura da população de *B. cenosepacia* no Vale
405 do São Francisco, bem como da dinâmica pela qual ela evolui nesta região, o
406 desenvolvimento de variedades resistentes à população do patógeno presente no Vale
407 do São Francisco poderá ser realizado de forma direcionada estrategicamente
408 levando-se em consideração a diversidade genética observada no presente estudo.

409

410 **Agradecimentos**

411 À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior),
412 pela concessão da bolsa de doutorado e ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

413

414 **Referências**

415

416 AGAPOW, P. M.; BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular**
417 **Ecology Notes**, Malden, v.1, n. 1, p.101-102. 2001.

418

419 ALMEIDA, D. Aliáceas. In: _____. **Manual de culturas hortícolas**. Lisboa: Editorial
420 presença, v. 1, 2006, p. 25 -77.

421

422 ARAÚJO, J. L. P.; CORREIA, R. C.: Custos. In: COSTA, N. D.; RESENDE, G. M.
423 **Cultivo da cebola no Nordeste**. 2007, p. 10-14.

- 424
- 425 ARBER, W. Genetics variation: molecular mechanisms and impact on microbial
426 evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2000.
- 427
- 428 BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation
429 with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 155-165, 2002.
- 430
- 431 BOITEUX; L. S.; MELO, P. C. T. **Sistema de produção de cebola (*Allium cepa* L).**
432 Embrapa, 2004. Disponível em: < <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/> >. Acesso em: 23
433 mar. 2019.
- 434
- 435 COENYE, T.; LIPUMA, J. 2007. Epidemiology, typing and population genetics of
436 Burkholderia species. In: VANDAMME, P.; COENYE, T. **Burkholderia: Molecular**
437 **Microbiology and Genomics**. Norfolk: Horizon bioscience, 2007. p. 29-52.
- 438
- 439 EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated
440 software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**
441 **online**, v. 1, n. 1, p. 47-50, 2005.
- 442
- 443 EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance
444 inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human
445 mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Bethesda, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.
- 446
- 447 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
448 **Statistics division**. 2013. Disponível em: <
449 <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 23 mar. 2019.
- 450
- 451 HALLIN, M.; DEPLANO, A.; STRUELENS, M. J. **Molecular typing of bacterial**
452 **pathogens**: a tool for the epidemiological studies and control of infectious diseases. In
453
- 454 MORAND, S.; BEAUDEAU, F.; CABARET, J. **New frontiers of molecular**
455 **epidemiology of infectious diseases**. Netherlands: Springer Science & Business media.
456 2012. p. 9-25.

- 457
458 HE, F.; HU, X. S. Hubbell's fundamental biodiversity parameter and the 474 Simpson
459 diversity index. **Ecology Letters**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 386-390, 2005.
- 460
461 GRÜNWALD, N. J.; GOODWIN, S. B.; MILGROOM, M. G.; FRY, W. E. Analysis of
462 genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**, Saint
463 Paul, v. 93, n. 6, p. 738-746, 2003.
- 464
465 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017. Indicadores
466 IBGE, estatísticas da produção agrícola (dezembro – 2017). Brasília, BR.
- 467
468 JOMBART, T. Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers.
469 **Bioinformatics**, Oxford: v. 24, n. 11, p. 1403-1405, 2010.
- 470
471 LOUWS, F. J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J. Assessing genetic diversity of
472 microbes using repetitive sequence-based PCR (rep-PCR). **Nucleic Acid Amplification**
473 **Methods for the Analysis of Environmental Samples**, Lancaster, p. 63-94, 1996.
- 474
475 LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. **Statistical ecology: a primer in methods and**
476 **computing**. New York: John Wiley & Sons, 1988. 337 p.
- 477
478 MILGROOM, M. G. **Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology and**
479 **Evolution**. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, 2015. 399 p.
- 480
481 MORAIS, R. F. **Estrutura genética de *Ralstonia pseudosolanacearum* no estado de**
482 **Pernambuco**. 2018, 60 f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) – Universidade
483 Federal Rural de Pernambuco, Recife 2018.
- 484
485 OLIVEIRA, W. J.; SILVA, A. M. S.; CANDEIA, J. A.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R.
486 L. R.; GAMA, M. A. S. First report of *Burkholderia cenocepacia* causing sour skin of
487 onion (*Allium cepa*) in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 101, n. 11, p. 1950, 2017.
- 488
489

- 490 OLIVEIRA, W. J. **Etiologia da podridão de escama da cebola no semiárido**
491 **brasileiro**. 2016, 59 f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) – Universidade Federal
492 Rural de Pernambuco, Recife 2016.
493
- 494 RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.;
495 VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; DE BRUIJIN, F. J. Comparison of AFLP and rep-
496 PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a
497 model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**,
498 London, v.50. p. 665-677. 2000.
499
- 500 ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Editora UFV, 2005. 417 p.
501
- 502 SHANNON, C.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**.
503 Urbana: University of Illinois Press, 1949. 144 p.
504
- 505 SMITH M. J.; SMITH, N. H.; O'ROURKE, M.; SPRATT, B. G. How clonal are
506 bacteria? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**
507 **America**, Washington, v. 90, p.4384-4388. 1993.
508
- 509 SMOUSE, P. E.; LONG, J. C.; SOKAL, R. R. Multiple regression and correlation
510 extensions of the Mantel test of matrix correspondence. **Systematic zoology**,
511 Washington, v. 35, n. 4, p. 627-554, 1986.
512
- 513 SOUSA, N. R. 2002. Processos genético-evolutivos e os recursos fitogenéticos. In:
514 SOUSA, N. R.; SOUZA, A. G. C. (Eds.) **Recursos fitogenéticos na Amazônia**
515 **Ocidental: Conservação, pesquisa e utilização**. Embrapa Amazônia Ocidental,
516 Manaus. pp. 19-26.
517
- 518 STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotypic diversity: estimation and prediction in
519 samples. **Genetics**, Madison, v. 118, n. 4, p. 705-711, 1988.
520
521
522

- 523 VANCHEVA, T.; STOYANOVA, M.; TASHEVA-TERZIEVA, E.; BOGATZEVSKA,
524 N.; MONCHEVA, P. Molecular methods for diversity assessment among
525 xanthomonads of Bulgarian and Macedonian pepper. **Brazilian Journal of**
526 **Microbiology**, São Paulo, v. 49, n. S, p. 246 – 259.
- 527
- 528 VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUJIN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic
529 fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain
530 reaction. **Methods in molecular and cellular biology**, London, v. 5, n. 1, p. 25-40,
531 1994.
- 532
- 533 WORDELL FILHO, J. A.; BOFF, P. Doenças de origem parasitária. In: WORDELL
534 FILHO, J. A.; ROWE, E.; GONÇALVES, P. A. S.; DEBARBA, J. F.; BOFF, P.;
535 THOMAZELLI, L. F. **Manejo fitossanitário da cebola**. Florianópolis: EPAGRI, 2006.
536 p. 19 - 126.
- 537
- 538 WRIGHT, S. Statistical methods in biology. **Journal of the American Statistical**
539 **Association**, New York, v. 26, n. 173A, p. 155-163, 1931.
- 540
- 541 WRIGHT, S. Evolution and Genetics of Populations. Chicago: University of Chicago,
542 1978. 511p.
- 543
- 544 ZHAN, J.; MUNDT, C. C.; HOFFER, M. E.; MCDONALD, B. A. Local adaptation and
545 effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant
546 pathosystem. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 15 n. 4, p. 634-647, 2002.
- 547

548 **Tabela 1.** Isolados de *Burkholderia cenocepacia* coletados nas regiões produtoras de
 549 cebola do Vale do São Francisco

Isolado	Espécie/Linhagem	Variedade do hospedeiro	Subpopulação
CCRMB02	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA	IPA 11	Petrolândia
CCRMB06	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB18	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 10	Belém de São Francisco
CCRMB19	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 10	Belém de São Francisco
CCRMB21	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 11	Orocó
CCRMB22	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB23	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB25	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB27	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB29	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB31	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Belém de São Francisco
CCRMB40	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB45	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB48	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	Brisa Verão	Belém de São Francisco
CCRMB52	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Brisa Verão	Petrolândia
CCRMB55	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	Brisa Verão	Belém de São Francisco
CCRMB56	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 10	Belém de São Francisco
CCRMB57	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 10	Belém de São Francisco
CCRMB58	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 10	Belém de São Francisco
CCRMB60	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 10	Belém de São Francisco
CCRMB61	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 10	Belém de São Francisco
CCRMB63	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 10	Belém de São Francisco
CCRMB64	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 10	Belém de São Francisco
CCRMB65	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 10	Belém de São Francisco
CCRMB66	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 10	Petrolândia
CCRMB67	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB68	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB69	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia

CCRMB71	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB81	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB83	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB85	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB86	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB89	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB90	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB91	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB93	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB94	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB96	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Petrolândia
CCRMB98	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB99	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 11	Orocó
CCRMB103	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB106	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB108	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB109	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB112	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Orocó
CCRMB129	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Belém de São Francisco
CCRMB132	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Belém de São Francisco
CCRMB138	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Belém de São Francisco
CCRMB146	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 11	Casa Nova
CCRMB147	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 11	Casa Nova
CCRMB152	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Casa Nova
CCRMB156	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 10	Casa Nova
CCRMB157	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 11	Casa Nova
CCRMB162	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Casa Nova
CCRMB169	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 11	Casa Nova
CCRMB170	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Casa Nova
CCRMB190	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 11	Casa Nova
CCRMB192	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 11	Casa Nova
CCRMB196	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Casa Nova

CCRMB199	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 11	Casa Nova
CCRMB200	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IPA 11	Casa Nova
CCRMB238	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IPA 11	Casa Nova

550

551

552 **Tabela 2.** Índices de diversidade genética e estimativa do desequilíbrio de ligação para
 553 populações de *Burkholderia cenocepacia* dos diferentes municípios produtores de
 554 cebola do Vale do São Francisco

População	Belém de São			Casa
	Petrolândia	Francisco	Orocó	Nova
N ^m	18	16	15	15
Nº de haplótipos	10	10	09	06
E ⁿ (g ₁₅)	8,67	9,62	9,0	6,0
G ^o	4,85 (3,57 – 6,18)	7,77 (7,25 – 8, 33)	6,43	3,57
E ₅ ^p	0,693 (0,58 – 0,79)	0,887 (0,86 – 0,90)	0,82	0,71
H _E ^q	1,87 (1,58 -2,11)	2,15 (2,08 – 2,21)	2,03	1,52
Índice de Simpson ^r	0,78 (0,72 – 0,85)	0,87 (0,86 – 0,88)	0,84	0,72
Fração Clonal	0,45	0,38	0,4	0,6
Ia ^s	1,25**	1,25**	1,25**	1,25**
rbarD (rd) ^t	0,84**	0,84**	0,84**	0,84**

555 ^mTamanho da amostra; ⁿRiqueza genotípica estimada o menor N; ^oDiversidade
 556 genotípica; ^pÍndice de equitabilidade genotípica; ^qDiversidade gênica; ^rÍndice de
 557 diversidade genotípica. ^sÍndice de associação; ^tÍndice alternativo. ** Significativo a 1%
 558 de probabilidade.

559

560 **Tabela 3.** Análise de variância molecular (AMOVA) em subpopulações de
 561 *Burkholderia cenocepacia* oriundas de diferentes municípios produtores de cebola Vale
 562 do São Francisco
 563

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Componente de variância	Porcentagem de variação
Entre subpopulações	3	47,05	0,83 Va	25,28
Dentro de subpopulações	60	146,99	2,45 Vb	74,72
Total	63	194,04	3,27	

564

565

566 **Tabela 4.** Diferenciação genética entre populações (F_{ST}) de *Burkholderia cenocepacia*
 567 de diferentes subpopulações (diagonal inferior) e número de migrantes (Nm) (diagonal
 568 superior)
 569

Subpopulação	Petrolândia	Belém de São Francisco	Orocó	Casa Nova
Petrolândia		1,69	0,85	0,44
Belém de São Francisco	0,12847		2,62	0,75
Orocó	0,22644	0,08693		0,37
Casa Nova	0,36073	0,24893	0,40408	

570

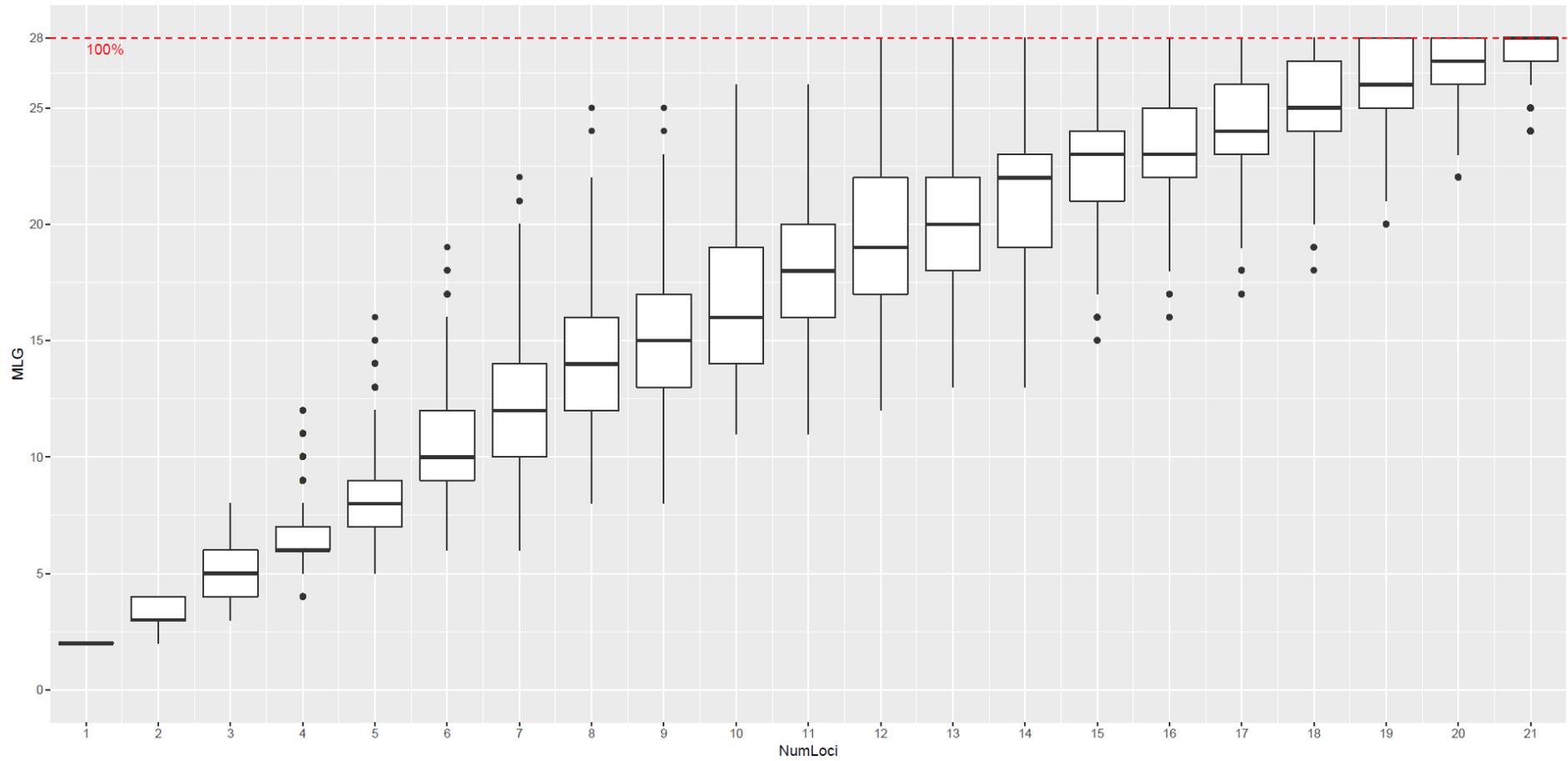


Figura 1. Curva de acumulação de genótipos dos marcadores REP e BOX-PCR para 63 isolados de *Burkholderia cenozeptica* oriundos dos principais municípios produtores de cebola do Vale do São Francisco.

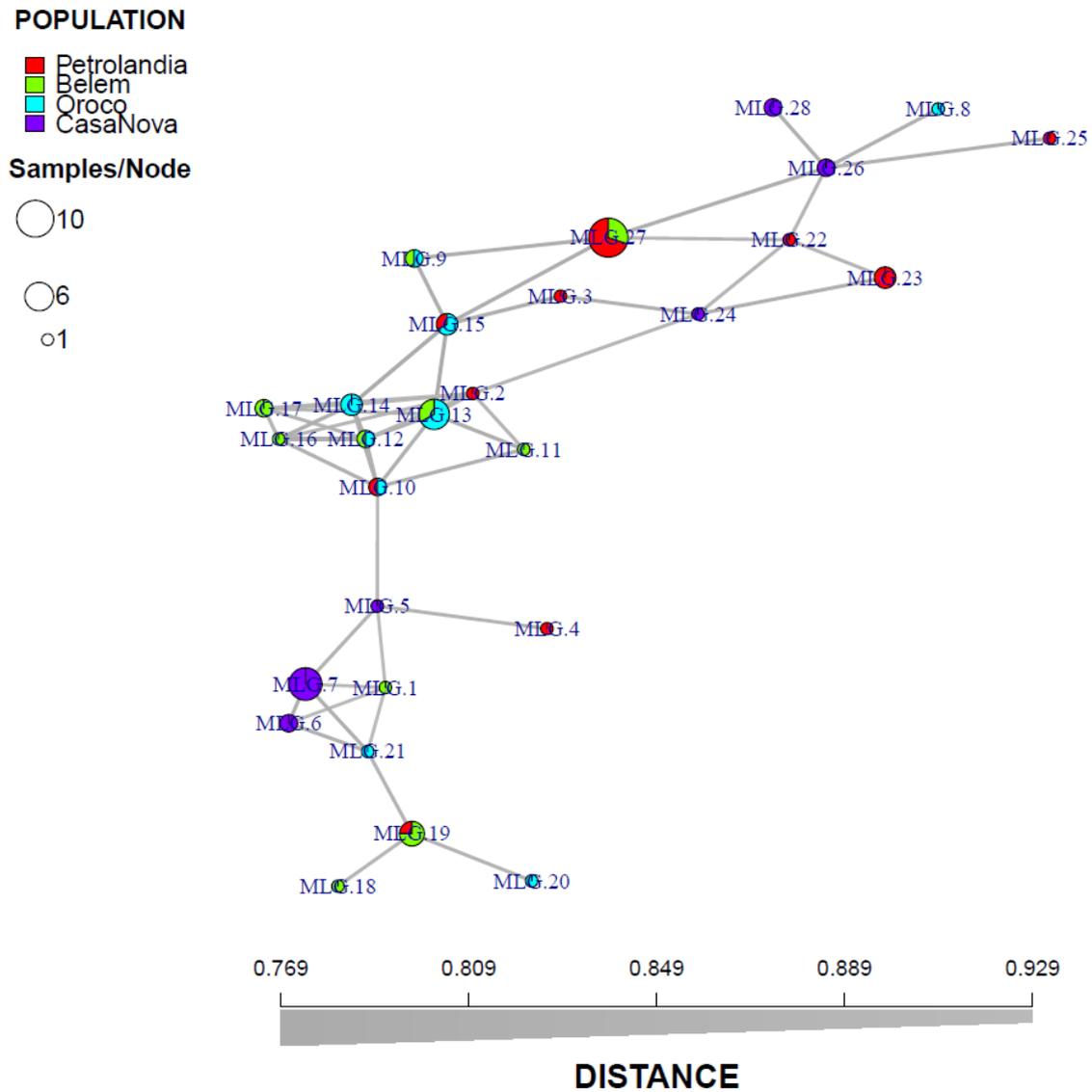


Figura 2. Rede de haplótipos de isolados de *Burkholderia cenocepacia* de acordo com as subpopulações de Petrolândia, Belém de São Francisco, Orocó e Casa Nova. Cada círculo identificado corresponde a um haplótipo (MLG), cujo tamanho é proporcional à sua frequência na população.

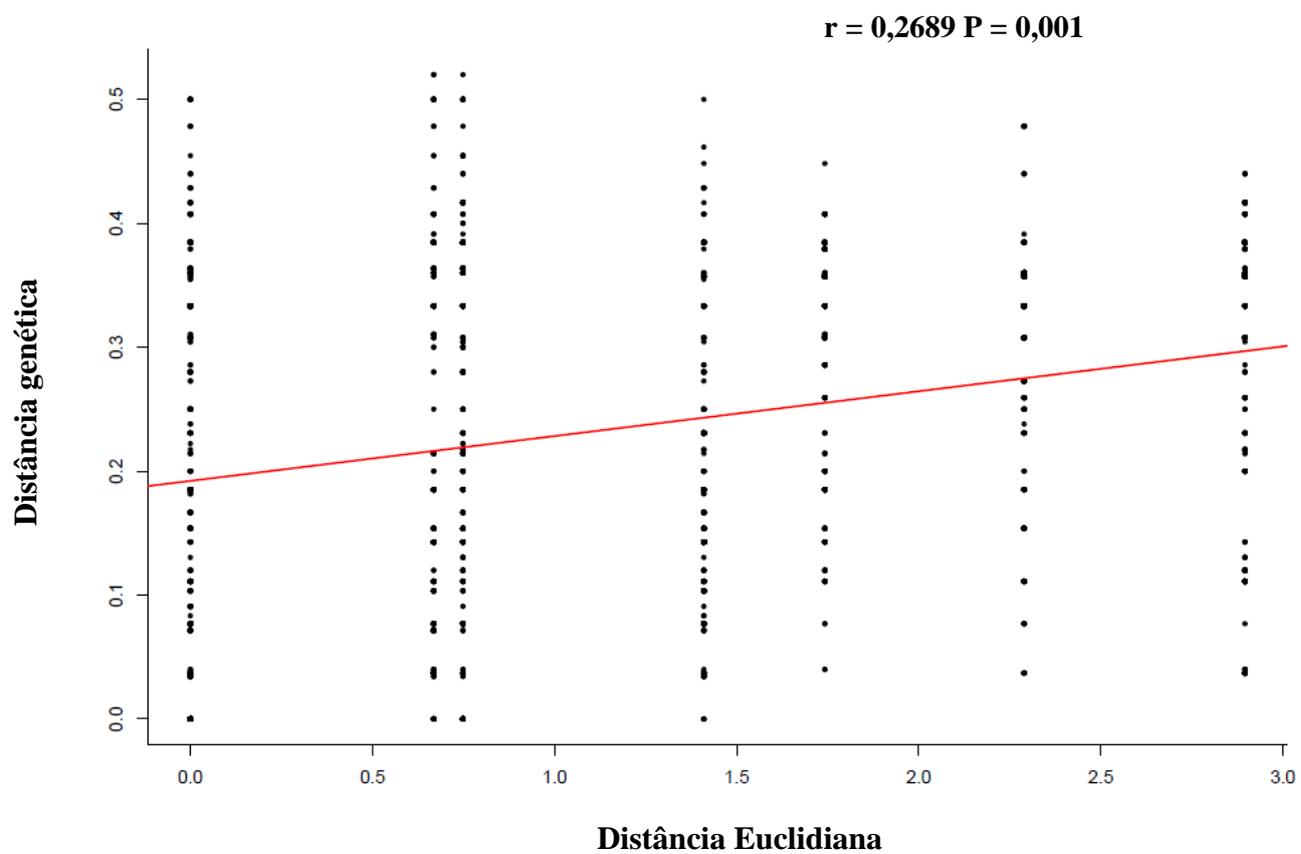


Figura 3. Correlograma entre a distância genética e a distância geográfica (transformada em distância Euclidiana) de populações de *Burkholderia cenocepacia* por meio do teste de Mantel.

CAPÍTULO III

**UTILIZAÇÃO DE *primers* ESPECÍFICOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
ISOLADOS DE *Burkholderia cenocepacia*, LINHAGENS IIIA E IIIB, OBTIDOS
DE CEBOLA**

1 **UTILIZAÇÃO DE *primers* ESPECÍFICOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE**
2 **ISOLADOS DE *Burkholderia cenocepacia*, LINHAGENS IIIA E IIIB, OBTIDOS**
3 **DE CEBOLA**

4
5 **Willams J. Oliveira¹, Elineide B. Souza¹, Ana Maria Benko-Iseppon², Flávia F.**
6 **Aburjaile^{2*} e Marco A. Siqueira da Gama^{1*}**

7 ¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE,
8 Brazil

9 ²Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

10 E-mail: marco.gama@ufrpe.br

11
12 **Resumo**

13 *Burkholderia cenocepacia* pertence ao complexo *B. cepacia*, sendo atualmente formada
14 por quatro linhagens filogenéticas, das quais as linhagens IIIA e IIIB são causadoras da
15 podridão das escamas da cebola no Nordeste do Brasil. Atualmente são utilizadas como
16 ferramentas de identificação o sequenciamento o gene *recA* ou a análise de sequências
17 multilocus (MLSA). Porém, outras metodologias podem ser utilizadas também para
18 identificação e diagnose de fitopatógenos, como a utilização de *primers* específicos, que
19 se caracteriza por ser um método rápido e eficaz na detecção e diagnose de agentes
20 fitopatogênicos. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho o desenho de
21 *primers* específicos para detecção e identificação rápida de isolados de *B. cenocepacia*
22 da linhagem IIIA e IIIB. Foram desenhados cinco pares de *primers* por meio da
23 ferramenta de desenho de *primers* disponível no Integrated DNA Technologies, com
24 base nas sequencias do gene *recA*, da proteína beta-lactamase classe A, C e D e na
25 sequência da proteína metalo-beta-lactamase PA0057, obtidas a partir de análises de
26 pangenomica do genoma completo de 17 isolados disponíveis no NCBI. Os *primers*
27 foram testados *in silico*, sendo posteriormente testada a especificidade utilizando-se
28 isolados de *B. cenocepacia* das linhagens IIIA e IIIB, *B. cepacia*, *B. gladioli* pv.
29 *alliicola*, *B. gladioli* pv. *gladiolus*, *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium*
30 *carotovorum*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia*
31 *pseudosolanacearum*, além de 22 isolados obtidos de semente de cebola. Os *primers*
32 desenhados com base na sequência do gene *recA* amplificaram bandas reprodutíveis

33 apenas com o DNA dos isolados de *B. cenocepacia* da linhagem IIIB, enquanto os
34 *primers* desenhados com base no fragmento da proteína β – lactamase (PA0057)
35 amplificaram bandas reprodutíveis para os isolados de *B. cenocepacia* pertencentes as
36 linhagens IIIA e IIIB. Os demais *primers* não amplificaram nenhuma banda. Os
37 *primers* obtidos no presente estudo permitirão a identificação e detecção rápida de
38 isolados de *B. cenocepacia* das linhagens IIIA e IIIB.

39

40 **Palavras-chave:** *primer* específico, *Burkholderia cenocepacia*, identificação

41

42 **Abstract**

43 *Burkholderia cenocepacia* is a bacterium that has lineage IIIA and IIIB that cause
44 rotting of onion scales in northeastern Brazil, with the lineage IIIB of this bacterium
45 predominant in producing areas. Currently used as identification tools are *recA* gene
46 sequencing or multilocus sequence analysis (MLSA). However, other methodologies
47 can also be used for identification and diagnosis of phytopathogens, such as the use of
48 specific primers, which is characterized by being a fast and effective method for the
49 detection and diagnosis of phytopathogenic agents. Given the above, this work aimed to
50 design specific primers for detection and fast identification of strains of *B. cenocepacia*
51 lineage IIIA and IIIB. Five primer pairs were designed using the primer design tool
52 available from Integrated DNA Technologies, based on the class A, C and D beta-
53 lactamase protein sequences, of *recA* gene and the PA0057 metallo-beta-lactamase
54 protein sequence. Of 17 complete genome pangenomic analysis of NCBI isolates, all
55 primers were tested *in silico*. Subsequently, specificity was tested using bacterial
56 isolates of *B. cenocepacia* strains IIIA and IIIB, *B. cepacia*, *B. gladioli* pv. *alliicola*, *B.*
57 *gladioli* pv. *gladiolus*, *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum*,
58 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia*
59 *pseudosolanacearum* and 22 isolates obtained from onion seed. After the specificity
60 test, the reproducibility test of the results was performed using isolates of *B.*
61 *cenocepacia* lineage IIIA and IIIB. Primers designed based on the *recA* gene sequence
62 amplify repeatable bands only from isolates of *B. cenocepacia* lineage IIIB, while
63 primers designed based on the β - lactamase protein fragment (PA0057) amplified
64 reproducible bands of *B. cenocepacia* isolates. belonging to lineage IIIA and IIIB. The

65 other primers didn't amplify any bands. The primers efficient in amplification showed
66 reproducibility of the results, according to the amplification of the bands in the strains
67 tested. Therefore, the primers obtained in this study will allow the fast identification of
68 isolates of *B. cenocepacia* lineage IIIA and IIIB. Being the correct identification of the
69 pathogen is the first step for the implementation of a disease management program.

70

71 **Keywords:** specific primer, *Burkholderia cenocepacia*, identification

72

73 **Introdução**

74 *Burkholderia cenocepacia* pertence ao complexo *B. cepacia* (CBC), o qual é
75 composto atualmente por 22 espécies do gênero *Burkholderia* (MARTINA et al., 2018).
76 As espécies do CBC podem ocupar diferentes nichos ecológicos (PARKE; GURIAN-
77 SHERMAN, 2001), apresentam elevada similaridade quando a comparação entre
78 espécies é feita por meio de sequências da região 16S rDNA (98-100%) e *recA* (94-
79 95%) (COENYE et al., 2001).

80 A espécie *B. cenocepacia* foi descrita a partir da reclassificação realizada com
81 base na hibridização DNA-DNA de isolados representantes da espécie *B. cepacia*
82 genomovar III (VANDAMME et al., 2003). Atualmente esta bactéria apresenta uma
83 subdivisão em quatro diferentes linhagens filogenéticas que são denominadas de IIIA,
84 IIIB, IIIC e IIID, definidas com base no sequenciamento do gene *recA* (VANDAMME
85 et al., 2003). Isolados da linhagem IIIA, além de serem patogênicos a cebola (BAIA,
86 2019), podem também estar associados como oportunistas em pacientes acometidos por
87 fibrose cística e imunodeprimidos (VANDAMME et al., 2003). Isolados da linhagem
88 IIIB foram detectados causando podridão das escamas em cebola na região semiárida do
89 Nordeste do Brasil (OLIVEIRA et al., 2017) e em pacientes portadores de fibrose
90 cística, além de terem sido encontrados em amostras do ambiente, tais como, amostras
91 de solo rizosférico de plantios de cebola, banana e milho (MAHENTHIRALINGAM et
92 al., 2000; VANDAMME et al., 2003). Por sua vez, os isolados da linhagem IIIC foram
93 obtidos apenas de amostras de solo (VANDAMME et al., 2003), enquanto os isolados
94 pertencentes a linhagem IIID foram encontrados em amostras clínicas
95 (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000; VANDAMME et al., 2003).

96 Os sintomas da doença apresentam-se como uma podridão viscosa, porém firme,

97 de coloração variando de amarelo à marrom claro, uma ou poucas escamas internas do
98 bulbo podem se desprender (MOHAN, 1995). As escamas próximas àquelas que estão
99 infectadas podem continuar firmes e, embora a podridão das escamas ocorra de forma
100 individual, todo o bulbo é comprometido (DAVIS et al., 2014; ROBERTS, 2013). A
101 porção externa dos bulbos pode apresentar-se sadia, mas a região do pescoço pode ficar
102 mole quando as folhas entram em colapso, e com o avançar da doença para estágios
103 mais severos, as escamas saudáveis podem se soltar durante o manuseio (MOHAN,
104 1995). Adicionalmente, bulbos infectados por espécies do CBC apresentam
105 normalmente odor avinagrado (WORDELL FILHO; BOOF, 2006).

106 Atualmente são utilizadas como ferramentas de identificação e ferramentas
107 taxonômicas abordagens baseadas na utilização da análise de inferência Bayesiana (IB)
108 realizada com base no sequenciamento o gene *recA* (OLIVEIRA et. al., 2017) ou da
109 análise de sequências multilocus (MLSA) para fins de identificação e até mesmo
110 classificação dessas espécies dentro do CBC (BALDWIN et al., 2005; BALDWIN et
111 al., 2008; VANDAMME; DAWYNDT, 2011). Porém, outras metodologias podem ser
112 utilizadas também para identificação e diagnose de fitopatógenos, como a utilização de
113 *primers* específicos (PALACIO-BIELSA; CAMBRA; LÓPEZ, 2009). No entanto, para
114 que se possa alcançar o nível de especificidade adequado, é necessário o conhecimento
115 da sequência alvo, bem como que a região de interesse a ser amplificada (LOPEZ et al.,
116 2009). Protocolos de detecção baseados em PCR foram desenvolvidos para a maioria
117 das bactérias que causam doenças em plantas cultivadas (DUARTE; BERTOLINI,
118 2012). Além disso, com o auxílio de ferramentas de pangenômica também pode ser
119 realizada a construção de *primers* específicos para detecção e identificação de
120 fitobactérias. A partir da metodologia utilizando a análise de pangenômica foram
121 desenhados *primers* para a identificação de *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* e espécies
122 do complexo *B. cepacia* (HO et. al., 2011). O objetivo deste trabalho foi obter *primers*
123 capazes de identificar isolados de *B. cenocepacia* da linhagem IIIA e IIIB associadas
124 podridão das escamas da cebola.

125

126

127

128

129

130 **Material e métodos**

131 **Origem dos isolados**

132

133 Foram utilizados nove isolados de *B. cenocepacia* pertencentes a linhagem IIIA
134 e 12 isolados pertencentes a linhagem IIIB, um isolado de *B. cepacia*, um isolado de *B.*
135 *gladioli* pv. *alliicola*, um isolado de *B. gladioli* pv. *gladiolus*, um isolado de *Dickeya*
136 *chrysanthemi*, um isolado de *Pectobacterium carotovorum*, um isolado de *Xanthomonas*
137 *campestris* pv. *viticola*, um isolado de *Ralstonia solanacearum*, um isolado de *Ralstonia*
138 *pseudosolanacearum*, além de 22 isolados obtidos de semente de cebola pertencentes à
139 pertencentes à Coleção de Culturas Rosa Mariano, do Laboratório de Fitobacteriologia
140 (LAFIBAC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) (Tabela 2 e 3).

141 Todos os isolados foram reativados em placas de Petri contendo meio de cultura
142 NYDA (ágar nutritivo 20 g; dextrose 10 g; extrato de levedura 5 g; extrato de carne 3 g
143 e peptona 5 g, completando-se até 1000 mL com água destilada). Em seguida, as placas
144 foram incubadas em Biochemical Oxygen Demand - B.O.D, a uma temperatura de 30°
145 C, durante 48 horas. Durante os experimentos, os isolados bacterianos foram mantidos
146 por meio de repicagens periódicas, em meio NYDA, a cada 120 horas.

147

148 **Teste de patogenicidade**

149

150 Todos os isolados de *Burkholderia cenocepacia* e os isolados obtidos de semente
151 de cebola foram testados quanto a sua patogenicidade. Foram utilizados catafilos de
152 cebola da cultivar IPA 11. A suspensão bacteriana foi preparada a partir de cultura pura
153 dos isolados e a concentração foi ajustada em fotocolorímetro para $A_{570} = 0,54$, que
154 corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL⁻¹.

155 Para a inoculação, foi realizado um ferimento no catafilo com auxílio de uma
156 almofada entomológica e depositado no centro do ferimento 10 µL da suspensão. A
157 avaliação foi realizada 48 horas após a inoculação, sendo avaliada a presença ou
158 ausência de sintomas da doença nos catafilos inoculados. Como tratamento testemunha,
159 catafilos foram tratados similarmente com água destilada esterilizada (ADE).

160 Os tratamentos foram realizados em quatro repetições e cada repetição foi
161 composta por três catafilos de cebola inoculados.

162 **Extração e dosagem do DNA genômico**

163

164 A extração do DNA dos isolados foi ajustada utilizando-se o protocolo proposto
165 por Gama e Covello (2016). A concentração do DNA foi realizada por meio de Biodrop,
166 e a integridade do DNA foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.
167 Posteriormente, as amostras de DNA foram ajustadas para uma concentração de 10
168 ng/μl, sendo armazenadas a - 20° C.

169

170 **Obtenção e reanotação de genomas e desenho de primers de *B. cenocepacia***

171

172 Trezentos genomas de *B. cenocepacia*, sendo 17 completos e 283 *drafts*, foram
173 retirados do banco de dados do National Center for Biotechnology Information - NCBI
174 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (NCBI, 2019).

175 Os 17 genomas completos foram renotados automaticamente através da
176 ferramenta RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology), disponível no site
177 <http://rast.nmpdr.org/>. Os genes escolhidos como candidatos alvos fazem parte do core
178 genoma de *B. cenocepacia* (Figura 1) e já foram relatados em outros estudos (KIM et.
179 al., 2012; PEETERS, DAENEKINDT, VANDAMME, 2016; ZAKHAROVA et. al.,
180 2017) para a identificação de espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*.
181 Em seguida, realizou-se a anotação manual dos genes candidatos utilizando-se o banco
182 de dados do UniProt (<https://www.uniprot.org/>) e do Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) para
183 a caracterização da função e domínio proteico de cada respectivo alvo. Além disso, foi
184 realizada a caracterização funcional por meio do banco de dados do KEGG e COG de
185 todos os 17 genomas completos para a classificação de ontologia gênica dos candidatos
186 alvos, que por sua vez é a caracterização da função que cada gene tem no organismo.

187 O desenho dos *primers* foi realizado por meio da ferramenta de desenho de
188 *primers* disponível no Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/pages>).
189 Posteriormente, as sequências dos *primers* selecionados foram confirmados no
190 PrimerBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), em relação a
191 especificidade e parâmetros de controle de qualidade.

192

193

194 **Especificidade e eficiência dos *primers* desenhados**

195

196 Os *primers* foram selecionados com base no resultado de amplificação
197 específica de *B. cenocepacia* da linhagem IIIA e da linhagem IIIB. A especificidade foi
198 testada sobre o DNA genômico extraído de cultura pura dos isolados bacterianos. Para
199 tanto, além de isolados de *B. cenocepacia*, representando sua diversidade genética,
200 foram testados isolados de outras espécies fitopatogênicas (Tabela 2) com os *primers*
201 desenhados para verificar a especificidade dos mesmos, através de reação de PCR.

202 A eficiência dos *primers* foi verificada através da reação de PCR, sendo as
203 reações compostas por 1X de PCR Master Mix 2X (0,05 U/ μ l de Taq DNA polimerase;
204 tampão de reação; 4 mM de MgCl₂; 0,4 mM de cada dNTP), 0,5 μ M de cada *primer* e
205 50 ng de DNA. As amostras foram amplificadas em termociclador modelo
206 SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Os
207 parâmetros utilizados para a reação de PCR foram definidos a partir do desenho dos
208 *primers*, consistiu em três etapas. A primeira etapa consistiu na desnaturação inicial a
209 96° C por 1 min.; a segunda etapa foram 35 ciclos, com três etapas por ciclo,
210 desnaturação a 96° C por um minuto, anelamento por 1 min, sendo a temperatura de
211 anelamento variável de acordo com o *primer* (Tabela 3) e extensão a 72° C por 2,5 min.;
212 a terceira etapa consistiu na extensão final a 72° C, por 10 min. Foram incluídos
213 controles negativos contendo água deionizada esterilizada, em substituição ao volume
214 de DNA, em todos os experimentos para verificar a presença de contaminantes. A
215 reprodutibilidade dos *primers* foi testada em isolados de *B. cenocepacia* das linhagens
216 IIIA e IIIB (Tabela 4)

217 Três microlitros de cada produto amplificado foram submetidos a eletroforese
218 em gel de agarose a 1,0% (p/v), com um marcador de tamanho molecular (GeneRuler
219 1Kb DNA ladder; Fermentas, Ontário, Canadá) em paralelo. Eletroforese foi realizada
220 em tampão Tris-borato-EDTA (0,045 M de Tris, 0,045 M de Ácido bórico e 0,001 M de
221 EDTA) foi realizada a 80 V por 1,5 h. Os produtos da PCR, foram corados com
222 SYBER® Safe e por fim o gel foi fotodocumentado sob iluminação UV.

223 A reprodutibilidade do ensaio de PCR foi testada com 18 isolados de *B.*
224 *cenocepacia* das linhagens IIIA e IIIB (BAIA, 2019).

225

226

227 **Resultados**

228

229 **Teste de patogenicidade**

230

231 Após decorrido o tempo de 48 horas, todos os catáfilos de cebola que receberam
232 os tratamentos da inoculação de 10 μ L de suspensão bacteriana na concentração de 10⁸
233 UFC/mL apresentaram maceração do tecido. A testemunha negativa, composta por
234 ADE, não apresentou sintomas.

235

236 **Obtenção e reanotação de genomas *B. cenocepacia***

237

238 Foram identificadas e caracterizadas as regiões funcionais de cada genoma,
239 sendo caracterizadas a função e domínio proteico de cada sequência alvo.

240

241 **Desenho de *primers* para detecção e identificação de *B. cenocepacia***

242

243 Foram desenhados cinco pares de *primers* (Tabela 1), que geraram tamanhos de
244 fragmentos diferentes. Sendo um par de *primer* desenhado com base na sequência do
245 gene *recA* e quatro com base em sequências da família β -lactamase.

246

247 **Teste de especificidade e eficiência dos *primers* desenhados**

248

249 No teste de detecção, foi possível verificar que o *primer* desenhado com base na
250 sequência do gene *recA* amplificou uma banda com aproximadamente 500pb para os
251 três isolados de *B. cenocepacia* da linhagem IIIB (Figura 3). Este *primer* não amplificou
252 o DNA de nenhum isolado da linhagem IIIA, bem como para nenhum outro isolado
253 testado.

254 O *primer* desenhado com base no fragmento da proteína β – lactamase (PA0057)
255 gerou um fragmento de aproximadamente 650pb para os isolados de *B. cenocepacia*
256 pertencentes as linhagens IIIA e IIIB (Figura4). Este *primer* não foi eficaz para a
257 amplificação de nenhum outro isolado testado.

258 Os *primers* desenhados com base no fragmento da proteína β – lactamase classe

259 D e classe A, não apresentaram bandas amplificadas, demonstrando um resultado
260 negativo para estes grupos bacterianos.

261

262 **Teste de reprodutibilidade**

263

264 Foi verificado a reprodutibilidade dos resultados em ambos os *primers* que
265 apresentaram bandas de amplificação. O *primer* desenhado com base na sequência do
266 gene *recA*, amplificou uma banda com aproximadamente 500pb para os nove isolados
267 de *B. cenocepacia* da linhagem IIIB testados (Figura 5).

268 O *primer* desenhado com base no fragmento da proteína β – lactamase
269 (PA0057), gerou um fragmento com aproximadamente 650pb, para os 18 isolados de *B.*
270 *cenocepacia* pertencentes as linhagens IIIA e IIIB testados (Figura 6).

271

272 **Discussão**

273

274 A podridão de escamas da cebola está presente nas principais regiões produtoras
275 do Nordeste (OLIVEIRA, 2016). Sendo causada pela bactéria *B. cenocepacia*, linhagens
276 IIIA) e IIIB, porém, a linhagem IIIB é prevalente (OLIVEIRA et. al., 2017; BAIA,
277 2019).

278 *B. cenocepacia*, é uma espécie pertencente ao complexo *B. cepacia*, que
279 atualmente composto por 22 espécies distintas (MARTINA et al., 2018), estas espécies
280 apresentam alta similaridade entre as sequências dos genes 16S rDNA (98-100%) e do
281 gene *recA* (94-95%), apresentam níveis de hibridação DNA-DNA moderados (30-50%)
282 (COENYE et al., 2001). Isto demonstra a complexidade para a correta identificação
283 desta espécie e a urgência por métodos rápidos e confiáveis para realização de tal
284 atividade.

285 A identificação de isolados do CBC por meio da interpretação de testes
286 bioquímicos apresenta reações variáveis no consumo de fontes de carbono e de
287 substâncias inibitórias (BAIA, 2019). Ocorrem também variações metabólicas dentro da
288 espécie *B. cenocepacia*, podendo levar ao erro, identificando como outra espécie
289 (VANDAMME et. al., 2003). Diante disto a utilização de técnicas moleculares é
290 indispensável, esta requer protocolos reprodutíveis e eficientes (LOUWS et. al., 1999).

291 Neste sentido, foi realizado por meio de inferência bayesiana do gene *recA*, Baia
292 (2019), a separação em clados distintos com probabilidade posterior de 100%, as
293 linhagens IIIA e IIIB de *B. cenocepacia*. Com os ensaios de PCR do presente trabalho,
294 por meio da utilização de *primers* específicos, uma técnica simples e rápida, também foi
295 possível a identificação de *B. cenocepacia* e separação das linhagens IIIA e IIIB.

296 O *primer* desenhado com base no fragmento da proteína β – lactamase (PA0057)
297 gerou uma banda para os isolados pertencentes as linhagens IIIA e IIIB e o *primer*
298 desenhado com base na sequência do gene *recA* amplificou uma banda para os isolados
299 de *B. cenocepacia* IIIB, o que permitiu a identificação da bactéria e a separação das
300 linhagens.

301 A utilização dos *primers* desenhados foram eficientes e levaram a correta
302 identificação do patógeno. Esta etapa é essencial para que sejam tomadas medidas de
303 controle. Sem a identificação adequada da doença e do agente causador da doença, as
304 medidas de controle da doença podem ser um desperdício de tempo e dinheiro e podem
305 levar a mais perdas (RILEY; WILLIAMSON; MALOY, 2002).

306 O *primer* eficaz apenas na amplificação *B. cenocepacia* IIIB, foi desenhado com
307 base na sequência do gene *recA*, que têm como produto a enzima recombinase A. Esta
308 enzima é uma proteína que funciona no reparo de e recombinação do DNA de bactérias,
309 esta proteína bacteriana é altamente conservada e pode ser encontrada em praticamente
310 todas as bactérias (COX, 2007). Logo no COG é demonstrado que esta sequência faz
311 parte do que forma 1% do core genoma de *B. cenocepacia*.

312 A sequência que codifica para a proteína β – lactamase (PA0057), da qual foi
313 desenhado o *primer* capaz de amplificar *B. cenocepacia* IIIA e IIIB, não foi
314 caracterizada até então quanto a sua função. A ausência de bandas amplificadas nos
315 *primers* desenhados com base no fragmento da proteína β – lactamase classe D e classe
316 A, pode ter acontecido, devido as sequências dos genes de *B. cenocepacia* presente no
317 banco do NCBI, serem diferentes das sequências dos genes dos isolados utilizados
318 neste estudo, ou seja, esta espécie pode ter alterações no código genético ao longo do
319 tempo ou por serem de hospedeiros distintos.

320 A menor porção do core genoma de *B. cenocepacia* presente no core genoma,
321 está ligado a replicação, recombinação e reparo do DNA. Os genes envolvidos na
322 replicação, transcrição do DNA, podem ser encontrados em todos os genomas
323 minimamente analisados e, portanto, são considerados essenciais (JUHAS et. al., 2011).

324 Além desta porção do core genoma que se apresenta como sendo um gene essencial,
325 outras porções do core genoma ligadas ao transporte e metabolismo de aminoácido, a
326 produção e conversão de energia e a transcrição são consideradas essenciais. O genoma
327 central de *B. cenocepacia* é composto maioritariamente ou exclusivamente de genes que
328 são essenciais (JUHAS et. al., 2012).

329 Conclui-se que as sequencias escolhidas do gene *recA* e da proteína β –
330 lactamase (PA0057), que fazem parte do core genoma de *B. cenocepacia* geraram
331 *primers* capazes de identificar *B. cenocepacia* e separar as linhagens IIIA e IIIB desta
332 bactéria. A utilização desta ferramenta será capaz de identificar de forma rápida o
333 patógeno, com precisão e alto nível de confiabilidade.

334

335 **Agradecimentos**

336 À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior),
337 pela concessão da bolsa de doutorado e ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

338

339 **Referências**

340

341 ASSELIN, J. A. E.; BONASSERA, J. M.; BEER, S. V. PCR *primers* for detection of
342 *Pontoea anantis*, *Burkholderia* spp., and *Enterobacter* sp. From onion. **Plant Disease**,
343 St. Paul, v. 100, n. 4, p. 836-846. 2016.

344

345 BALDWIN, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; DREVINEK, P.; POPE, C.; WAINE,
346 D. J.; HENRY, D. A.; SPEERT, D. P.; CARTER, P.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J.
347 J.; DOWSON, C. G. Elucidating global epidemiology of *Burkholderia multivorans* in
348 cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. **Journal of Clinical**
349 **Microbiology**, Washington, v. 46, n. 1, p. 290 – 295, 2008.

350

351 BAIA, A. D. B. **Diversidade de espécies de Burkholderia causadoras de podridão**
352 **em bulbos de cebolas no semiárido brasileiro**. 2019, 112f. Tese (Doutorado em
353 fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife 2019.

354

- 355 BALDWIN, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; THICKETT, K. M.; HO-
356 NEYBOURNE, D.; MAIDEN, M. C.; GOVAN, J. R.; SPEERT, D. P.; LIPUMA, J. J.;
357 VANDAMME, P.; DOWSON, C. G. Multilocus sequence typing scheme that provides
358 both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal**
359 **of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 9, p. 4665-4673, 2005.
360
- 361 COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, J. J. Taxonomy and
362 identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**,
363 Washington, v. 39, p. 3427-3436. 2001.
364
- 365 COX, M. M. Regulation of Bacterial RecA Protein Function. **Critical reviews in**
366 **biochemistry and molecular biology**, Boca Raton, v. 42, n. 1, p. 41-43, 2007.
367
- 368 DUARTE, V.; BERTOLONI, E. Técnicas biológicas e moleculares na identificação e
369 detecção de bactérias fitopatogênicas. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JR. W. C.;
370 PEREIRA, O. L. **O Essencial da fitopatologia: agentes causais**, vol 2, Viçosa: Editora
371 UFV, 2012, p. 335 – 354.
372
- 373 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
374 **Statistics division.** 2013. Disponível em: <
375 <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 23 mar. 2019
376
- 377 HO, C. C.; LAU, C. C. Y.; MARTELLI, P.; CHAN, S. Y.; TSE, C. W. S.; WU, A. K.
378 L.; YUEN, K. Y.; LAU, S. K.P.; WOO, P. C. Y. Novel Pan-Genomic Analysis
379 Approach in Target Selection for Multiplex PCR Identification and Detection of
380 *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia*
381 Complex Species: a Proof-of-Concept Study. **Journal of Clinical Microbiology**,
382 Washington, v. 49, n. 3, p. 814 – 821, 2011.
383
- 384 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017. Indicadores
385 IBGE, estatísticas da produção agrícola (dezembro – 2017). Brasília, BR.
386
387

- 388 KANG, I. J.; KANG, M. H.; NOH, T. H.; SHIM, H. K.; SHIN, D. B.; HEU, S.
389 Simultaneous Detection of Three Bacterial Seed-Borne Diseases in Rice Using
390 Multiplex Polymerase Chain Reaction. **The Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 32, n.
391 6, p. 575-579, 2016.
- 392
- 393 JUHAS, M.; EBERL, L. GLASS, J. L. Essence of life: essential genes of minimal
394 genomes. **Trends in cell biology**, Cambridge, v. 21, n. 10, p. 562-568, 2011.
- 395
- 396 JUHAS, M.; STARK, M.; MERING, C. V.; LUMJIAKTASE, P.; CROOK, D. W.;
397 VALVANO, M. A.; EBERL, L. High Confidence Prediction of Essential Genes in
398 *Burkholderia cenocepacia*. **Plos one**, v. 7, n. 6, p. e40064, 2012.
- 399
- 400 KADO, C. I. Classification of plant-patogenic Bacteria. In: _____. **Plant**
401 **Bacteriology**. St. Paul, 2010, p. 21 – 62.
- 402
- 403 KIM, B. K.; CHO, M. S.; KIM, M. H.; CHOI, H. J.; KANG, M. J.; SHIM, H. S.; AHN,
404 T. Y.; KIM, J.; PARK, D. S. Rapid and Specific Detection of *Burkholderia glumae* in
405 Rice Seed by Real-Time Bio-PCR Using Species-Specific Primers Based on an *rhs*
406 Family Gene. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 4, p. 577 – 580, 2012.
- 407
- 408 LEE, C.; LEE H. H.; MANNAA, M.; KIM, N.; PARK, J.; KIM, J.; SEO, Y. S.
409 Genomics-based Sensitive and Specific Novel *Primers* for Simultaneous Detection of
410 *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* in Rice Seeds. **The Plant Pathology**
411 **Journal**, Seoul, v. 34, n. 6, p. 490-498, 2018.
- 412
- 413 LIPUMA, J. J.; CURRIE, B. J.; PEACOOK, S. J.; VANDAMME, P. *Burkholderia*,
414 *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*,
415 *Delftia* and *Acidovorax*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.C.; FUNKE, G.;
416 JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; WARNOCK, D.W.; (Eds.) **Manual of Clinical**
417 **Microbiology**. ASM Press: Washington DC. 2011, p. 692-713.
- 418
- 419
- 420

- 421 LÓPEZ, M. M.; LLOP, P.; OLMOS, A.; MARCO-NOALES, E.; CAMBRA, M.;
422 BERTOLINI, E. Are Molecular Tools Solving the Challenges Posed by Detection of
423 Plant Pathogenic Bacteria and Viruses? **Current Issues in Molecular Biology**, v. 11, n.
424 1, p. 13-46, 2009.
- 425
- 426 LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUJIN, F. J. The three Ds of PCR-based
427 genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual**
428 **Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81–125, 1999.
- 429
- 430 MARTINA P.; LEGUIZAMON M.; PRIETO C. I.; SOUSA S. A.; MONTANARO, P.;
431 DRAGHI, W. O.; STÄMMLER, M.; Bettiol M, DE CARVALHO, C. C. C. R.;
432 PALAU, J.; FIGOLI, C.; ALVAREZ, F.; BENETTI, S.; LEJONA, S.; VESCINA, C.;
433 FERRERAS, J.; LASCH, P.; LAGARES, A.; ZORREGUIETA, A.; LEITÃO, J. H.;
434 YANTORNO, O. M.; BOSCH, A. *Burkholderia puraquae* sp. nov., a novel species of
435 the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils.
436 **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiolog**, Reading, v. 68,
437 n. 1, p. 14-20, 2018.
- 438
- 439 OLIVEIRA, W. J.; SILVA, A. M. S.; CANDEIA, J. A.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R.
440 L. R.; GAMA, M. A. S. First Report of *Burkholderia cenocepacia* Causing Sour Skin of
441 Onion (*Allium cepa*) in Brazil. **Plant disease**, St. Paul, v. 101, n. 11, p. 1950, 2017.
- 442
- 443 OLIVEIRA, W. J. **Etiologia da podridão de escama da cebola no semiárido**
444 **brasileiro**. 2016, 59 f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) – Universidade Federal
445 Rural de Pernambuco, Recife 2016.
- 446
- 447 PALACIO-BIELSA, A.; CAMBRA, M. A.; LÓPEZ, M. M. PCR detection and
448 identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007).
449 **Journal of plant pathology**, v. 91, n. 2, 249-297, 2009.
- 450
- 451 PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia*
452 complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual**
453 **Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 39, n. 1, p. 225-258, 2001.

454

455 PEETERS, C.; DAENEKINDT, S.; VANDAMME, P. PCR Detection of *Burkholderia*
456 *multivorans* in water and soil samples. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 184 – 190, 2016.

457

458 RILEY, M. B.; WILLIAMSON, M. R.; MALOY, O. Plant disease diagnosis. The Plant
459 Health Instructor. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2002. Disponível
460 em:

461 <<https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/casestudies/Pages/PlantDiseaseDia>
462 gnosis.aspx>. Acesso em: 08 ago. 2019.

463

464 VANDAMME, P.; DAWYNDT, P. Classification and identification of the
465 *Burkholderia cepacian* complex: past, present and future. **Systematic and Applied**
466 **Microbiology**, Stuttgart, v. 34, n. 2, p. 87-95, 2011.

467

468 VANDAMME, P.; HOLMES, B.; COENYE, T.; GORIS, J.; MAHENTHIRALIGAM,
469 E.; LIPUMA, J. J.; OVAN, J. R. W. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.—a new twist to
470 an old story. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, n. 2, p. 91-96, 2003.

471

472 WORDELL FILHO, J. A.; BOFF, P. Doenças de origem parasitária. In: WORDELL
473 FILHO, J. A.; ROWE, E.; GONÇALVES, P. A. S.; DEBARBA, J. F.; BOFF, P.;
474 THOMAZELLI, L.F. **Manejo fitossanitário da cebola**. Florianópolis: EPAGRI, 2006.
475 p. 19 - 126.

476

477 ZAKHAROVA, L.; TETERYATNIKOVA, N.; TOPORKOV, A.; VIKTOROV, D.
478 Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of
479 *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, and
480 *Burkholderia cepacia* complex. **Acta tropica**, Basel, v. 174, n. 10, p. 1-8, 2017.

481

482

483

484

485

486

Tabela 1. Genes candidatos alvos para a reação de multiplex PCR em *Burkholderia cenocepacia*

Gene	Produto (Pfam)	Produto (UniProt)	Sequências 5' – 3'	Fragmento (pb)
<i>recA</i>	Recombinase A	Proteína <i>recA</i>	GAACTGCCTCGTGATCTTCAT	487
<i>recA</i>	Recombinase A	Proteína <i>recA</i>	CTCTTCTTCGTCCAACACCTC	
classe A beta-lactamase	β – lactamase	Família de enzima β – lactamase	CCTGTATCGCCGCTATGAAA	545
classe A beta-lactamase	β – lactamase	Família de enzima β – lactamase	GGTCATCCATTCCGTCAGTT	
classe C beta-lactamase	Serina hidrolase	β – lactamase	GGCACGAGCTGGA ACTATT	
classe C beta-lactamase	Serina hidrolase	β – lactamase	AACCACGAATGACCGTAGAC	
classe D beta-lactamase	Domínio da transpeptidase da proteína de ligação à penicilina	β – lactamase classe D	TGCTGAAGGACGAACACAC	268
classe D beta-lactamase	Domínio da transpeptidase da proteína de ligação à penicilina	β – lactamase classe D	GAGATCCGTAACGACGAATTGA	
-	Metallo-beta-lactamase	Metallo-beta-lactamase	TGCAGTTCAACGAGGACTATG	628
-	Metallo-beta-lactamase	Metallo-beta-lactamase	AGAAACGCCTCGTGATTCC	

Tabela 2. Isolados bacterianos utilizados na reação de PCR para identificação e detecção de *Burkholderia cenocepacia*, linhagens dos grupos IIIA e IIIB

Isolado	Organismo	Hospedeiro	País
^v CCRMB31	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIB	<i>Allium cepa</i>	Brasil
CCRMB56	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB67	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB70	<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i>	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB109	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB134	<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i>	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB147	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB175	<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i>	<i>A. cepa</i>	Brasil
^w IBSBF567	<i>B. cepacia</i>	<i>A. cepa</i>	Estados Unidos
^x IBSBF534	<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i>	<i>A. cepa</i>	Estados Unidos
^y IBSBF546	<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	<i>Gladiolus</i> sp.	Estados Unidos
CCRMPCB 535	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	<i>Lactuca sativa</i>	Brasil
CCRMDD 299	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>L. sativa</i>	Brasil
Xcv204	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Brasil
Rs120	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>A. cepa</i>	Brasil
Rs55	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB252	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB253	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB254	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB255	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB256	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil

CCRMB257	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB258	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB261	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB262	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB263	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB264	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB267	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB268	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB272	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB273	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB277	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB279	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB284	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB285	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB290	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB291	Endofítico não identificado	<i>A. cepa</i>	Brasil

^vCCRMB: Coleção de Culturas Rosa Mariano; IBSBF534 = Isolado ATCC19302; IBSBF546 = ATCC 10248 e IBSBF567 = ATCC 10856.

^wIBSBF: Coleção de Culturas do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil; ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. Todos os isolados de fitobactérias estão disponíveis na Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM), instalada no Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Pernambuco, Brazil).

^wIsolado tipo de *Burkholderia cepacia*

^xPatotipo de *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*.

^yPatotipo de *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*.

Tabela 3. Parâmetros utilizados na reação de PCR, com isolados de *Burkholderia cenocepacia*, agente causal da podridão de escamas da cebola

<i>primer</i>	Sequências 5' – 3'	Temperatura de anelamento (° C)
<i>recA</i> F	GAAGTGCCTCGTGATCTTCAT	53,0
<i>recA</i> R	CTCTTCTTCGTCCAACACCTC	
<i>lacA</i> F	CCTGTATCGCCGCTATGAAA	53,1
<i>lacA</i> R	GGTCATCCATTCCGTCAGTT	
<i>lacC</i> F	GGCACGAGCTGGAAGTATT	52,9
<i>lacC</i> R	AACCACGAATGACCGTAGAC	
<i>lacD</i> F	TGCTGAAGGACGAACACAC	52,8
<i>lacD</i> R	GAGATCCGTAACGACGAATTGA	
<i>lacPF</i>	TGCAGTTCAACGAGGACTATG	52,7
<i>lacPR</i>	AGAAACGCCTCGTGATTCC	
16S	GGCAGCAGTGGGGAATTTTG	55,9
16S	TAGCCTGCCAGTCACCAATG	

Tabela 4. Isolados de *Burkholderia cenocepacia* das linhagens IIIA e IIIB, utilizados no teste de reprodutibilidade dos *primers* que apresentaram amplificação de bandas nos testes iniciais

Isolado	Organismo	Hospedeiro	País
^v CCRMB02	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA	<i>Allium cepa</i>	Brasil
CCRMB21	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB55	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB57	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB58	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB146	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB61	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB23	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB22	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB29	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB40	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB48	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB06	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB66	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB19	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>A. cepa</i>	Brasil
CCRMB259	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>A. cepa</i>	Brasil

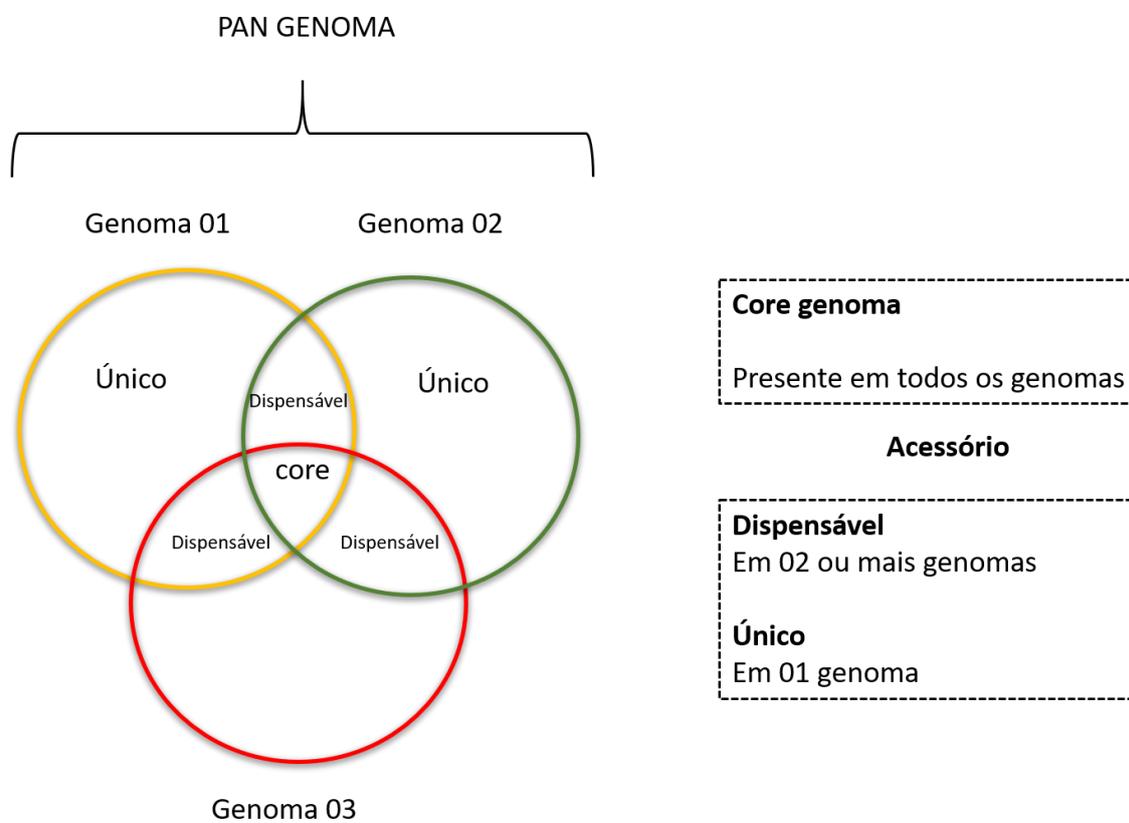


Figura 1. Abordagem de pangenômica para a identificação de genes candidatos para a utilização em testes de multiplex PCR.

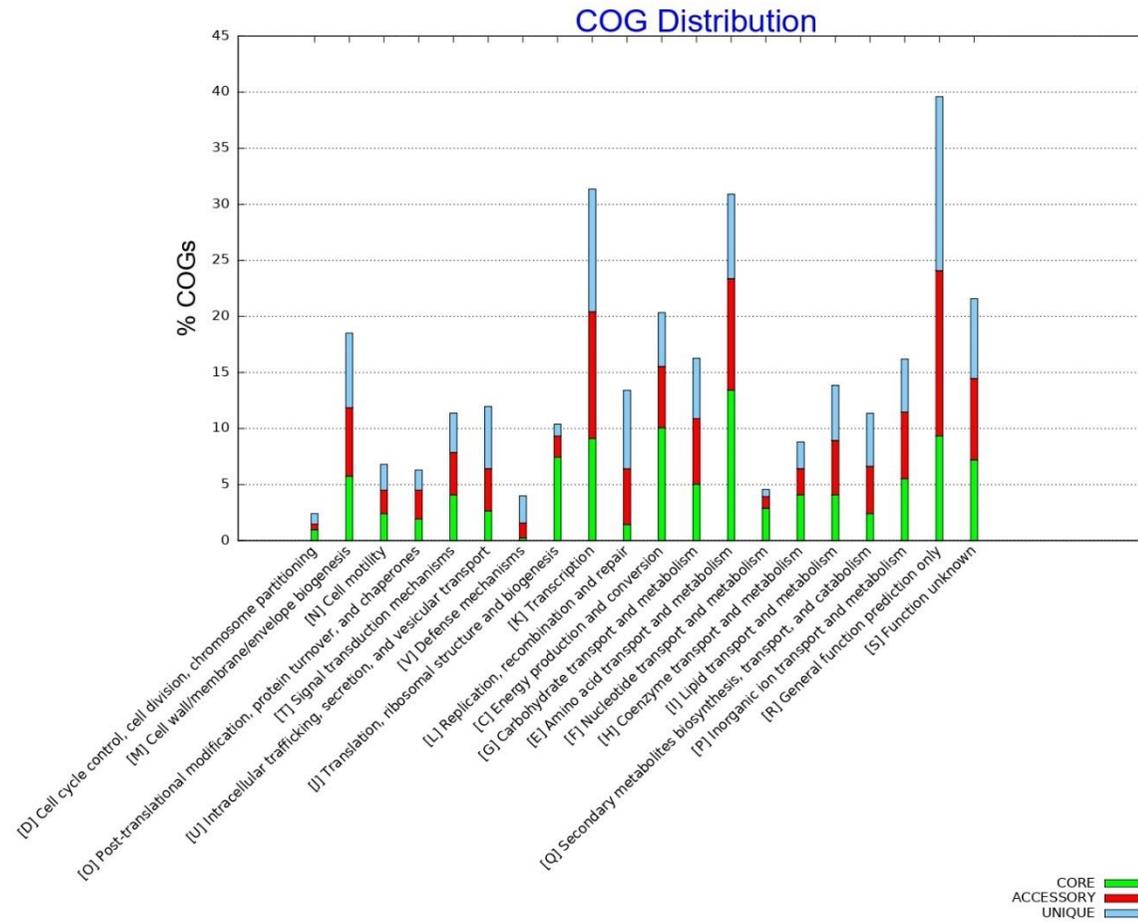


Figura 2. Gráfico demonstrando o percentual de sequências e suas funções em *Burkholderia cenocepacia*, no core genoma, no genoma acessório e sequências única.



Figura 3. Gel de eletroforese da PCR com *primer* desenhado com base em fragmento do gene *recA*. Reação 1 e 5, isolados CCRM 147 e CCRM 56, respectivamente (*B. cenocepacia* IIIA); Reação 2 a 4, isolados CCRMB 109, CCRMB 67 e CCRMB 31, respectivamente (*B. cenocepacia* IIIB); Reação 6 a 18, isolados CCRMB 70, CCRMB 175, CCRMB 134, IBSBF 567, IBSBF 534, IBSBF 546, CCRMPCB 535, CCRMDD 299, Xcv 204, Rs 120, Rs55, CCRMB 252, CCRMB 253, CCRMB 254 e CCRMB 255, respectivamente; Reação 19, controle negativo e M – Marcados de peso molecular 1Kb, Fermentas

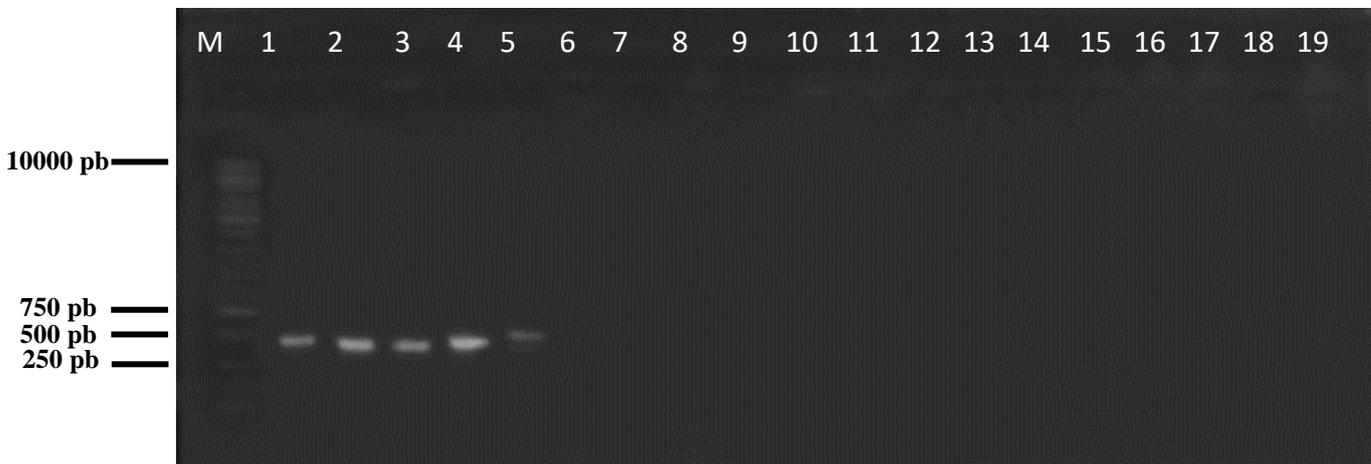


Figura 4. Gel de eletroforese da PCR com *primer* desenhado com base no fragmento da proteína β – lactamase (PA0057). Reação 1 e 5, isolados CCRM 147 e CCRM 56, respectivamente (*B. cenocepacia* IIIA); Reação 2 a 4, isolados CCRMB 109, CCRMB 67 e CCRMB 31, respectivamente (*B. cenocepacia* IIIB); Reação 6 a 18, isolados CCRMB 70, CCRMB 175, CCRMB 134, IBSBF 567, IBSBF 534, IBSBF 546, CCRMPCB 535, CCRMDD 299, Xcv 204, Rs 120, Rs55, CCRMB 252, CCRMB 253, CCRMB 254 e CCRMB 255, respectivamente; Reação 19, controle negativo e M – Marcados de peso molecular 1Kb, Fermentas



Figura 5. Gel de eletroforese da PCR com *primer* desenhado com base em fragmento do gene *recA*. Reação 1 a 8, isolados CCRMB 02, CCRMB 21, CCRMB 55, CCRMB 57, CCRMB 58, CCRMB 146 e CCRMB 156, respectivamente (*B. cenocepacia* IIIA); Reação de 9 a 18, isolados CCRMB 61, CCRMB 23, CCRMB 22, CCRMB 29, CCRMB 40, CCRMB 48, CCRMB 06, CCRMB 66, CCRMB 19 e CCRMB 259 (*B. cenocepacia* IIIA); Reação 19, controle negativo e M – Marcados de peso molecular 1Kb, Fermentas

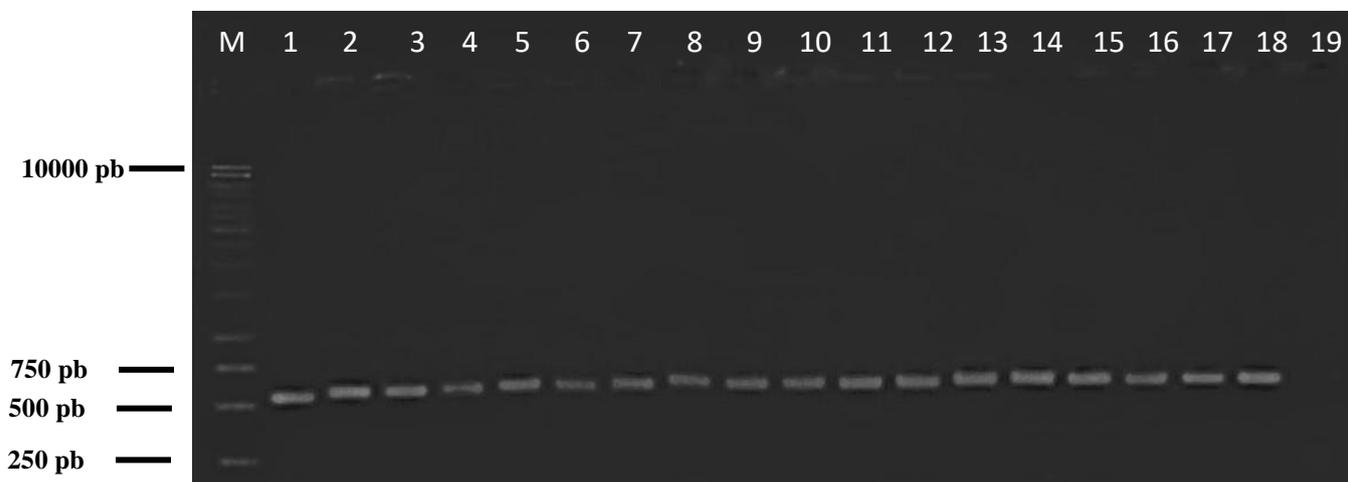


Figura 6. Gel de eletroforese da PCR com *primer* desenhado com base no fragmento da proteína β – lactamase (PA0057). Reação 1 a 8, isolados CCRMB 02, CCRMB 21, CCRMB 55, CCRMB 57, CCRMB 58, CCRMB 146 e CCRMB 156, respectivamente (*B. cenocepacia* IIIA); Reação de 9 a 18, isolados CCRMB 61, CCRMB 23, CCRMB 22, CCRMB 29, CCRMB 40, CCRMB 48, CCRMB 06, CCRMB 66, CCRMB 19 e CCRMB 259 (*B. cenocepacia* IIIA); Reação 19, controle negativo e M – Marcados de peso molecular 1Kb, Fermentas

CONCLUSÕES GERAIS



CONCLUSÕES GERAIS

A população de *B. cenocepacia* do Vale do São Francisco apresentou variabilidade genética moderada;

A recombinação entre as subpopulações, ocorre em baixa frequência na geração de variabilidade na população de *B. cenocepacia* do Vale do São Francisco;

A subpopulação de Casa Nova foi extremamente diferenciada das demais subpopulações;

Mutação foi a principal força evolutiva atuando na população de *B. cenocepacia* do Vale do São Francisco;

Os *primers* desenhados com base na sequência do gene *recA* foram capazes de identificar os isolados de *B. cenocepacia* da linhagem IIIB e os *primers* desenhados com base na sequência do fragmento da proteína β – lactamase (PA0057) foram capazes de identificar *B. cenocepacia* das linhagens IIIA e IIIB, caracterizando-se como importantes ferramentas de detecção rápida dessas fitobactérias.