



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

**DIVERSIDADE DE *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*,
AGENTE CAUSAL DA QUEIMA BACTERIANA EM
CEBOLA NO CERRADO BRASILEIRO**

LUCIELLEN DA COSTA FERREIRA

LUCIELLEN DA COSTA FERREIRA

**DIVERSIDADE DE *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, AGENTE CAUSAL DA
QUEIMA BACTERIANA EM CEBOLA NO CERRADO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade de
Brasília como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa
de Pós-Graduação em Fitopatologia

Orientador

Dr. Maurício Rossato

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL**

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Luciellen da Costa

Diversidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, agente causal da queima bacteriana em cebola no cerrado brasileiro/ Luciellen da Costa Ferreira.

Brasília, 2021.

Número de páginas p.85.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Diversidade - Filogenia.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Diversidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, agente causal da queima bacteriana em cebola no cerrado brasileiro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois, sem Ele não teria chegado a lugar algum.

Aos meus pais que sempre me impulsionaram a ir além, a lutar pelos meus objetivos, jamais desistir diante os obstáculos e todos os dias me incentivam a ser uma pessoa cada vez melhor. Ao meu esposo por todo apoio e por sempre me incentivar nos meus estudos.

Agradeço aos professores da União Pioneira de Integração Social (UPIS) que fizeram parte da minha trajetória onde realizei minha graduação, em especial agradeço a professora Cristina Gravina que me recomendou para o curso de mestrado.

Agradeço aos professores da Universidade de Brasília por cada ensinamento, por transmitirem seu conhecimento tão valioso e por tornar possível a realização de um sonho que é estar cursando o mestrado em Fitopatologia. Agradeço imensamente!

Em especial agradeço ao professor Mauricio Rossato meu orientador de mestrado por toda dedicação, pelos ensinamentos, paciência, por sempre estar disposto a ouvir e acatar as solicitações, agradeço por toda compreensão e por sempre me estimular a fazer o meu melhor. Sou ainda mais grata, pois, também tive a oportunidade de ser sua orientada na graduação e espero ainda ter oportunidade de aprender muito mais com seus ensinamentos.

Agradeço a Dra. Alice Maria Quezado Duval pela disponibilização dos isolados para o estudo, os quais pertencem à coleção de trabalho de Bactérias Fitopatogênicas de Hortaliças da Embrapa Hortaliças, e ao Dr. Valter Rodrigues Oliveira coordenador do projeto “Desenvolvimento de híbrido de cebola amarela para plantio no cedo” (SEG 30.19.00.111.00.00) que viabilizou os sequenciamentos genéticos dos isolados. Agradeço também o professor Fernando Lucas de Melo pelo apoio e suporte nas análises de bioinformática.

Aos meus colegas da pós-graduação, pelos momentos que compartilhamos, mesmo que de forma virtual devido a pandemia essa interação ainda foi possível e muito valiosa, sou grata por cada um que tive a oportunidade de conhecer.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa e financiamento desse projeto e a Universidade de Brasília pela oportunidade de fazer parte do seu corpo estudantil.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Professor Maurício Rossato**, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq).

DIVERSIDADE DE *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, AGENTE CAUSAL DA QUEIMA BACTERIANA EM CEBOLA NO CERRADO BRASILEIRO

LUCIELLEN DA COSTA FERREIRA

TESE OU DISSERTAÇÃO APROVADA em 11/10/2021 por:

Prof. Dr. Edivânio Rodrigues de Araújo
Examinador Externo

Profa. Dra. Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira
Examinador Interno

Prof. Dr. Maurício Rossato
Orientador (Presidente)

Profa. Dra. Thaís Ribeiro Santiago
(Suplente)

BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2021

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	II
LISTA DE FIGURAS	III
RESUMO GERAL	IV
GENERAL ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO	1
Objetivos gerais.....	3
Objetivos específicos.....	3
1. REVISÃO DE LITERATURA	4
A cultura da cebola (<i>Allium cepa</i>)	4
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	8
Resistência ao cobre em <i>Xanthomonas</i>	13
Diversidade genética de <i>Xanthomonas</i>	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
Coleção de isolados.....	18
Extração de DNA	22
Identificação dos isolados a nível de gênero por PCR	22
BOX - PCR e seleção de haplótipos.....	23
<i>Multilocus sequence analysis</i> (MLSA)	24
Sequenciamento genômico.....	27
Análise de qualidade e montagem dos genomas	28
Análise genômica comparativa	28
Identificação de regiões CRISPR	29
Efatores do sistema de secreção do tipo III (TTSS)	29
Identificação de genes de insensibilidade ao Cobre (<i>cop</i>).....	29
3. RESULTADOS	30
Identificação dos isolados a nível de gênero por PCR	30
BOX - PCR e seleção de haplótipos.....	31
<i>Multilocus sequence analysis</i> (MLSA)	33
Sequenciamento genômico e características	36
Análise genômica comparativa	37
Efatores do sistema de secreção do tipo III (TTSS)	39
Identificação de genes de insensibilidade ao Cobre (<i>cop</i>).....	42
4. DISCUSSÃO	43
5. CONCLUSÃO	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de <i>Xanthomonas</i> utilizados nesse estudo.	21
Tabela 2. Genes e <i>primers</i> utilizados para MLSA (Fargier et al. 2011)	25
Tabela 3. Espécies, isolados e acessos do gênero <i>Xanthomonas</i> do GenBank para as análises filogenéticas	25
Tabela 4. Identificação dos haplótipos selecionados a partir da análise visual do BOX-PCR, respectivos isolados e hospedeiras/cultivares de origem.....	32
Tabela 5. Haplótipos e isolados representativos usados em MLSA e suas respectivas hospedeiras e cultivares de origem.....	34
Tabela 6. Características gerais dos genomas dos isolados de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas de cebola (<i>Allium cepa</i>) apresentando sintomas de lesões cloróticas encharcadas e secas no limbo foliar (Cabeceira Grande - MG, 2019). Fotos: Alice Maria Quezado Duval	20
Figura 2. Colônias isoladas a partir de folhas sintomáticas de cebola (<i>Allium cepa</i>) em Cabeceira Grande - MG, 2019. Foto: Arquivo pessoal.....	20
Figura 3. Produtos da PCR da coleção de isolados bacterianos de campos de cultivo de cebola do cerrado brasileiro, utilizando os primers X-gumD F7 e X-gumD R7. M: marcador 1 Kb Kasvi, fragmento gerado de 350 bp. N: controle negativo. IBSBF 1770: isolado referência brasileiro de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i> . XP: <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	31
Figura 4. Perfis de BOX-PCR com o <i>primer</i> BOX-A1R da coleção de isolados de <i>Xanthomonas</i> de campos de cultivo de cebola do cerrado brasileiro e suas respectivas culturas de origem. IBSBF: isolado referência brasileiro de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i> , (IBSBF 1770). XP: <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> . M: marcador 1 Kb Plus da Invitrogen. N: controle negativo.....	32
Figura 5. Árvore filogenética por inferência Bayesiana a partir das sequências concatenadas dos genes <i>fyuA</i> , <i>rpoD</i> , <i>gyrB</i> e <i>dnaK</i> de 73 isolados de <i>Xanthomonas</i> com 2 milhões de gerações. modelo GTR+G+I e <i>Xanthomonas translucens</i> ICMP11055 como <i>outgroup</i>	35
Figura 6. . Árvore filogenética baseada no conteúdo gênico dos genomas completos de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	38
Figura 7. Proporções relativas de diferentes grupos gênicos de seis genomas de isolados de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	39
Figura 8. Matriz de presença e ausência de efetores analisados em um total de doze genomas de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> , sendo que dentre esses, cinco correspondem aos isolados bacterianos de cebola sequenciados. Vermelho: indica ausência. Azul: indica presença	41
Figura 9. Produtos da PCR da coleção de isolados oriundos de campos de cultivo de cebola do cerrado brasileiro utilizando os primers copAF e copAR para amplificação do gene copA que confere insensibilidade ao cobre em bactérias fitopatogênicas. M: marcador 1 Kb Kasvi, fragmento gerado de 870 bp. N: controle negativo. P89: isolado de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> sensível ao cobre. P120: isolado de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> insensível ao cobre. IBSFB: isolado referência IBSBF 1770, brasileiro de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i> . XP: <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	42

RESUMO GERAL

FERREIRA, Luciellen da Costa. **Diversidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, agente causal da queima bacteriana em cebola no cerrado brasileiro** 2021. 85p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma hortaliça pertencente à família Amaryllidaceae, cujo cultivo é disseminado mundialmente. No Brasil é a terceira hortaliça mais produzida, após o tomate e batata. Um surto de queima bacteriana em campos de cebola nos estados de Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal, todos em áreas do bioma Cerrado, ocorreu entre os anos 2018 e 2019, e bactérias do gênero *Xanthomonas* foram isoladas das amostras coletadas. O objetivo desse estudo foi identificar e caracterizar os isolados oriundos de plantas de cebola, e das invasoras leiteira, caruru e da cultura da soja presentes em campos previamente cultivados com cebola. Os métodos usados foram: PCR-específica, análise da diversidade em uma coleção de 36 isolados por BOX-PCR e *Multilocus sequence analysis* (MLSA) de quatro genes *housekeeping*: *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* e *rpoD*, sequenciamento genômico completo de isolados representativos da coleção e detecção de genes associados a resistência ao cobre. A análise por BOX-PCR dos isolados de *Xanthomonas* provenientes de campos de cebola, evidenciou elevada diversidade, com oito haplótipos identificados, correlacionados com cultivares específicas de cebola, sendo especulado que cada isolado/ haplótipo pode ter tido sua introdução associada às sementes dessas cultivares. O MLSA revelou que os isolados pertencem à espécie *Xanthomonas euvesicatoria* e foram filogeneticamente próximos a bactérias originalmente de *Allium* spp. de diversas regiões do mundo. Na árvore filogenética os isolados foram separados em quatro diferentes clados, indicando novamente uma alta diversidade na coleção. O sequenciamento genômico de cinco isolados representativos da diversidade haplotípica da coleção revelou ausência de plasmídeos, e dados gerais similares aos previamente descritos para o gênero. Nenhum dos isolados apresentou genes relacionados à resistência ao cobre (*cop*) sendo uma possibilidade o controle do patógeno com esse produto químico. A análise de efetores revelou um conjunto de mais de 27 efetores do sistema de secreção tipo III (T3SS) presentes nos isolados sequenciados, podendo explicar a capacidade de infectar a cebola e demais hospedeiras.

Palavras-chave: *Allium cepa*, BOX-PCR, MLSA, sequenciamento

Orientador - Dr. Maurício Rossato - Universidade de Brasília

GENERAL ABSTRACT

FERREIRA, Luciellen da Costa. **Diversity of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, causal agent of bacterial blight in onion in the brazilian cerrado** 2021. 85p. Dissertation (Master in Plant Pathology) - Universidade de Brasilia, Brasilia, DF, Brazil.

Onion (*Allium cepa* L.) is a vegetable from the Amaryllidaceae family, being produced all over the world, this crop is the third most produced vegetable in Brazil. A recent outbreak of bacterial blight in onion fields from central Brazil, specifically on the Cerrado biome, during the years of 2018 and 2019 was identified and bacterial isolates were acquired. The goal of this study was to identify and characterize 36 bacterial isolates from plants of onion, soy, *Euphorbia heterophylla* and *Amaranthus* sp. from onion fields. Onion isolates were characterized by using PCR with primers XgumF7/R7, BOX-PCR, multilocus sequence analysis with four housekeeping genes, *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* and *rpoD* and whole genomic sequencing. Lastly, isolates were evaluated for the presence of copper-resistance genes. BOX-PCR resulted in a high diversity profile among isolates with eight haplotypes detected. Each strain presented a correlation with onion cultivars, highlighting the hypothesis of the introduction of each strain by specific cultivars. MLSA revealed that all isolates are *Xanthomonas euvesicatoria* and are phylogenetically close to bacterial isolates from *Allium* spp. from different world regions. The onion isolates clustered among four different clades in the phylogenetic tree, confirming the high genetic diversity showed previously on the BOX-PCR. The genomic sequencing of five representative isolates revealed the absence of plasmids and other data similar to other *Xanthomonas* genomic sequences. None of the isolates have copper-resistance related genes, being a possibility the control of this disease with copper-based fungicides. The type three secretion system effectors study showed a set of more than 27 effectors present on all sequenced isolates, with the probable reason for the host range within this variant.

Keywords: *Allium cepa*, BOX-PCR, MLSA, sequencing

Master's advisor - Dr. Maurício Rossato - Universidade de Brasília

INTRODUÇÃO

A queima bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* (Kadota et al. 2000) Constantin et al. 2016, é considerada uma doença emergente que ameaça a produção mundial de cebola (*Allium cepa*), cultura essa que tem sua importância como a terceira hortaliça mais produzida no mundo (FAO, 2013). No Brasil, é uma hortaliça amplamente cultivada no território nacional, com destaque para o estado de Santa Catarina como o maior produtor do país, e o município de Ituporanga com a maior produção de cebola do estado (CEPEA, 2020).

O primeiro relato da queima bacteriana da cebola foi por Alvares et al. (1978) no Havaí. Já no Brasil, seu primeiro relato se deu no estado de São Paulo, publicado por Rodrigues Neto et al. (1987). Em 2013, em Minas Gerais, foi identificada a primeira ocorrência da queima bacteriana no estado, onde sintomas típicos da doença foram detectados em híbridos de cebola cultivados sob sistema de irrigação (Pereira e Tebaldi, 2013). Entre 2018 e 2019 em três regiões do cerrado brasileiro, Cristalina GO, Cabeceira-Grande MG e PAD DF, correspondentes aos estados do Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal respectivamente, a queima bacteriana teve sua primeira ocorrência detectada em campos de cultivo de cebola (Comunicação Pessoal - Quezado-Duval AM).

Segundo dados do CABI (2019), a queima bacteriana da cebola está distribuída mundialmente nas principais regiões produtoras da hortaliça, no entanto, *X. euvesicatoria* pv. *allii* está inserida na lista A1 de patógenos da Organização Europeia e Mediterrânea de Proteção de Plantas (EPPO), ou seja, como um patógeno ausente para essa região (EPPO, 2020).

Alguns estudos baseados em marcadores moleculares rep-PCR (BOX, ERIC, REP), AFLP e RFLP evidenciaram uma grande diversidade presente em *X. euvesicatoria* pv. *allii*, sendo considerada espécie que apresenta uma baixa especificidade ao hospedeiro comparado a outros patógenos de *Xanthomonas* (Gent et al. 2003; Gent et al. 2005; Picard et al. 2008; Gagnevin et al. 2014). Há apenas uma sequência genômica completa de *X. euvesicatoria* pv. *allii* disponível no GenBank que corresponde ao isolado CFBP 6369, oriundo das Ilhas

Reunião, França. A disponibilidade dessa sequência é extremamente relevante para estudos genômicos relacionados à diversidade desse patógeno, assim como a sua patogenicidade e peculiaridades inerentes ao seu conteúdo gênico (Gagnevin et al. 2014).

Além da cebola, outras hospedeiras do gênero *Allium* podem ser infectadas por *X. euvesicatoria* pv. *allii* como cebolinha (*A. fistulosum*), chalota (*A. oschaninii*), alho-poró (*A. porrum*) e alho (*A. sativum*) (Kadota et al. 2000; Roumagnac, 2004). Há relatos de isolados capazes de sobreviver de forma epifítica em leguminosas e até mesmo em plantas daninhas, além de serem capazes de causar sintomas em espécies de *Citrus* em testes de casa de vegetação (Gente et al. 2005). Na cultura da cebola, a bactéria causa lesões encharcadas a cloróticas nas folhas, mas não induz sintomas nos bulbos (EPPO, 2016; Robène et al. 2015), porém, indiretamente, as lesões nas folhas podem levar a perdas no rendimento dos bulbos (Sanders et al. 2003).

A principal forma de disseminação de *X. euvesicatoria* pv. *allii* é pelas sementes, o que facilita a sua introdução em novas áreas (Roumagnac et al. 2000). Na presença de *X. euvesicatoria* pv. *allii* no cultivo de cebola, as medidas de controle comumente utilizadas são baseadas na aplicação de bactericidas à base de cobre combinados aos fungicidas etilenobisditiocarbamato (Gent e Schwartz, 2005). Algumas medidas de controle alternativas como o controle biológico com bacteriófagos e diferentes espécies de bactérias antagonistas foram desenvolvidos, porém, sem resultados satisfatórios em comparação com os métodos convencionais baseados na aplicação de bactericidas cúpricos (Gent e Schwartz, 2005; Lang et al. 2007).

O uso de cobre no controle de doenças bacterianas é comum, porém, as aplicações sucessivas a longo prazo podem induzir o surgimento de isolados resistentes (Sundin et al. 1989). A resistência ou insensibilidade ao cobre já foi relatada em diversas espécies de *Xanthomonas*, sendo considerado um risco para a produção agrícola já que dificulta a realização

de um controle eficiente (Canteros et al. 2008; Behlau et al. 2011; Richard et al. 2016; Richard et al. 2017).

Objetivos gerais

Caracterizar o agente causal da queima bacteriana da cebola, responsável pelos recentes surtos da doença no Brasil, quanto a diversidade genética e sensibilidade ao cobre.

Objetivos específicos

- Identificar os isolados obtidos de cebola de campos de cultivo do cerrado brasileiro em nível de gênero e espécie;
- Avaliar a diversidade presente entre os isolados que infectam cebola através do marcador molecular BOX-PCR e *Multilocus sequence analysis* (MLSA);
- Selecionar haplótipos para representar a diversidade dos isolados da coleção;
- Sequenciar o genoma completo de haplótipos representativos da coleção de bactérias da cebola;
- Comparar os genomas sequenciados dos haplótipos;
- Verificar a presença de genes associados à resistência ao cobre nos genomas sequenciados e detectar a presença de genes relacionados à resistência ao cobre na coleção de isolados pelo uso de PCR (*Polymerase chain reaction*) com *primers* específicos

1. REVISÃO DE LITERATURA

A cultura da cebola (*Allium cepa*)

A cebola, *Allium cepa* L., pertence à família Amaryllidaceae que é constituída por cerca de 75 gêneros botânicos (Christenhusz e Byng, 2016). O gênero *Allium* abrange cerca de 800 espécies de monocotiledôneas que produzem bulbos no solo e está presente em diferentes regiões do mundo. Essas espécies de *Allium* se encontram, em sua maioria, distribuídas no hemisfério norte (Wheeler et al. 2013; Sabiu et al. 2019; Jimenez et al. 2020). O provável centro de origem e domesticação do gênero *Allium* é a Ásia e como segundo centro de domesticação e diversidade, a América do Norte (Choi e Oh, 2011; Jimenez et al. 2020).

A cebola é uma das hortaliças mais consumidas e cultivadas no mundo, com grande relevância para o mercado nacional e internacional (Teshika et al. 2019). Um alimento essencial no preparo de diferentes pratos, a cebola é principalmente consumida *in natura*, na forma de salada, mas também como condimento no preparo de sopas, guisados e molhos (Adeoti et al. 2021). Cerca de 66% da produção mundial de cebola concentra-se no continente asiático com destaque para a China e a Índia, que são os maiores produtores mundiais. O Brasil encontra-se entre os 10 maiores produtores com uma produção total de 1.556.885 toneladas de cebola em 2019 (FAO, 2021).

Do ponto de vista socioeconômico a cebola ocupa a terceira posição entre as hortaliças mais produzidas no Brasil, ficando atrás apenas da cultura da batata e tomate (DERAL, 2018). O plantio de cebola nas principais regiões produtoras do país em sua maior parte está associado à agricultura familiar, sendo uma importante fonte de renda para pequenos produtores, que geram empregos temporários nos períodos mais críticos da produção (plantio e colheita) (Coopercitrus, 2021).

O estado de Santa Catarina é o maior produtor de cebola do país, responsável por cerca de 30% da produção nacional da cultura, concentrada no Vale do Itajaí, com destaque para o

município de Ituporanga como maior produtor de cebola do estado (CEPEA, 2020). Segundo dados da EPAGRI (2018), estima-se que a produção de cebola seja fonte de renda de para mais de oito mil famílias na região do Vale do Itajaí. Além de Santa Catarina, também se destacam na produção de cebola do país os estados da Bahia, Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Paraná e Rio Grande do Sul (DERAL, 2020)

Em 2017, o estado da Bahia passou a ocupar o segundo lugar no ranking nacional de produção de cebola, ultrapassando a produção de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. O Nordeste do país produz mais de 300.000 toneladas da hortaliça por ano, com destaque para a região produtora do Vale do São Francisco na Bahia e Pernambuco (IBGE, 2020). No estado de Goiás, o município de Cristalina, constituinte da RIDE-DF (Região Integrada de Desenvolvimento do Distrito Federal e Entorno), é o maior produtor de cebola do Centro-Oeste. Em 2019, a RIDE-DF produziu cerca de 174.433 toneladas de cebola, o que corresponde à 11,20 % da produção de cebola do país (CONAB, 2021).

Na cultura da cebola, sintomas causados por diferentes pragas e doenças podem apresentar semelhanças e tendem a ser confundidos com causas abióticas como fitotoxidez, deficiência hídrica e nutricional. Diagnósticos incorretos desencadeiam em muitos casos a aplicação de defensivos agrícolas em situações que não seria necessário tal manejo (Wordell e Boff, 2006).

A deficiência hídrica é o fator abiótico de maior relevância para o cultivo de cebola podendo levar a grandes perdas na produção, pois, a cebola é mais suscetível ao estresse provocado por seca do que outras culturas (Marouelli et al. 2005; Tosta et al. 2014). Na ocorrência de deficiência hídrica, o sintoma observado nas plantas é a necrose do ápice das folhas também conhecido como seca dos ponteiros (Wordell e Boff, 2006). Nessa situação, os sintomas são em decorrência de um distúrbio fisiológico causado por um fator abiótico, porém, tal fator pode predispor a planta ao ataque de pragas e patógenos (Carvalho Bispo et al. 2018)

Há diversas pragas que acometem a cultura da cebola que causam sérios prejuízos, como a lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), mosca-da-cebola (*Delia* spp.) e mosca-minadora (*Liriomyza* spp.) (Soumia et al. 2017). Atualmente uma das pragas mais importantes para a produção brasileira e mundial de cebola é o inseto da ordem Thysanoptera conhecido como tripes (*Thrips tabaci*) (Gonçalves et al. 2018). O tripes é responsável por causar lesões esbranquiçadas, seca dos ponteiros e enrolamento foliar, afetando o desenvolvimento dos bulbos levando a perdas significativas de produtividade (Gonçalves, 2006).

Diversos agentes fitopatogênicos acometem a cultura da cebola causando doenças diante a ocorrência de interações ambientais com cultivares que sejam suscetíveis a tais microrganismos (Etana et al. 2019). Entre os principais patógenos fúngicos que acometem a cultura da cebola pode-se destacar a *Alternaria porri*, agente causal da mancha púrpura, doença foliar altamente destrutiva que pode causar perdas de até 97% no rendimento da produção de bulbos de cebola (Nanda et al, 2016; DAR et al. 2020). Outra doença fúngica é a antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. Essa doença leva a perdas consideráveis na produção e comercialização de bulbos e sementes, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Lopes et al. 2021). O fungo *Sclerotium cepivorum*, agente causal da podridão branca, é de difícil controle e pode levar a perdas de até 100% na cultura (Steenjtes et al. 2021). Descrita há quase um século, a queima das pontas causada por *Botrytis squamosa* é muito comum em campos de produção de cebola no mundo (Carisse et al. 2011; Araújo et al. 2018; Tanovic et al. 2019). A doença conhecida como raiz rosada é transmitida pelo solo e tem como agente causal o fungo biotrófico *Pyrenochaeta terrestres* (Orio et al. 2016; Marzu et al. 2018; Rivera-Méndez et al. 2021). O míldio da cebola causado por *Perenospora destructor* é uma doença foliar de grande importância mundial, sendo de ocorrência comum no sul do Brasil, onde se concentra a maior produção de cebola do país (Araújo et al. 2017; Araújo e Resende,

2020). Estima-se que o míldio ocasione perdas de até 75% no rendimento dos bulbos em condições ideais para ocorrência da doença (Develash e Sugha, 1997).

Outros grupos de patógenos também causam doenças na cebola, as duas principais viroses de planta de importância econômica que acometem a cultura da cebola e interferem na sua produção são causadas por *Onion yellow dwarf virus* e *Iris yellow spot virus* pertencentes aos gêneros *Potyvirus* e *Orthospovirus* respectivamente (Manglli et al. 2020). Dos nematoides, *Ditylenchus dipsaci* é o principal causador de danos em cebola, comumente conhecido como o nematoide dos caules e dos bulbos, e possui uma ampla gama de hospedeiros que incluem plantas como alho, alfafa, cenoura, morango, aveia (Poirier et al. 2019). Além da ocorrência do nematoide dos caules e bulbos, *Meloidogyne* spp. ou nematoide das galhas, ocorrem no cultivo de cebola reduzindo o peso e rendimento de bulbos em até 70% (Mishra et al. 2014; Faruk, 2019; Okechalu et al. 2020).

Entre as bactérias fitopatogênicas que afetam a cultura da cebola estão as que causam sintomas de podridões nos bulbos, como as espécies *Burkholderia cepacia*, *B. gladioli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pantoea ananatis*, *Klebsiella* sp., e *Enterobacter* sp., causadoras da podridão de escamas da cebola, sendo que as três últimas ainda não foram relatadas no Brasil infectando a cebola (Zaid et al. 2012; Abd-Alla e Bashandy, 2012; Stoyanova et al. 2012; Leach et al. 2020). O complexo de espécies bacterianas que causam a podridão de escamas em cebola pode ocasionar perdas de até 50% na produção (Wordell Filho e Boff, 2006). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causa podridão mole em diversas espécies de hortaliças incluindo bulbos de cebola (Beriam, 2007; Marconatto et al. 2017). A espécie *Pseudomonas viridiflava*, além de causar a podridão em bulbos de cebola, também provoca sintomas foliares com aspecto de riscas ou estrias e encontra-se distribuída em diversas regiões do mundo incluindo o Brasil (Zaid et al. 2012; Marconatto et al. 2017; Lipps e Samac, 2021).

A queima foliar de cebola causada pela bactéria *X. euvesicatoria* pv. *allii* é uma doença emergente, que causa perdas significativas na produção de cebola (Schwartz e Otto, 2000; Nunez et al. 2002; Robène et al. 2015). Apesar de seus sintomas serem localizados na região foliar, indiretamente afeta o rendimento de bulbos por reduzir a área fotossintética (Sanders et al. 2003). Com o primeiro relato no Havaí (Alvarez et al. 1978), desde então vem se disseminando em diversas áreas de cultivo de cebola do mundo. No Brasil foi relatada pela primeira vez infectando campos de cebola em São Paulo (Neto et al. 1987), posteriormente em Minas Gerais (Pereira e Tebaldi, 2013) e entre os anos de 2018 e 2019 nas regiões de Cristalina GO, Cabeceira-Grande MG e PAD DF (Comunicação Pessoal - Quezado-Duval AM).

Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii

Xanthomonas euvesicatoria pv. *allii* (Kadota et al. 2000) Constantin et al. 2016 é uma bactéria fitopatogênica gram-negativa, aeróbia obrigatória, bastonetiforme, de metabolismo oxidativo, catalase positiva, apresentando colônias de aspecto mucóide, lisas, circulares, convexas e de cor amarela (Kadota et al. 2000; Roumagnac et al. 2004). Pertence à classe Gammaproteobacteria e possui como sinônimos heterotípicos *Xanthomonas campestris* pv. *allii* Kadota et al. 2000 e *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (Kadota et al. 2000) Roumagnac et al. 2004.

A primeira descrição da bactéria como pertencente ao gênero *Xanthomonas* foi feito por Alvarez et al. (1978) no Havaí. *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* foi inicialmente classificada como *X. campestris* pv. *allii* por Kadota et al. (2000), isolada de plantas de cebola galesa (*Allium fistulosum*) no Japão, com base em suas características bioquímicas, fisiológicas e em testes de gama de hospedeira. Em 2004, Roumagnac et al., com base em uma caracterização polifásica utilizando técnicas moleculares de *DNA–DNA hybridization* e FAFLP analysis (*Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis*), além dos estudos bioquímicos e fenotípicos, reclassificou a espécie como *X. axonopodis* pv. *allii*, definindo como

pertencente ao grupo rep-PCR 9.2 de *X. axonopodis*. A última reclassificação da espécie foi proposta por Constantin et al. (2016) que empregou técnicas moleculares de MLSA (*Multilocus sequence analysis*), *DNA–DNA hybridization* e sequenciamento genômico que permitiram reclassificar a espécie dentro do grupo II do gênero *Xanthomonas* e na espécie *X. euvesicatoria* pv *allii*.

Xanthomonas euvesicatoria pv. *allii* já foi relatada infectando diferentes espécies do gênero *Allium* além da cebola, como alho (*A. sativum*), cebola galesa (*A. fistulosum*) e chalota (*A. oschaninii*) em condições de campo (Kadota et al. 2000; Roumagnac et al. 2004). Em condições de casa de vegetação, *X. euvesicatoria* pv. *allii* foi capaz de induzir sintomas em espécies de *Citrus* similares aos ocasionados por *X. axonopodis* pv. *citrumelo*, causadora da mancha bacteriana dos citros, porém, em condições de campo não há indícios de ocorrência em *Citrus* (Gente et al. 2005). Já se tem relatos da sobrevivência epifítica de *X. euvesicatoria* pv. *allii* em leguminosas, no feijão, alfafa, grão de bico, lentilha e soja, em condições de casa de vegetação, porém, em condições de campo isolados de *X. euvesicatoria* pv. *allii* não foram recuperadas de soja e grão de bico (Gent et al. 2005). Há também relato da sobrevivência em plantas daninhas de forma assintomática (Gente et al. 2005). A bactéria encontra-se distribuída na Ásia, África, América do Norte, América Central, Caribe e América do Sul, nos principais países que cultivam a cebola (CABI, 2019).

Atualmente *X. euvesicatoria* pv. *allii* contém apenas uma sequência genômica completa (NCBI, 2021). O tamanho do genoma de *X. euvesicatoria* pv. *allii* é 5.425.942 bp com um conteúdo G + C de 64,4%, apresentando semelhanças com o conteúdo gênico de outras espécies de *Xanthomonas*. Apresenta regiões típicas encontradas em *Xanthomonas*, como o sistema de secreção do tipo III (TTSS) e cerca de 22 genes efetores do tipo III (Gagnevin et al. 2014).

Os isolados de *X. euvesicatoria* pv. *allii* possuem considerável diversidade genética e são menos específicos em relação ao hospedeiro do que habitualmente se espera de uma patovar

de *Xanthomonas* (Gent et al. 2005; Gagnevin et al. 2014). Gent et al. (2003) identificaram uma grande diversidade genética em *X. euvesicatoria* pv. *allii* com base em estudos de caracterização polifásica e utilizando de marcadores rep-PCR (BOX, ERIC e REP). Picard et al. (2008) também baseado na mesma metodologia, identificaram uma grande diversidade entre isolados de duas ilhas do arquipélago Mascarenhas, relatando a ocorrência de dois grupos a partir de análises AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) e RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Em um estudo anterior, Gent et al. (2005), constataram por marcadores moleculares rep-PCR, a proximidade genética entre isolados de *X. euvesicatoria* pv. *allii* e *X. axonopodis* pv. *citrumelo*, especulando serem originados de um ancestral comum.

A queima bacteriana causada por *X. euvesicatoria* pv. *allii* é uma doença em expansão no mundo, levando a ocorrência de surtos em diversos países produtores, fato esse que traz preocupações para a produção da hortaliça e se fazem necessários mais estudos sobre esse agente etiológico (Robène et al. 2015). A queima bacteriana pode causar perdas de 10 a 50% no rendimento de bulbos, apesar de não causar sintomas nos mesmos, porém, interfere na taxa fotossintética e assimilação de nutrientes para a planta devido à infecção foliar (Schwartz e Otto, 2000; Nunez et al. 2002). Devido ao risco para a produção de cebola, desde 2009 a bactéria é considerada como praga quarentenária ausente (A1) pela Organização de Proteção de Plantas Europeia e Mediterrânea (EPPO) (EPPO, 2020).

Os sintomas típicos da queima bacteriana causada por *X. euvesicatoria* pv. *allii* em cebola iniciam nas folhas mais velhas, causando pequenas lesões cloróticas que se expandem na área foliar e são circundadas por um halo encharcado, conforme a infecção progride as lesões passam a ser alongadas e necróticas, em condições severas pode levar a morte das folhas e indiretamente leva à redução do tamanho dos bulbos, afetando a produtividade (Nunez et al. 2002; Picard et al. 2008). As condições ideais para o desenvolvimento da doença são regiões de clima quente e úmido com temperaturas de 28 a 35 °C (Schwartz et al. 2003; Humeau et al.

2006). Os sintomas podem ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento de cultivares de dias curtos, enquanto em cultivares de dias longos os sintomas se desenvolvem durante ou após o início da bulbificação (EPPO, 2016).

A principal via de transmissão da queima bacteriana é através de sementes de cebola contaminadas pelo patógeno, o que pode explicar o fato da sua rápida disseminação mundial (Roumagnac et al. 2000). Há também relatos de outras fontes de inóculo da bactéria como plantas invasoras, água de irrigação, restos de cultura e outras culturas utilizadas em rotação de com a cebola (Gent et al. 2005). Em um estudo de Roumagnac et al. (2004), um lote de sementes como fonte de inóculo primário com uma taxa de contaminação de 4/10.000 demonstrou ser eficiente para desenvolver um surto da queima bacteriana em condições de campo numa estação fria de uma ilha tropical.

Desde a constatação de que a via de disseminação da queima bacteriana em cebola é por sementes, estudos baseados em PCR (*Polymerase chain reaction*) vêm sendo executados para tornar a detecção do patógeno em lotes de sementes contaminadas mais eficiente. Robène-Soustrade et al. (2010) através da técnica de Multiplex Nested PCR, realizaram a amplificação de dois genes específicos presentes no genoma de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, o que resultou na detecção da bactéria em lotes de sementes com taxas de contaminação de 5×10^2 UFC g⁻¹, o ensaio Multiplex Nested PCR apresentou uma sensibilidade na detecção de 1 semente infectada em 27.340 sementes. Robené et al. (2015) descreveram um ensaio de PCR em tempo real e conseguiu detectar a presença de todos os isolados de *X. euvesicatoria* pv. *allii* testadas, sendo que a técnica apresentou um limite de detecção de 1 semente infectada em 32.790 sementes. Esses resultados são promissores e de grande importância para facilitar a detecção e garantir que lotes de sementes comerciais não estejam contaminados, evitando a disseminação desse importante patógeno da cultura da cebola.

A principal forma de controle da queima bacteriana de cebola causada por *X. euvesicatoria* pv. *allii* é a aplicação de bactericidas a base de cobre combinados com fungicidas de etilenobisditiocarbamato. Este é um método amplamente utilizado nos Estados Unidos, apesar de ser um manejo de elevado custo e ambientalmente danoso (Gent e Schwartz, 2005). O manejo integrado também pode ser uma opção utilizando a rotação de culturas e o controle biológico, porém muitas vezes não são tão efetivos como o controle convencional, visto que ainda não se conhece por completo a gama de hospedeiros da bactéria e controles alternativos como o biológico podem não ser tão acessíveis (EPPO, 2016). A rotação de culturas é uma opção, mas deve ser melhor estudada já que a alternância entre cebola e algumas leguminosas pode favorecer a sobrevivência epifítica da bactéria ou, em alguns casos, a bactéria pode ser patogênica a essas culturas (O'Garro e Paulraj, 1997; Gent et al. 2005). A aplicação de um produto formulado contendo isolados bacterianos de *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas fluorescens* para o controle biológico da queima bacteriana em cebola reduziu a severidade dos sintomas, porém, as diferenças não foram significativas (Gent e Schwartz, 2005). Ainda não existem formulações específicas registradas para o controle da queima bacteriana em cebola no Brasil.

Ainda se tem poucos estudos referentes a outras formas de controle viáveis para a queima bacteriana em cebola. Lang et al. (2007) utilizando um ativador de defesa da planta, o acibenzolar-S-metil, e bacteriófagos, mostrou redução de 50% da severidade da doença em campo, o que demonstra ser uma alternativa às aplicações massivas de defensivos a base de cobre. Um estudo recente de Nga et al. (2021) testou a eficácia do uso de bacteriófagos líticos específicos para *X. euvesicatoria* pv. *allii* no controle da queima bacteriana em cebola galesa. A redução da incidência dos sintomas na área foliar na presença dos fagos foi de cerca de 70% em casa de vegetação. Em condições de campo, um dos bacteriófagos levou à redução da incidência dos sintomas igual ao bactericida comercial Starner. Yanti (2015) realizou um estudo

envolvendo a indução de resistência a queima bacteriana causada por *X. euvesicatoria* pv. *allii*, avaliando a introdução de rizobactérias em plantas de chalota (*Allium oschaninii*) o que contribuiu com o aumento da atividade da enzima peroxidase que está envolvida com respostas de defesa da planta. Contudo, seis dias após a inoculação, essa atividade enzimática passou a diminuir continuamente. Até o momento não há cultivares do gênero *Allium* que possuam algum tipo de resistência a *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

Resistência ao cobre em *Xanthomonas*

Produtos à base de cobre são amplamente utilizados no controle de bacterioses em culturas agrícolas, mas o uso contínuo a longo prazo favorece a seleção de isolados bacterianos insensíveis ao elemento químico, o que inviabiliza o controle eficaz (Sundin et al. 1989). Existem diversos relatos da resistência ao cobre de *Xanthomonas* em diferentes culturas. Em citros, isolados de *X. citri* subsp. *citri* foram descritas inicialmente por Canteros (1999) apresentando insensibilidade ao cobre. Recentemente nas Ilhas Reunião e Martinica (Richard et al. 2016; Richard et al. 2017) também foram relatados isolados de *X. citri* subsp. *citri* insensíveis. Em viveiros produtores de citros na Flórida (EUA) também já foi descrito a insensibilidade ao cobre presente em isolados de *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Behlau et al. 2011). Foi relatado que aproximadamente 100% dos isolados de *X. perforans* causadora da mancha bacteriana em tomateiro na Flórida isoladas de campos comerciais apresentam algum grau de resistência ao cobre (Horvarth et al. 2012).

A resistência ao cobre em bactérias fitopatogênicas está ligada a presença do *operon copABCD*. Descrito inicialmente em *Pseudomonas syringae*, esse *operon* codifica as proteínas Cop A, B, C e D, que conferem a insensibilidade aos compostos cúpricos, e geralmente encontra-se no plasmídeo (Mellano e Cooksey, 1988; Cha e Cooksey, 1991). Apesar de, em sua maioria os genes de resistência ao cobre em bactérias fitopatogênicas sejam de origem

plasmidial, já existem relatos de genes de resistência cromossômicos (Lee et al. 1994; Basim et al. 2005). Segundo Mellano e Cooksey (1988), a insensibilidade ao cobre em bactérias é atribuída a diversos genes geralmente organizados em *operons*, com isso, é improvável que ocorra uma mutação espontânea que induza resistência ao cobre em populações bacterianas. A conjugação é o principal mecanismo de transferência horizontal de genes que dissemina a resistência ao cobre em bactérias, demonstrado em um estudo de Behlau et al. (2013) em *X. citri* subsp. *citri* e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*. Em *Xanthomonas*, além do *operon copABCD*, já foi relatada a presença do *operon copLAB*, onde o gene *copL* tem como função a regulação da expressão de *copA* e *copB* que codificam proteínas de resistência ao cobre (Voloudakis et al. 2005; Behlau et al. 2011).

Os genes de resistência ao cobre já foram caracterizados e clonados em *X. arboricola* pv. *juglandis*, *X. vesicatoria* e *X. euvesicatoria* pv. *vesicatoria* (Lee et al. 1994; Basim et al. 2005; Voloudakis et al. 2005). Em *X. arboricola* pv. *juglandis* os genes de insensibilidade ao cobre estão presentes no cromossomo e possuem a mesma conformação do *operon copABCD* de *Pseudomonas syringae*, diferindo apenas no tamanho do gene e em algumas regiões da sequência de DNA (Lee et al. 1994). Os genes de resistência a cobre contidos no plasmídeo de *X. vesicatoria* também se assemelham ao *operon cop* de *P. syringae* (Voloudakis et al. 1993). A organização dos genes de resistência ao cobre em *X. vesicatoria*, quando ocorre no cromossomo, difere de quando presente no plasmídeo, sendo mais rara para a espécie (Basim et al. 2005). Na espécie *X. euvesicatoria* pv. *vesicatoria* foi verificado que a transmissão dos genes de resistência ao cobre ocorre via plasmídeos e a regulação da expressão desses genes é regulada pelo *operon copL* (Voloudakis et al. 2005). Em *X. euvesicatoria* pv. *vesicatoria* foi identificado no cromossomo de um único isolado genes homólogos ao *operon* regulador *copRS* de *P. syringae* (Basim et al. 2005).

Além dos genes que conferem resistência ao cobre em bactérias também foram relatados genes que induzem níveis de tolerância ao cobre denominados genes *coh*. Esses genes estão envolvidos com a homeostase do cobre, mantendo o equilíbrio da quantidade de cobre presente no interior da célula bacteriana (Arguello et al. 2013). Isolados que apresentam esses genes não são considerados sensíveis, pois, toleram doses consideráveis de cobre e não são considerados efetivamente resistentes já que não possuem os genes *cop* (Marin et al. 2019).

Diversidade genética de *Xanthomonas*

Com o passar dos anos, estudos taxonômicos e de diversidade em *Xanthomonas* vêm se aprimorando, ao incorporar técnicas moleculares baseadas em genômica e filogenia, junto a métodos tradicionais como a caracterização fenotípica (Vauterin et al. 1995; Vauterin e Swings 1997; Constantin et al. 2016). O gênero *Xanthomonas* reúne um dos maiores grupos de bactérias descritos através de estudos de homologia DNA-DNA e *fingerprinting* genômico, sendo que o valor de reassociação DNA-DNA aceito internacionalmente para considerar que dois organismos pertençam a mesma espécie deve ser igual ou superior a 70%. Porém, os métodos de hibridação DNA-DNA são mais complexos e onerosos o que inviabiliza a análise de um número elevado de isolados e dificulta os estudos de diversidade de isolados bacterianos (Wayne et al. 1987; Rademaker et al. 2000).

Com a utilização de diferentes marcadores moleculares que geram *fingerprinting* genômicos (RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), RAPD (*random amplified polymorphic*), e ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*), REP e BOX-PCR) para elucidar as relações entre isolados, foi possível melhorar a precisão e agilidade dos estudos envolvendo a diversidade de *Xanthomonas* (Restrepo et al. 2000; Ogunjobi et al. 2010; Arshiya et al. 2014; Asgarani et al. 2015).

Restrepo et al. (2000) utilizando de análises baseadas em rep-PCR, AFLP e RFLP encontraram uma grande diversidade entre 238 isolados de *X. phaseoli* pv. *manihotis* na Colômbia e evidenciaram que o AFLP demonstrou ser mais robusto para as análises em comparação com o RFLP. Para *X. phaseoli* pv. *manihotis* da Nigéria foram aplicadas as técnicas RAPD e AFLP para avaliar a variabilidade genética entre isolados, ambas as análises separaram os isolados em quatro clados distintos, evidenciando serem métodos confiáveis e que se complementam no estudo da diversidade (Ogunjobi et al. 2010). Um estudo demonstrou que o método de ERIC-PCR é eficiente para avaliar a diversidade em espécies de *Xanthomonas* de acordo com a capacidade de isolados produzirem ou não a goma xantana, um exopolissacarídeo produzido pelo gênero e utilizado principalmente na indústria alimentícia (Asgarani et al. 2015). Mahuku et al. (2006) utilizando a técnica de REP-PCR evidenciaram um alto nível de distância genética entre *X. citri* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans* ambas patogênicas ao feijoeiro. Arshiya et al. (2014) avaliando isolados de *X. citri* pv. *citri* utilizando marcadores moleculares do tipo REP, BOX e ERIC encontraram uma grande diversidade genética entre os isolados, o BOX-PCR revelou mais bandas polimórficas que os demais marcadores, sendo que tanto o REP quanto o ERIC foram menos eficientes para a análise de diversidade em *X. citri* pv. *citri*.

Em *X. euvesicatoria* pv. *allii* estudos utilizando marcadores moleculares foram realizados evidenciando a diversidade entre isolados da espécie, como Gent et al. (2003) utilizando marcadores rep-PCR (BOX, ERIC e REP), Picard et al. (2008) que relataram uma grande diversidade entre isolados de *X. euvesicatoria* pv. *allii* de duas ilhas do arquipélago Mascarenhas, com o uso de marcadores AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) e RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e Gent et al. (2005) que evidenciaram por meio de rep-PCR a proximidade genética entre isolados de *X. euvesicatoria* pv. *allii* e *X. axonopodis* pv. *citrumelo*.

No geral a análise de um único gene não é suficiente para avaliar a diversidade em uma população bacteriana e elucidar questões filogenéticas a nível de espécie, assim, no intuito de aperfeiçoar o estudo da filogenia de bactérias surgiram as pesquisas baseadas na análise de múltiplos genes (Rodriguez et al. 2012). Young et al. (2008) utilizando da análise de MLSA (*multilocus sequence analysis*) e sequenciamento de quatro genes *housekeeping* (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* e *rpoD*), evidenciaram dois diferentes grupos entre espécies do gênero *Xanthomonas*. Young et al. (2010) utilizando os mesmos quatro genes *housekeeping* identificaram uma grande diversidade em isolados de *Xanthomonas* da Nova Zelândia e propôs uma nova espécie *X. dyei*. Já Ntambo et al. (2019) utilizaram cinco genes *atpD*, *glnA*, *gyrB*, *abc* e *rpoD* avaliando a filogenia de *X. albilineans* evidenciando a diversidade entre isolados da espécie. Um estudo de MLSA revelou um alto nível de diversidade genética em função da recombinação e retenção de mutações pontuais em *X. campestris* (Fargier et al. 2011). Baseado em análises de hibridação DNA-DNA, ANI (average nucleotide identity) e MLSA, Constantin et al. (2016) reavaliou a taxonomia de *X. axonopodis* e propôs algumas alterações para a espécie, como *X. axonopodis* pv. *allii* que passou a pertencer a espécie *X. euvesicatoria*, já que na filogenia agrupou no clado II de *Xanthomonas*.

Com a crescente disponibilidade de genomas completamente sequenciados, os estudos baseados em genômica comparativa e evolutiva passaram a ser facilitadores para as análises filogenéticas em *Xanthomonas* (Moreira et al. 2010, Rodriguez et al. 2012). Atualmente existem mais de 1.400 genomas de *Xanthomonas* depositados no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), o GenBank (Timilsina et al. 2020). A análise de sequências genômicas para delimitação de espécies têm sido aplicada como um substituto a hibridação DNA-DNA e também ao método ANI (Konstantinidis e Tiedje, 2005). O ANI é uma técnica que faz uso de sequências que podem ser recuperadas de bancos de dados, o valor de ANI para um organismo ser considerado de uma mesma espécie equivale a 95%-96% (Richter

e Rosselló-Móra 2009). Young et al. (2008) realizaram um estudo comparativo entre homologia DNA-DNA e similaridade de sequências genômicas para evidenciar clados e espécies em *Xanthomonas*. Moreira et al. (2010) sequenciou o genoma de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* comparando com o genoma de *X. citri* subsp. *citri* ambas causadoras do cancro cítrico e evidenciaram diversos genes distintos entre as espécies relacionados principalmente a patogenicidade. Rodriguez et al. (2012) com base em análises filogenômicas propôs que *X. citri* e *X. fuscans* compreendem uma mesma espécie. Assis et al. (2021) em um estudo de genômica comparativa com isolados de *X. arboricola* pv. *juglandis* revelou a atuação de genes ligados a evolução e virulência da espécie intimamente relacionados a diversidade de isolados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Coleção de isolados

A coleção de isolados utilizada nesse estudo foi cedida pela Embrapa Hortaliças e estabelecida a partir de isolamentos de plantas de cebola com sintomas foliares, apresentando lesões cloróticas encharcadas e secas no limbo foliar, com aspecto de queima (Figura 1). Todos os isolados apresentaram características de *Xanthomonas* previamente descritas por Kadota et al. (2000): colônias de coloração amarela, aparência mucoide, lisas e convexas (Figura 2).

Além dos isolados de campos de cultivo de cebola do cerrado brasileiro, das cidades de Cristalina - GO, PAD - DF e Cabeceira Grande - MG (Tabela 1), o isolado de referência IBSBF 1770, originalmente de cebola, da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Instituto Biológico (IBSBF), Campinas, SP, também foi incluído no presente estudo, assim como, isolados das plantas daninhas leiteira (*Euphorbia heterophylla*) e caruru (*Amaranthus* sp.) presentes nos campos de cultivo de cebola, isolados provenientes da cultura da soja de campos onde haviam sido cultivados cebola oito meses antes e dois isolados bacterianos de campos de cebola

externos à regiões do bioma cerrado sendo eles A-2015-1 (Irati - Paraná) e A-2017-1 (Monte Alto - SP) (Tabela 1).



Figura 1. Folhas de cebola (*Allium cepa*) apresentando sintomas de lesões cloróticas encharcadas e secas no limbo foliar (Cabeceira Grande - MG, 2019). Fotos: Alice Maria Quezado Duval

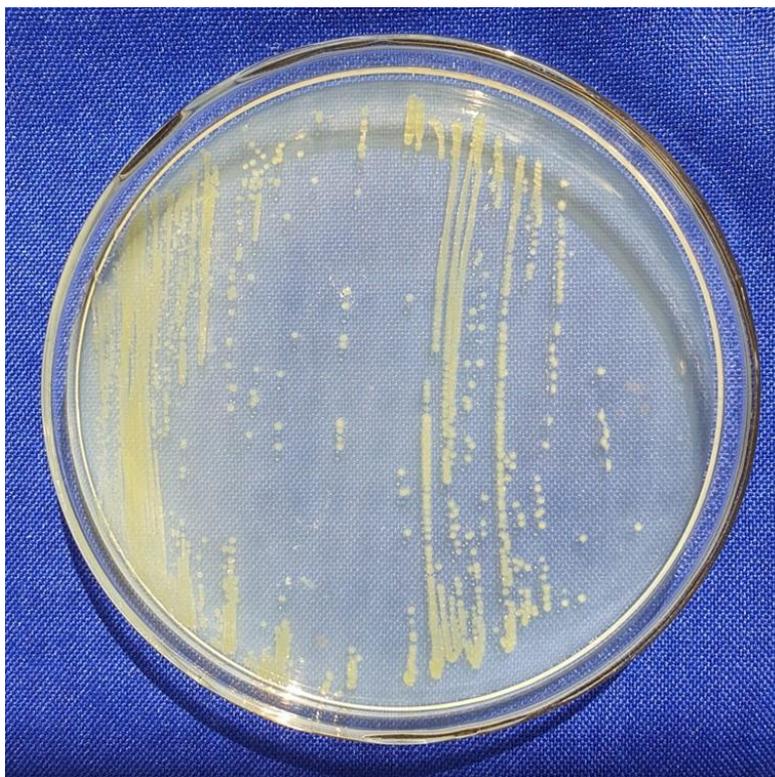


Figura 2. Colônias isoladas a partir de folhas sintomáticas de cebola (*Allium cepa*) em Cabeceira Grande - MG, 2019. Foto: Arquivo pessoal.

Tabela 1. Isolados de *Xanthomonas* utilizados nesse estudo.

Isolado	Origem	Hospedeira/Cultivar
A-2018-01	Cristalina-GO	Cebola/Taila
A-2018-02	Cristalina-GO	Cebola/Taila
A-2018-03	Cristalina-GO	Cebola/Taila
A-2018-04	Cristalina-GO	Cebola/Taila
A-2018-05	Cristalina-GO	Cebola/Taila
A-2018-06	Cristalina-GO	Cebola/Taila
A-2018-07	Cristalina-GO	Cebola/Taila
A-2018-08	PAD-DF	Cebola/Taila
A-2018-09	PAD-DF	Cebola/Taila
A-2018-10	Cristalina-GO	Cebola/Taila
A-2018-11	Cristalina-GO	Cebola/Taila
A-2018-12	Cristalina-GO	Cebola/Taila
A-2018-13	PAD-DF	Cebola/Taila
A-2019-01	Cristalina-GO	Cebola/Andrômeda
A-2019-02	Cristalina-GO	Cebola/Andrômeda
A-2019-03	Cristalina-GO	Cebola/Andrômeda
A-2019-04	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Andrômeda
A-2019-05	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Andrômeda
A-2019-06	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Andrômeda
A-2019-07	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Andrômeda
A-2019-08	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Andrômeda
A-2019-09	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Andrômeda
A-2019-10	Cabeceira Grande-MG	Cebola/H239
A-2019-11	Cabeceira Grande-MG	Leiteira (<i>Euphorbia heterophylla</i>)
A-2019-12	Cabeceira Grande-MG	Leiteira (<i>Euphorbia heterophylla</i>)
A-2019-13	Cabeceira Grande-MG	Leiteira (<i>Euphorbia heterophylla</i>)
A-2019-14	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Irati
A-2019-15	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Irati
A-2019-16	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Irati
A-2019-17	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Irati
A-2019-18	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Irati
A-2019-19	Cabeceira Grande-MG	Caruru (<i>Amaranthus</i> sp)
A-2019-20	Cabeceira Grande-MG	Soja (<i>Glycine max</i>)
A-2019-21	Cabeceira Grande-MG	Soja (<i>Glycine max</i>)
A-2015-1	Irati - Paraná	Cebola
A-2017-1	Monte Alto - SP	Cebola

Isolados pertencentes à coleção de trabalho de Bactérias Fitopatogênicas de Hortaliças da Embrapa Hortaliças, Brasília DF.

Extração de DNA

Todos os isolados usados nos experimentos foram cultivados em meio Nutriente Ágar (NA) e mantidos em câmara de crescimento a uma temperatura de 28°C durante 72 horas. Após este período colônias típicas foram repicadas para novas placas contendo meio NA e submetidas as mesmas condições.

A partir da obtenção de cultura pura bacteriana, as mesmas foram retiradas das placas com o auxílio de uma alça bacteriológica e colocadas em microtubos de 1,5 mL com água ultrapura e armazenados até a extração de DNA. Para remoção de exopolissacarídeos e outros compostos solúveis em água que podem ser prejudiciais para extração de DNA, realizou-se a homogeneização da suspensão por vortex, seguido de centrifugação por cinco minutos a 13.000 rpm (13.000 g) e retirada do sobrenadante. A etapa foi repetida duas vezes e o *pellet* bacteriano remanescente então foi usado na extração de DNA com o Kit Mini Spin (KASVI). A concentração de DNA de todos os isolados foi verificada em um ultraespectrofotômetro de microvolumes NanoVue (Biochrom, EUA) e ajustada para 25 ng/μL.

Para a extração de DNA destinada ao sequenciamento genômico foi utilizado o Kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen, EUA). A qualidade e concentração de DNA dos isolados foram verificadas no aparelho NanoVue.

Identificação dos isolados a nível de gênero por PCR

A confirmação de que os isolados selecionados para o estudo pertenciam ao gênero *Xanthomonas* foi feita pelo método de PCR utilizando os *primers* X-gumD F7 e X-gumD R7 (Adriko et al. 2014), que possuem como alvo o gene *gumD* componente do *operon* responsável pela síntese da goma xantana, exopolissacarídeo presente na maioria das espécies de *Xanthomonas* (Katzen et al. 1998). Todas as reações de PCR desta dissertação utilizaram o kit GoTaq qPCR (Promega, EUA) com amplificação em um termociclador Bio-Rad T100™ (Bio-

Rad Laboratories, EUA). Para a reação foi utilizado 2 μL de DNA de cada um dos isolados, 0,5 μL dos *primers* X-gum F7/R7 (10mM), adicionado 5 μL do kit master mix GoTaq Buffer, 0,2 μL da enzima GoTaq Enzyme, gerando um volume final da reação de 10 μL ao ser completada com 1,8 μL de água ultrapura. O processo de amplificação foi realizado no termociclador devidamente programado para uma desnaturação inicial de 4 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58 °C e 1 min a 72 °C com um passo de extensão final de 6 min a 72 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese a 120V em gel de agarose a 1 %, em tampão de corrida TBE, o marcador utilizado foi o 1 kb (Kasvi, Brasil) com as quantidades recomendadas pelo fabricante. Para coloração do gel foi utilizado Gel Red (Biotium, EUA), sob luz ultravioleta (UV) em transiluminador e fotodocumentação pelo sistema LPIX (Loccus).

BOX - PCR e seleção de haplótipos

A fim de gerar o *fingerprint* dos isolados para avaliar a diversidade genética presente entre os mesmos e possibilitar a seleção de haplótipos foi realizada PCR utilizando o *primer* BOX-A1R (Versalovic et al. 1994). Para o BOX-PCR, além dos isolados oriundos de campos de cultivo de cebola do cerrado brasileiro, também foi utilizado o isolado de referência IBSBF 1770, assim como um isolado de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* que em análises anteriores demonstrou semelhanças com alguns dos isolados coletados em cebola. Em todos os testes, reações livres de DNA foram usadas como controle negativo.

A reação foi composta por 4 μL de DNA de cada um dos isolados (25 ng/ μL), 1 μL do *primer* BOX-A1R (10mM), 5 μL do GoTaq Buffer, 0,2 μL da GoTaq Enzyme, totalizando um volume de reação de 10,2 μL . A amplificação foi realizada em termociclador, programado para uma desnaturação inicial de 7 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C e 8 min a 65 °C com um passo de elongação final de 15 min a 65 °C. A visualização foi

realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando tampão TBE, a reação foi corada com Gel Red, e o marcador utilizado foi o 1 Kb Plus Invitrogen. O gel foi submetido a visualização em um transiluminador e fotodocumentado no software LPIX (Loccus).

O padrão de bandas gerados foi analisado comparando o perfil de cada isolado junto com os isolados de referência IBSBF 1770 e *X. perforans*. A seleção de haplótipos foi realizada pela análise visual do padrão de bandas gerados pelo BOX-PCR e separando em grupos, escolhendo um isolado representativo para cada. Foram realizadas três repetições do BOX-PCR para confirmação dos dados.

Multilocus sequence analysis (MLSA)

Os haplótipos selecionados após BOX-PCR, foram submetidos à MLSA com amplificação dos genes *housekeeping rpoD* (RNA polymerase sigma -70 factor), *fyuA* (TonB - dependent transporter), *gyrB* (Gyrase subunit B) e *dnaK* (Heat shock protein 70) com os *primers* emirpo27F/emirpo12R, emifyuA5F/emifyuA6R, emigrB2F/emigrB3R e emidnaK1F/emidnaK2R respectivamente (Tabela 2) (Fargier et al. 2011).

A reação de PCR para amplificação dos genes *housekeeping*, foi realizada utilizando 8 µl de DNA dos haplótipos (25 ng/µL), 2 µl de cada *primer* (10 mM), 0,8 µl da GoTaq Enzyme, 20 µl do GoTaq Buffer e 7,2 µl de água ultra pura conferindo um volume total de reação de 40 µl. Diferentes temperaturas de anelamento foram usadas, sendo *rpoD* 65 °C, *gyrB* 65 °C, *fyuA* 67,7 °C e *dnaK* 67,7 °C. O termociclador foi programado para um ciclo inicial de 94 °C por 30 s seguido de 35 ciclos de 94 °C por 50 s, temperatura de anelamento variável de acordo com a região e 72 °C por 1 minuto e extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os fragmentos gerados na PCR foram purificados com o kit PureLink PCR Purification Kit, as concentrações e qualidade foram verificadas em gel de agarose 1% coradas com GelRed. As amostras purificadas foram enviadas para sequenciamento na plataforma Sanger na BGI em Hong Kong.

As sequências geradas por Sanger foram analisadas, montadas e corrigidas manualmente no software Geneious Prime 2021 (Kearse et al., 2012). O alinhamento das sequências foi feito pelo algoritmo Clustal Omega (Sievers et al. 2011) dentro do Geneious Prime 2021. As referências usadas nos alinhamentos de cada gene foram retiradas de sequências de genomas completos de espécies e patovares do gênero *Xanthomonas* disponíveis no GenBank (Tabela 3). O alinhamento individual de cada região foi cortado e corrigido manualmente. A escolha de melhor modelo foi realizada no software MEGA X separadamente por cada região. Para a análise MLSA, as sequências foram concatenadas e a análise filogenética realizada pelo método de inferência Bayesiana no *plugin* do MrBayes no Geneious Prime 2021, com o modelo de substituição GTR+G+I, 2 milhões de gerações e burn-in de 25% do total de árvores geradas. A árvore filogenética obtida foi verificada para agrupamentos e reformulação de haplótipos.

Tabela 2. Genes e *primers* utilizados para MLSA (Fargier et al. 2011)

Gene	Proteína	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')
<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma-70 factor	GAAATCGCCATCGCCAAGC CGGTTGGTGTACTTCTTGG
<i>fyuA</i>	TonB-dependent receptor	ACGGCACGCCGTTCTGGGG GATCAGGTTACGCCGA ACT
<i>gyrB</i>	Gyrase subunit	CGCTACCACCGCATCATCCT AGGTGCTGAAGATCTGGTCG
<i>dnaK</i>	Heat shock protein 70	ACCAAGGACGGCGAAGTGCT CGATCGACTTCTTGACCAGG

Tabela 3. Espécies, isolados e acessos do gênero *Xanthomonas* baixados do GenBank para as análises filogenéticas.

Espécie/Patovar	Isolados	Acesso
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Xaj 417	NZ_CP012251.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP412	NZ_OCYQ00000000.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP6982	NZ_CP020975.2
<i>Xanthomonas bromi</i>	CFBP1976	NZ_MDCE00000000.1
<i>Xanthomonas bromi</i>	LMG947	NZ_FLTX00000000.1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ATCC 33913	AE008922.1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ICMP 4013	NZ_CP012146.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	Xcc29-1	NZ_CP023661.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>	CFBP6166	NZ_OCYR00000000.1

<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	str. 12-2	NZ_CP015972.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	CFBP2526	NZ_CP072263.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	CFBP7119	NZ_CP072265.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>vignicola</i>	CFBP7113	NZ_CP022270.1
<i>Xanthomonas codiae</i>	CFBP 4690	NZ_MDEC00000000.1
<i>Xanthomonas cucurbitae</i>	CFBP 2542	NZ_MDED00000000.1
<i>Xanthomonas cynarae</i>	CFBP 4188	NZ_MDFM00000000.1
<i>Xanthomonas dyei</i>	CFBP 7245	NZ_MDEE00000000.1
<i>Xanthomonas dyei</i>	PLY_1	NZ_QREU00000000.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	LMG930	NZ_CP018467.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	85-10	NZ_CP017190.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>alfalfae</i>	CFBP 3836	NZ_AUWN01000017.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>alfalfae</i>	CFBP 7121	FJ561716.1, HQ591314.1, HQ591052.1, HQ590790.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>alfalfae</i>	CFBP3837	FJ561640.1, HQ591242.1, HQ590980.1, HQ590718.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>alfalfae</i>	CFBP7120	FJ561715.1, HQ591313.1, HQ591051.1, HQ590789.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	CFBP 6383	FJ561680.1, HQ591280.1, HQ591018.1,
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	CFBP6107	FJ561669.1, HQ591268.1, HQ591006.1, HQ590744.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	CFBP6358	FJ561674.1, HQ591273.1, HQ591011.1, HQ590749.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	CFBP6369	NZ_JOJQ00000000.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	CFBP6376	FJ561679.1, HQ591279.1, HQ591017.1, HQ590755.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	CFBP6359	FJ561675.1, HQ591274.1, HQ591012.1, HQ590750.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	CFBP6385	FJ561681.1, HQ591281.1, HQ591019.1, HQ590757.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	CFBP6362	FJ561676.1, HQ591275.1, HQ591013.1, HQ590751.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	CFBP6367	FJ561677.1, HQ591277.1, HQ591015.1, HQ590753.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>betae</i>	CFBP 5852	HQ591332.1, HQ591264.1, HQ591002.1, HQ590740.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>citrumelonis</i>	CFBP3114	FJ561629.1, HQ591230.1, HQ590968.1, HQ590706.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>citrumelonis</i>	CFBP 3371	NZ_MDCC00000000.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>citrumelonis</i>	CFBP3842	FJ561642.1, HQ591244.1, HQ590982.1, HQ590720.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i>	CFBP1604	FJ561602.1, HQ591202.1, HQ590940.1, HQ590678.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	91-118	NZ_CP019725.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	LH3	NZ_CP018475.1

<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>ricini</i>	CFBP5865	FJ561668.1, HQ591267.1, HQ591005.1, HQ590743.1
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>ricini</i>	CFBP6541	FJ561682.1, HQ591282.1, HQ591020.1, HQ590758.1
<i>Xanthomonas floridensis</i>	WHRI 8848	NZ_LXNG00000000.1
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Fap21	NZ_CP016830.1
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Fap29	NZ_CP016833.1
<i>Xanthomonas hortorum</i>	B07-007	NZ_CP016878.1
<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>gardneri</i>	ICMP7383	NZ_CP018731.1
<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>gardneri</i>	JS749-3	NZ_CP018728.1
<i>Xanthomonas melonis</i>	CFBP 4644	NZ_MDEH00000000.1
<i>Xanthomonas nasturtii</i>	WHRI 8984	NZ_QUZM00000000.1
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	ICMP3125	NZ_CP031697.1
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	AUST2013	NZ_CP033196.1
<i>Xanthomonas pisi</i>	CFBP 4643	NZ_MDEI00000000.1
<i>Xanthomonas pisi</i>	DSM 18956	NZ_JPLE00000000.1
<i>Xanthomonas populi</i>	CFBP 1817	NZ_MDEJ00000000.1
<i>Xanthomonas prunicola</i>	CFBP8354	NZ_PHKW00000000.1
<i>Xanthomonas prunicola</i>	CFBP8355	NZ_PHKX00000000.1
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	ICMP11055	NZ_CP009750.1
<i>Xanthomonas vasicola</i>	NCPFB 902	NZ_CP034657.1
<i>Xanthomonas vasicola</i>	NCPFB 1060	NZ_CP034649.1
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	LM159	NZ_CP018470.1
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	LMG 911	NZ_CP018725.1

Sequenciamento genômico

Após o BOX-PCR e MLSA, cinco isolados representando cinco haplótipos foram selecionados para o sequenciamento genômico sendo eles, quatro isolados de cebola (A-2018-1, A-2019-02, A-2019-04, A-2019-16) e o A-2019-21, isolado da cultura da soja. Os isolados foram sequenciados utilizando a tecnologia de sequenciamento baseada em *shorts reads* denominada DNBseq da BGI Genomics. Essa técnica trabalha com modelos de sequenciamento pequenos e de alta densidade, combinados com a replicação em *rolling-circle*.

Análise de qualidade e montagem dos genomas

A análise da qualidade das sequências, remoção de segmento de baixa qualidade e remoção de adaptadores foi feita pela própria BGI Genomics. A montagem das sequências de cada isolado foi realizada no software Unicycler (Wick et al. 2017). Todas as sequências foram anotadas no PGAP (*Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*) (Tatusova et al. 2016) e submetidas ao GenBank. A análise de completude dos genomas sequenciados foi realizada em dois softwares distintos em configuração padrão. O primeiro, BUSCO (Simão et al., 2015) dentro da plataforma Galaxy (Afgan et al., 2018). O segundo software utilizado foi o CheckM (Parks et al., 2015) na plataforma KBASE (<http://kbase.us/>).

Análise genômica comparativa

A análise das características dos genomas foi realizada de forma comparativa com a única sequência genômica completa de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* disponível no GenBank referente ao isolado CFBP 6369, acesso NCBI NZ_JOJQ000000000.1. Após a anotação automática das sequências genômicas no GenBank, foi verificado o tamanho do genoma, conteúdo G+C%, a presença ou ausência de plasmídeos, pseudogenes e regiões CRISPR, proteínas presentes e efetores do sistema de secreção do tipo três. Parte das informações foram adquiridas após a anotação e depósito no Genbank. Para a determinação de genoma *core*, *shell* e *cloud*, foi feita a anotação de todos os genomas via Prokka (Seemann, 2014), inclusive reanotação do genoma disponível no GenBank, usando a base de dados de sequências de genes não redundantes de isolados do gênero *Xanthomonas*, seguido de análise comparativa com o programa Roary (Page et al. 2015).

Identificação de regiões CRISPR

No intuito de verificar a presença de regiões CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), os genomas montados foram submetidos a análise no servidor CRISPRfinder online (Grissa et al. 2007).

Efetores do sistema de secreção do tipo III (TTSS)

A fim de se obter um panorama completo dos efetores presentes nos genomas sequenciados foi realizada uma análise comparativa via BLAST local com 65 sequências de famílias de efetores pertencentes ao gênero *Xanthomonas* disponíveis no site Xanthomonas.org. Somente as sequências de efetores com mais de 60 % de cobertura e/ou identidade foram consideradas presentes nos genomas analisados. A matriz de presença/ausência foi transformada em imagem na plataforma web Heatmapper (Babicki et al. 2016).

Identificação de genes de insensibilidade ao Cobre (*cop*)

Para a identificação de possíveis genes que conferem insensibilidade ao cobre foi realizada a análise dos genomas sequenciados que foram comparados via BLAST com sequências completas de genes componentes do *operon copABCD* e *copLAB* (Voloudakis et al. 2005; Behlau et al. 2011) baixados do GenBank de espécies do gênero *Xanthomonas*. Para avaliar a presença do gene *operon cop* na coleção de isolados, foi realizada PCR com os *primers* *copAF/AR* que possuem como alvo o gene *copA* (Behlau et al. 2013).

A reação foi conduzida conforme o protocolo do kit Master mix GoTaq qPCR (Promega, Wisconsin, Estados Unidos da América), utilizando 4 µL de DNA (25 ng/µL), 0,5 µL de cada *primer* e 0,2 da GoTaq Enzyme. O termociclador foi programado para: desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 64 °C e 45 segundos a 72 °C com um passo de extensão final de 10 min a 72 °C. Como controle foram utilizados

dois isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* de pimentão cedidos pela Dra. Alice Maria Quezado Duval da Embrapa Hortaliças, os isolados possuíam um padrão de sensibilidade já conhecido, sendo P-89 sensível ao cobre, e P-120 insensível.

3. RESULTADOS

Identificação dos isolados a nível de gênero por PCR

Dos isolados presentes nesse estudo somente um (A-2015-1) não apresentou amplificação com os *primers* X-gumD F7/R7 (Figura 3) e foi retirado dos testes posteriores. Também foram submetidos ao teste de confirmação de gênero o isolado referência brasileiro de *X. euvesicatoria* pv. *allii* (IBSBF 1770) e um isolado de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. O tamanho de fragmento obtido a partir da amplificação parcial do gene *gumD* de cada um dos isolados foi de 350 bp. Todos os isolados exceto o A-2015-1 foram confirmados como pertencendo ao gênero *Xanthomonas*.

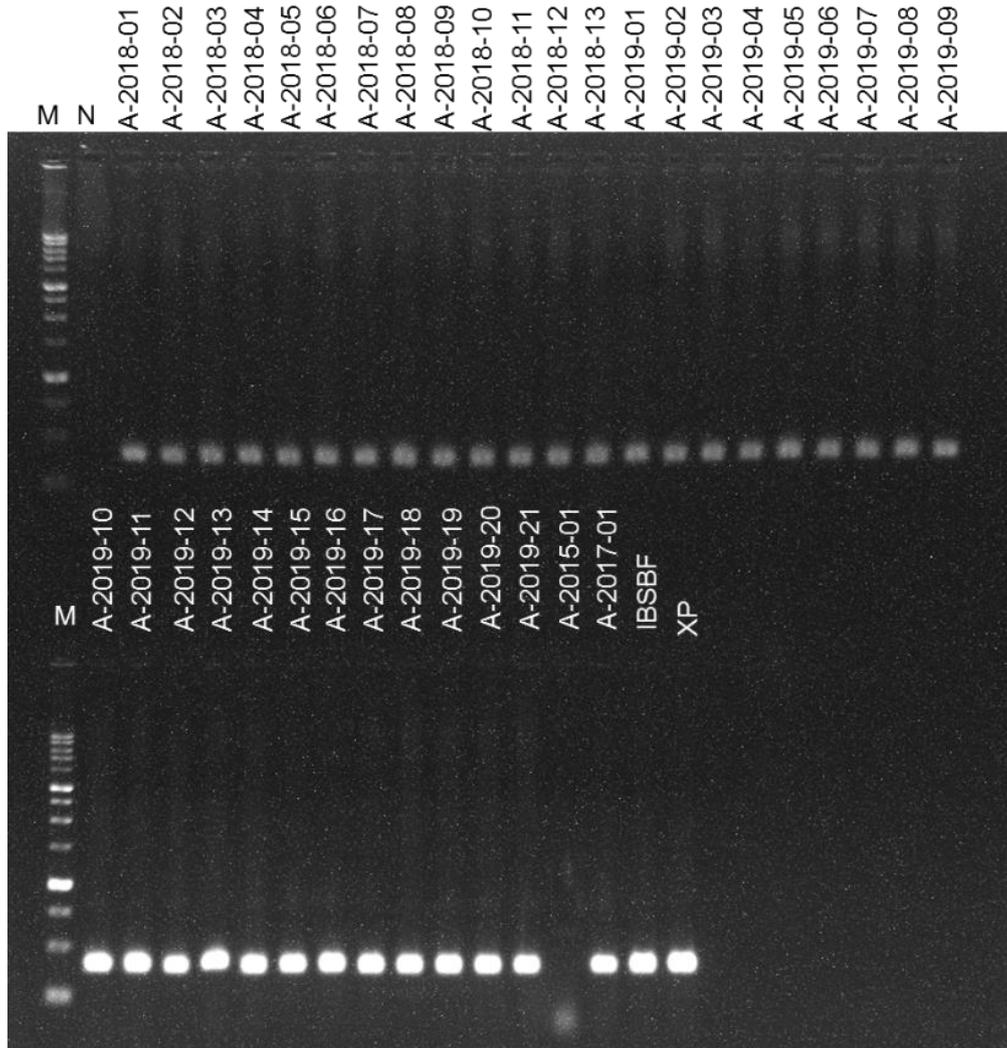


Figura 3. Produtos da PCR da coleção de isolados bacterianos de campos de cultivo de cebola do cerrado brasileiro, utilizando os *primers* X-gumD F7 e X-gumD R7. M: marcador 1 Kb Kasvi, fragmento gerado de 350 bp. N: controle negativo. IBSBF 1770: isolado referência brasileiro de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. XP: *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*.

BOX - PCR e seleção de haplótipos

Os *fingerprints* obtidos com o *primer* BOX A1R revelaram amplo polimorfismo entre os isolados de cebola (Figura 4). Um total de oito haplótipos foram detectados pela análise visual dos perfis de banda gerados (Tabela 4). Ao haplótipo 1 pertencem os isolados A-2018-01 e A-2018-02; o haplótipo 2 compreende os isolados A-2018-03, A-2018-11 e A-2018-12; os isolados A-2018-04, A-2018-05, A-2018-06, A-2018-07, A-2018-08, A-2018-09, A-2018-10, A-2018-13, A-2019-01 correspondem ao haplótipo 3; o grupo de isolados A-2019-02, A-

2019-03, A-2019-05, A-2019-06, A-2019-07, A-2019-08, A-2019-10, A-2019-11, A-2019-12, A-2019-13 representam o haplótipo 4; o haplótipo 5 possui um único isolado o A-2019-09, A-2019-14; o haplótipo 6 constitui os isolados A-2019-15, A-2019-16, A-2019-17, A-2019-18; os isolados A-2019-19 de caruru, A-2019-20, A-2019-21 de soja forma o haplótipo 7; e o haplótipo 8 com apenas um isolado.

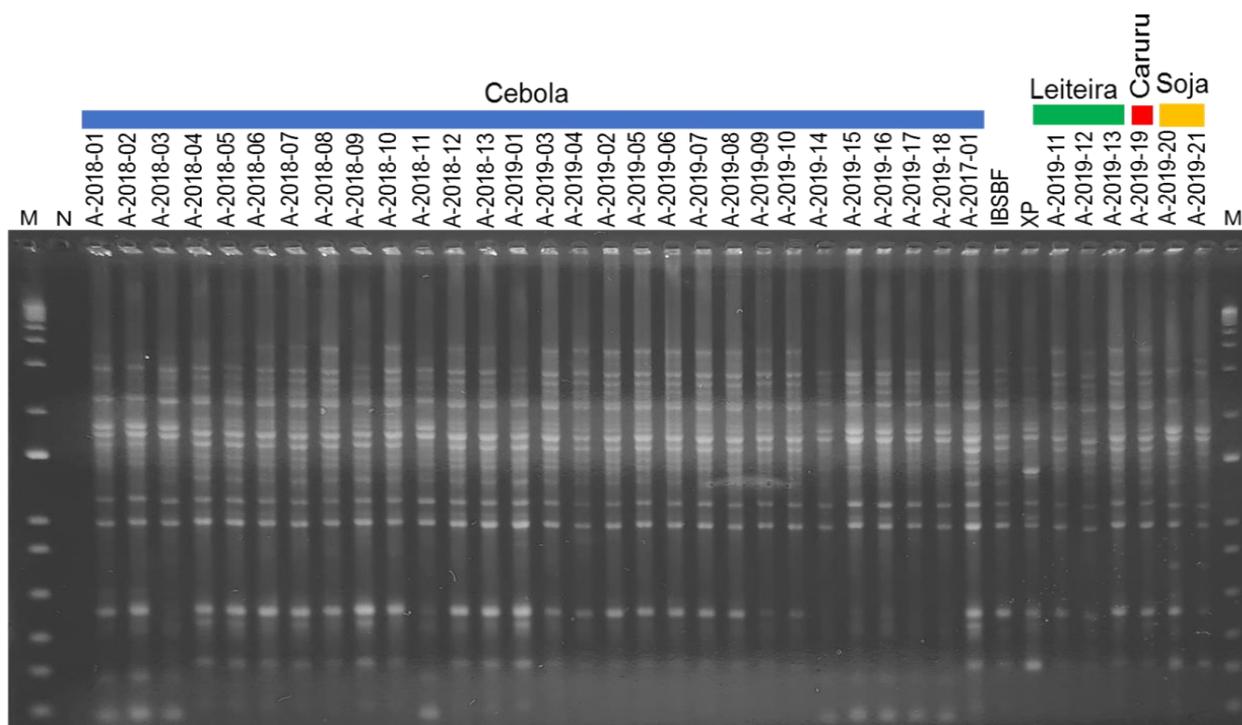


Figura 4. Perfis de BOX-PCR com o *primer* BOX-A1R da coleção de isolados de *Xanthomonas* de campos de cultivo de cebola do cerrado brasileiro e suas respectivas culturas de origem. IBSBF: isolado referência brasileiro de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, (IBSBF 1770). XP: *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. M: marcador 1 Kb Plus da Invitrogen. N: controle negativo.

Tabela 4. Identificação dos haplótipos selecionados a partir da análise visual do BOX-PCR, respectivos isolados e hospedeiras/cultivares de origem.

Haplótipos	Isolados	Hospedeira/Cultivar
Haplótipo 1	A-2018-01 e A-2018-02	Cebola/Taila
Haplótipo 2	A-2018-03, A-2018-11 e A-2018-12	Cebola/Taila
Haplótipo 3	A-2018-04, A-2018-05, A-2018-06, A-2018-07, A-2018-08, A-2018-09, A-2018-10, A-2018-13, A-2019-01	Cebola/Taila

Haplótipo 4	A-2019-02, A-2019-03, A-2019-05, A-2019-06, A-2019-07, A-2019-08, A-2019-10, A-2019-11, A-2019-12, A-2019-13	Cebola/Andrômeda A-2019-10 (Cebola/H239) A-2019-02 (Leiteira)
Haplótipo 5	A-2019-09	Cebola/Andrômeda
Haplótipo 6	A-2019-14, A-2019-15, A-2019-16, A-2019-17, A-2019-18	Cebola/Irati
Haplótipo 7	A-2019-19, A-2019-20, A-2019-21	Soja (A-2019-20, A-2019-21) Caruru (A-2019-19)
Haplótipo 8	A-2019-04	Cebola/Andrômeda

Multilocus sequence analysis (MLSA)

Com base na análise dos *fingerprints* dos isolados gerados por BOX-PCR, foram selecionados entre os oito haplótipos, onze isolados para integrar o MLSA (Tabela 5). Foi obtida uma sequência de 3.340 pb após a concatenação das sequências dos genes *housekeeping* de 790 pb (*rpoD*), 901 pb (*dnaK*), 861 pb (*fyuA*) e 801 (*gyrB*). A árvore filogenética apresentou elevados valores de probabilidade posterior e evidenciou o agrupamento dos isolados bacterianos de cebola em quatro clados, distintos de *X. euvesicatoria* (Figura 5). O clado 1 contém o isolado A-2018-01 que se encontra relativamente próximo ao isolado referência de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, único com sequência completa no GenBank CFBP 6369 das Ilhas Reunião e filogeneticamente próximo a outros dois isolados da patovar *allii*, sendo um das Ilhas Maurício e outro do Havaí (EUA). No clado 2 estão os isolados A-2019-02, A-2018-08, A-2019-11, A-2019-09 e A-2019-04 distantes de alguma referência de *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Vale ressaltar que nesse grupo apenas o isolado A-2019-11 não é proveniente de cebola, mas sim da planta invasora conhecida como leiteiro. Os isolados A-2018-03 e A-2019-16 formam o clado 3 e estão agrupados com um isolado brasileiro de *X. euvesicatoria* pv. *allii*. O clado 4

forma um agrupamento individual onde se encontram os isolados A-2019-19 de caruru (*Amaranthus* sp.) e A-2019-20, A-2019-21 de soja (*Glycine max*). Os isolados bacterianos de soja agruparam filogeneticamente distantes dos isolados de *X. citri* pv. *glycines* causadora da mancha bacteriana em soja. Todos os isolados coletados no DF, MG e GO agruparam no clado de *X. euvesicatoria*, confirmando que todos são dessa espécie de *Xanthomonas*.

Tabela 5. Haplótipos e isolados representativos usados em MLSA e suas respectivas hospedeiras e cultivares de origem.

Haplótipos	Isolados/Haplótipos	Hospedeira/cultivar
Haplótipo 1	A-2018-01	Cebola/Taila
Haplótipo 2	A-2018-03	Cebola/Taila
Haplótipo 3	A-2018-08	Cebola/Taila
Haplótipo 4	A-2019-02	Cebola/Andrômeda
Haplótipo 4	A-2019-11	Leiteira
Haplótipo 5	A-2019-09	Cebola/Andrômeda
Haplótipo 6	A-2019-16	Cebola/Irati
Haplótipo 7	A-2019-19	Caruru
Haplótipo 7	A-2019-20	Soja
Haplótipo 7	A-2019-21	Soja
Haplótipo 8	A-2019-04	Cebola/Andrômeda

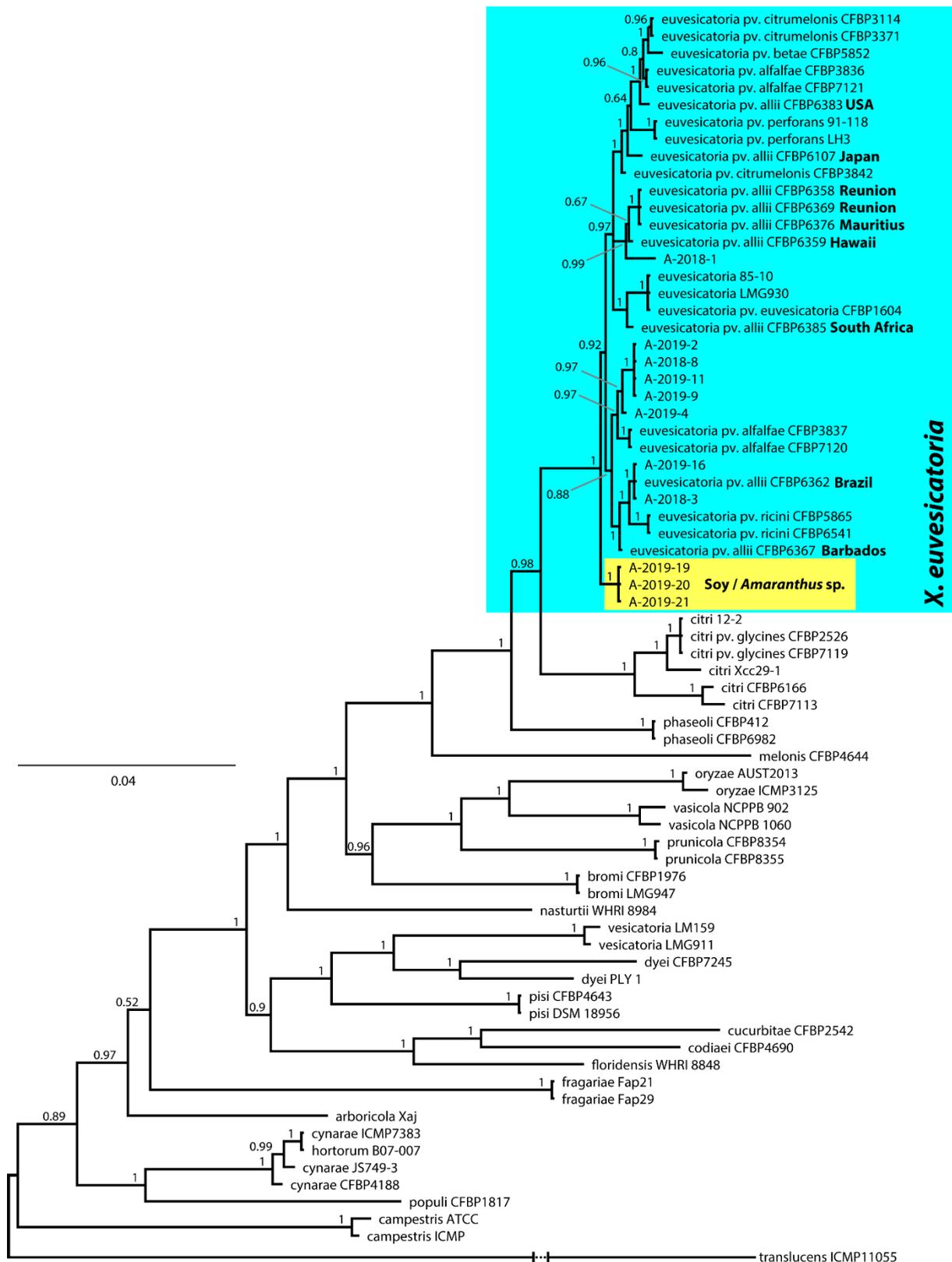


Figura 5. Árvore filogenética por inferência Bayesiana com sequencias concatenadas dos genes *fyuA*, *rpoD*, *gyrB* e *dnaK* de 73 isolados de *Xanthomonas* com 2 milhões de gerações. modelo GTR+G+I e *Xanthomonas translucens* ICMP11055 como *outgroup*.

Sequenciamento genômico e características

Os cinco haplótipos (A-2018-1, A-2019-02, A-2019-04, A-2019-16, A-2019-21) representativos da coleção selecionados a partir do BOX-PCR e análise MLSA foram sequenciados e tiveram mais de 99% de completude genômica segundo os programas BUSCO (Simão et al., 2015) e CheckM (Parks et al., 2015), gerando uma tabela contendo todas as informações inerentes as características genômicas de cada isolado (Tabela 6). Os isolados sequenciados apresentaram ausência de plasmídeos, tamanho de genoma com mais de 4 milhões de bp, conteúdo G+C para maioria dos isolados na faixa de 62 %, sendo que somente o isolado A-2018-1 apresentou o percentual de conteúdo G+C em cerca de 64 %.

A análise no servidor CRISPRfinder não constatou a presença de regiões CRISPR em nenhum dos genomas de *X. euvesicatoria* isolados da cebola.

Tabela 6. Características gerais dos genomas dos isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*.

Strain	A-2018-1	A-2019-02	A-2019-04	A-2019-16	A-2019-21
Collection date	29/03/18	20/05/19	20/05/19	20/09/19	03/01/20
Country	Brazil	Brazil	Brazil	Brazil	Brazil
State	Goiás	Goiás	Minas Gerais	Minas Gerais	Minas Gerais
GenBank BioProject	PRJNA757446	PRJNA757446	PRJNA757446	PRJNA757446	PRJNA757446
GenBank BioSample	SAMN20963334	SAMN20963343	SAMN20963363	SAMN20963372	SAMN20963401
Sequencing platform	DNBseq	DNBseq	DNBseq	DNBseq	DNBseq
Total short reads	32629264	32729864	32633116	32703152	32708048
Assembly method	Unicycler	Unicycler	Unicycler	Unicycler	Unicycler
Scaffolds	38	33	33	34	146
N50	520091	351320	351314	1061201	224453
CheckM Completeness (%)	99,64%	99,64%	99,64%	100%	99,64%
Contamination (%)	0%	0%	0,18%	0%	0,36%

BUSCO Score (%)	99,70%	99,80%	99,80%	99,80%	99,40%
Missing BUSCO	2	2	2	2	4
Coverage	812,51 x	863,98 x	1050,93 x	1327,32 x	1940,42 x
Genome size (bp)	4863596	4867393	491068	4908462	4919685
G+C content (%)	64,01%	62,24%	62,22%	62,19%	62,87%
Genes (total)	4105	4127	4204	4145	4184
Genes (coding sequences)	3955	3964	4037	3988	3960
Genes (RNA)	88	89	90	90	93
rRNA (5S, 15S, 23S)	1, 1, 1	1, 1, 1	1, 1, 1	1, 1, 1	1, 1, 1
tRNA	51	52	53	51	51
ncRNAs	34	34	34	35	39
Pseudogenes	62	74	77	67	131
Plasmids	0	0	0	0	0

Análise genômica comparativa

Na análise de composição do genoma dos isolados sequenciados foi gerado um dendrograma de composição gênica dos isolados (Figura 6), de forma a comparar o conteúdo de genes comuns e divergentes entre os isolados presentes nesse estudo com o genoma do isolado referência de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. O isolado CFBP 6369 detém uma quantidade relevante de genes exclusivos, sendo que entre os isolados brasileiros o que apresentou uma composição gênica relativamente mais próxima do isolado referência foi o A-2019-21, proveniente de soja. Os isolados A-2019-02 e A-2019-04 apresentam um conteúdo gênico semelhante, os isolados A-2018-01 e A-2019-16 apresentam alguns genes em comum, fora, claro, os genes *core*. Na proporção relativa de diferentes grupos gênicos presentes nos isolados, o genoma *core* corresponde a genes sempre presentes nos genomas dos isolados de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, *shell* representa genes que ocorreram com frequência nos genomas e

cloud genes presentes em uma minoria dos genomas (Figura 7). Foram encontrados um total de 3586 genes presentes no genoma *core*, 1776 no *shell* e *cloud* igual a zero.

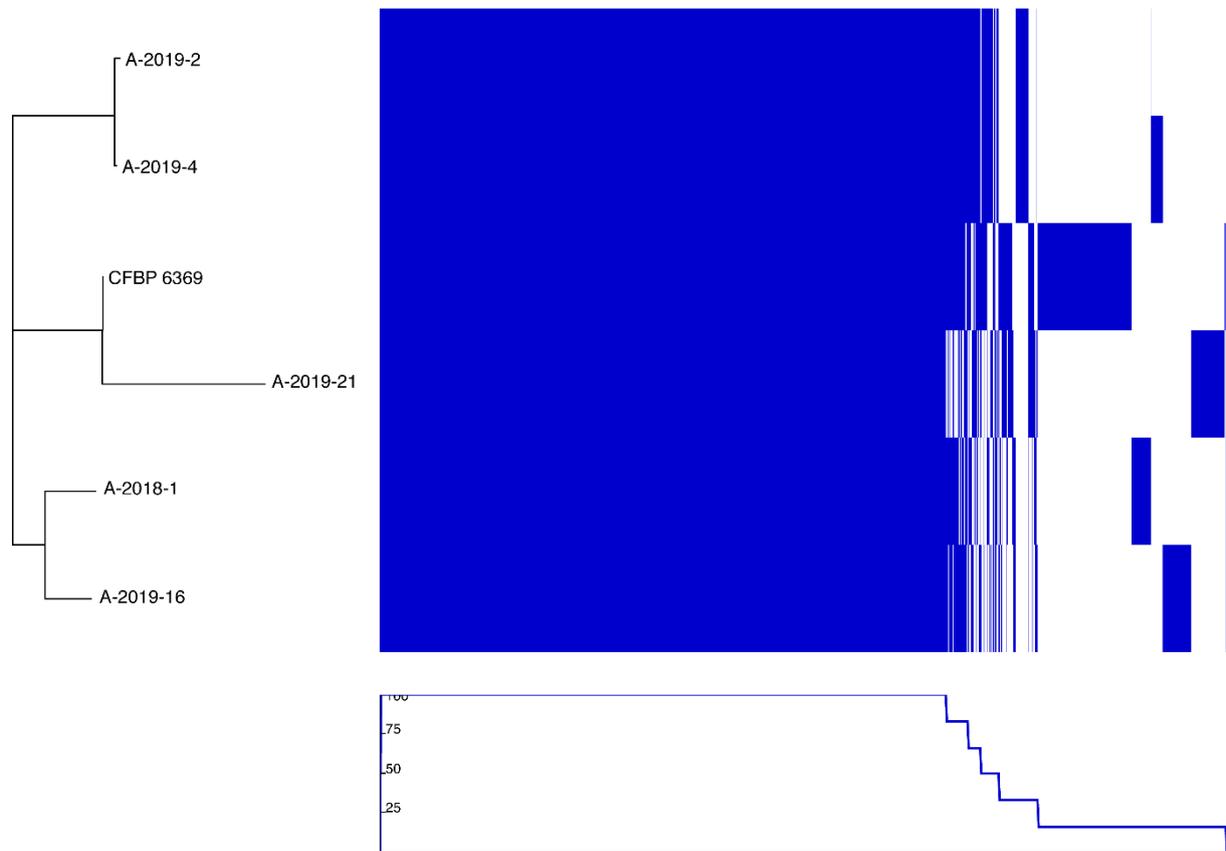


Figura 6. Árvore filogenética baseada no conteúdo gênico dos genomas completos de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*.

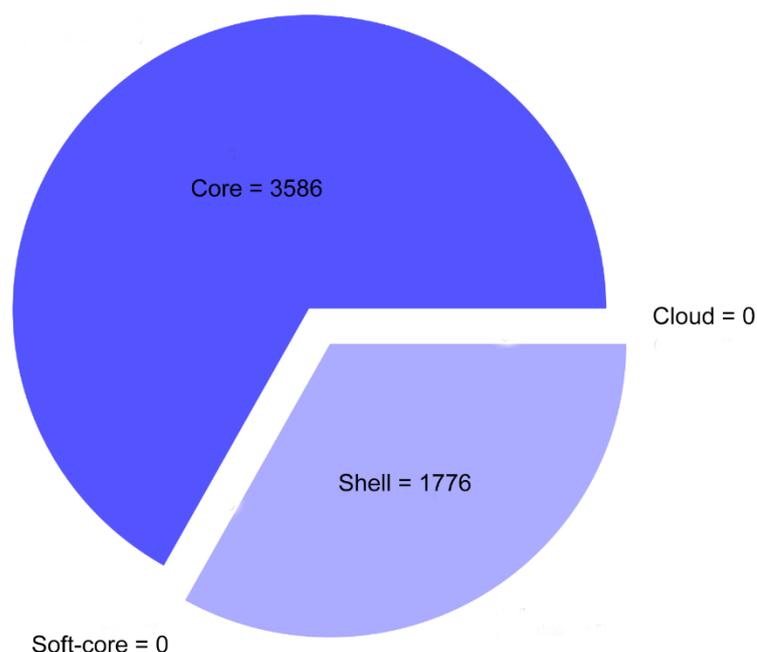


Figura 7. Proporções relativas de diferentes grupos gênicos de seis genomas de isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*.

Efetores do sistema de secreção do tipo III (TTSS)

A partir da busca pelas 65 famílias de efetores presentes no Xanthomonas.org, nos cinco genomas sequenciados e sete genomas de isolados de *Xanthomonas euvesicatoria*, via BLAST local no Geneious Prime 2020, foi gerada uma matriz revelando a presença e ausência de efetores entre os isolados (Figura 8). Dos 65 efetores já descritos para *Xanthomonas* um total de 13 estão presentes em todos os isolados avaliados: AvrBs2, HpaA, XopAP, XopE1, XopE2, XopK, XopL, XopM, XopN, XopQ, XopS, XopV, XopX e 20 inexistentes em todos os genomas estudados: AvrXccA1, AvrXccA2, HrpW, XopAB, XopAC, XopAF1, XopAH, XopAL, XopAL2, XopAM, XopAX, XopC1, XopC2, XopD, XopJ1, XopJ4, XopJ5, XopT, XopU, XopY.

O isolado A-2019-21 oriundo de soja apresenta seis efetores exclusivos: AvrBs1, XopAG, XopE4, XopG2, XopH1 e XopW. Os isolados A-2019-02 e A-2019-04 não tem o efetor XopAU. O efetor XopAK é ausente no isolado A-2019-04 e presente nos demais

genomas estudados, já o efector XopJ3 está presente somente no isolado A-2019-16. Apenas os isolados brasileiros possuem o efector XopR, sendo que o isolado referência de *X. euvesicatoria* pv. *allii* CFPB 6369 tem como característica comum ao isolado A-2019-21 serem os únicos sem os efetores XopAY e XopAV. Apenas os isolados CFPB 6369 e o isolado da pv. *alangii* NCPPB1336 possuem o efector AvrBs3, os isolados da pv. *alfafae* CFBP3836 e pv. *allii* CFPB 6369 são os únicos ausentes do efector XopF2. O isolado de pv. *citrumelonis* FDC1637 diferencia-se dos outros dois isolados de pv. *citrumelonis* por apenas um efector presente no seu genoma, o XopAD. O isolado de pv. *physalidis* NCPPB1756 possui três efetores únicos XopB, XopJ2, XopO e diferente dos demais não possui os efetores XopA, XopAW, XopAZ e XopF1, apenas o isolado de pv. *physalidis* NCPPB1756 e o pv. *alangii* NCPPB1336 possuem o efector XopE3.

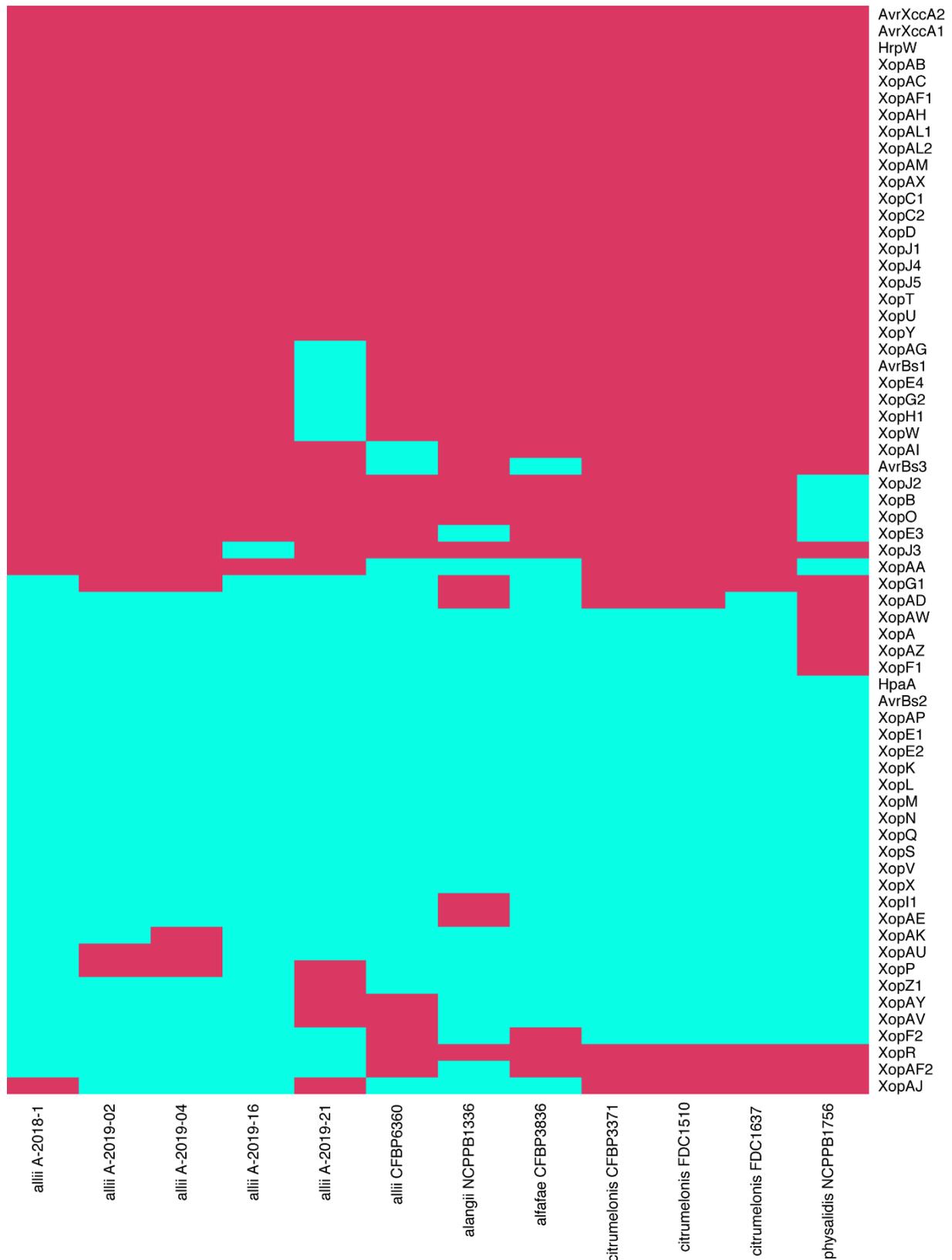


Figura 8. Matriz de presença e ausência de efetores analisados em um total de doze genomas de *Xanthomonas euvesicatoria*, sendo que dentre esses, cinco correspondem aos isolados bacterianos de cebola sequenciados. Vermelho: indica ausência. Azul: indica presença.

Identificação de genes de insensibilidade ao Cobre (*cop*)

Usando genes de referência *copLAB* e *copABCD* para a análise via BLAST, não houve nenhum gene com elevada similaridade e/ou cobertura, indicando a ausência de genes associados à insensibilidade ao cobre.

A PCR utilizando os *primers* *copAF* e *copAR* para avaliar a presença do gene *operon cop* (*copA*) que confere insensibilidade ao cobre em *Xanthomonas* mostrou ausência de amplificação para os isolados bacterianos provenientes de campos de cultivo de cebola e para o isolado P89, sabidamente sensível ao cobre. Somente para o isolado P120 obteve-se à amplificação do fragmento de 870 bp correspondente ao gene *copA* (Figura 9).

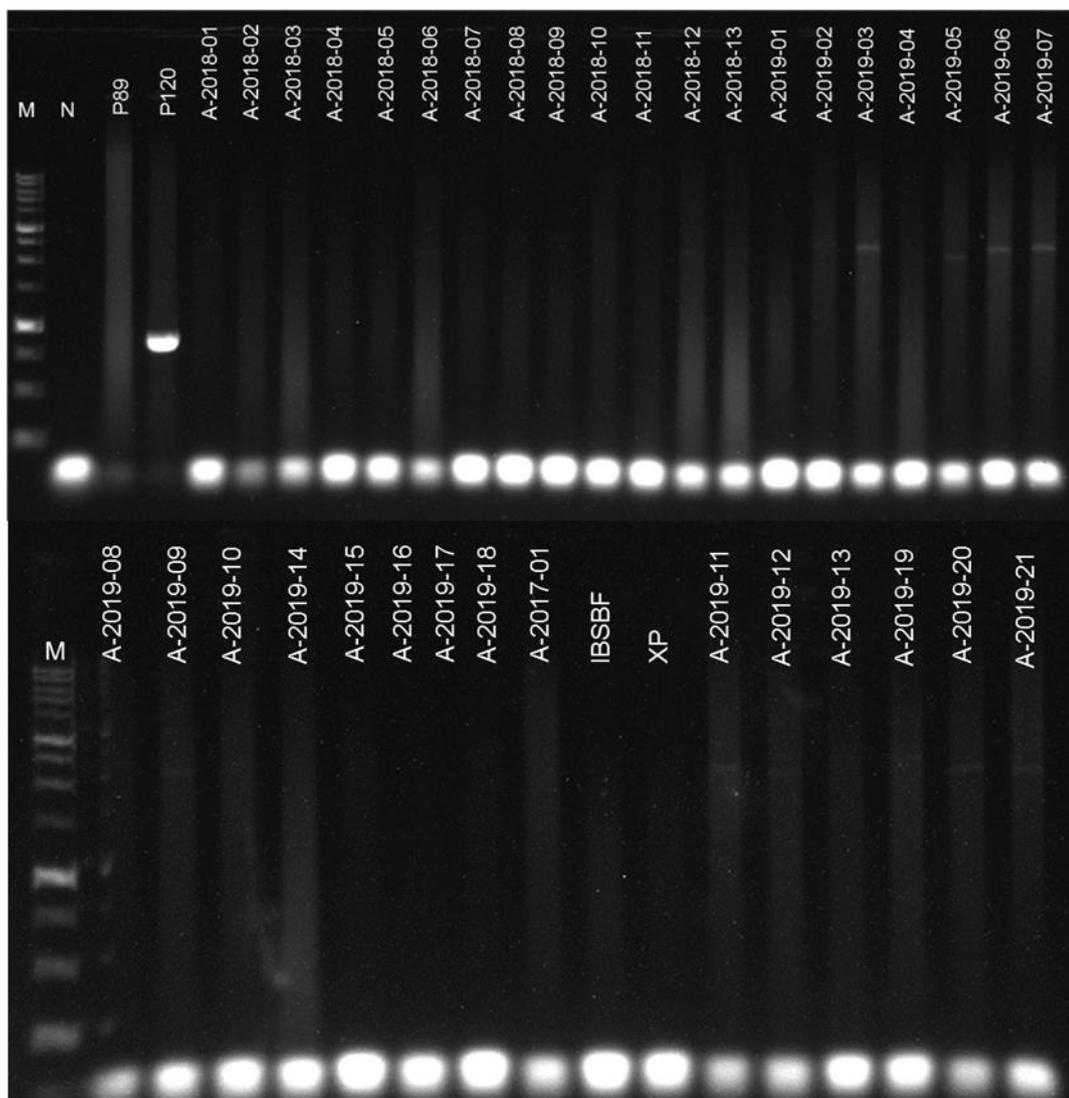


Figura 9. Produtos da PCR da coleção de isolados oriundos de campos de cultivo de cebola do cerrado brasileiro utilizando os primers copAF e copAR para amplificação do gene copA que confere insensibilidade ao cobre em bactérias fitopatogênicas. M: marcador 1 Kb Kasvi, fragmento gerado de 870 bp. N: controle negativo. P89: isolado de *Xanthomonas euvesicatoria* sensível ao cobre. P120: isolado de *Xanthomonas euvesicatoria* insensível ao cobre. IBSFB: isolado referência IBSFB 1770, brasileiro de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. XP: *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

4. DISCUSSÃO

Xanthomonas euvesicatoria pv. *allii* causadora da queima bacteriana em cebola teve seu primeiro relato no Brasil em 1987 (Neto et al. 1987) e até o momento não havia estudos relacionados à diversidade existente no país. O presente trabalho investiga uma coleção de isolados provenientes de campos de cultivo de cebola do cerrado brasileiro, nas regiões de Cristalina GO, Cabeceira-Grande MG e PAD DF, no intuito de elucidar características filogenéticas, genômicas e avaliar a sensibilidade dos isolados ao cobre.

Os isolados foram coletados em campos de cebola de plantas sintomáticas apresentando lesões cloróticas e encharcadas no limbo foliar, além disso, foi observada uma redução no tamanho dos bulbos nos campos afetados. O isolamento resultou em colônias amarelas, mucóides, lisas e convexas típicas da espécie assim como descrito por Kadota et al. (2000).

Utilizando a técnica de PCR e *primers* que possuem como alvo o gene *gumD*, foi confirmado que os isolados pertencem ao gênero *Xanthomonas*, já que entre os 36 isolados, somente um não amplificou na análise. Adriko et al. (2014), quem descreveu os *primers*, especificou as espécies que não amplificaram a região correspondente ao gene *gumD*, *Xanthomonas theicola*, *Xanthomonas translucens*, *Xanthomonas hyacinthi*, e *Xanthomonas sacchari*, o que valida o resultado obtido nesse estudo.

A PCR utilizando o *primer* BOX-A1R identificou uma diversidade considerável presente na coleção de bactérias isoladas de campos de cultivo de cebola do cerrado brasileiro. Um total de oito haplótipos foram selecionados com base na análise dos perfis de banda gerados pelo BOX-PCR. O poder de resolução desse marcador molecular pode ser evidenciado por

autores que utilizaram marcadores como AFLP, ERIC, REP-PCR e inclusive BOX-PCR no estudo da diversidade em *Xanthomonas* (Restrepo et al. 2000; Arshiya et al. 2014; Asgarani et al. 2015). Gent et al. (2003) utilizando três diferentes marcadores moleculares, BOX, ERIC e REP, identificaram uma grande diversidade entre isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* isoladas de cebola de diferentes regiões geográficas, formando cinco haplótipos distintos. Baseado em análises AFLP e RFLP, Picard et al. (2008) constataram a presença de diversidade entre isolados de duas ilhas do arquipélago Mascarenhas, evidenciando a presença de dois diferentes grupos de isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* que se divergiam geneticamente oriundos de cebola, alho-poró e alho. No presente trabalho foi verificada uma diversidade superior ao visto pelos autores previamente citados. Porém, contrariando o que foi concluído por Zamani et al. (2011), que ao analisar uma coleção de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* evidenciaram uma baixa diversidade genética especulando a ocorrência de poucas introduções do patógeno nas regiões, o recente relato da queima bacteriana no país (1987), pode indicar que o Brasil não é o centro de origem dessa variante e sim que é o resultado de inserções. A hipótese de que ocorreram diferentes introduções do inóculo da bactéria no país via sementes é muito provável, visto que é a principal forma de disseminação a longa distância dessa bactéria (Roumagnac et al. 2000).

Os haplótipos 1, 2 e 3 são predominantemente da cultivar Taila de cebola, os haplótipos 4, 5 e 8 são oriundos da cultivar Andrômeda de cebola, sendo que o isolado A-2019-10 e A-2019-02 que integram o haplótipo 4 são da cultivar de Cebola H239 e da planta daninha leiteira respectivamente. O haplótipo 4 foi encontrado em duas diferentes áreas de plantio da cultivar Andrômeda por isso é mais provável que o fluxo bacteriano tenha ocorrido da cebola para a leiteira e não o contrário e vale ressaltar que os isolados dessa planta invasora foram coletados em campos onde estavam plantados a cebola cultivar Andrômeda. No haplótipo 6 predominam os isolados de cebola da cultivar Irati e por fim o 7 que forma um haplótipo único referente aos

isolados de soja e caruru. Essa inter-relação evidenciada entre os haplótipos e as cultivares de cebola pode explicar melhor a diversidade e a dinâmica de introdução da *Xanthomonas* de cebola no Brasil. Foi observado que cada haplótipo está ligado a uma determinada cultivar, reforçando a hipótese de que a introdução de cada haplótipo pode ter sido através de sementes de cultivares específicas. Uma segunda hipótese para esses haplótipos correlacionando com cultivar de origem, pode ser resultante da existência de raças nessa patovar e de cultivares com resistências específicas para tais raças, fato esse já relatado para o gênero *Xanthomonas* em diferentes espécies como *X. campestris* pv. *campestris* (Vicente et al. 2007; Rubel et al. 2017), *X. oryzae* pv. *oryzae* (Ochiai et al. 2005; Liu et al. 2011) e *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Du et al. 2014; Bhattarai et al. 2017; Li et al. 2019; Zhang et al. 2020; Liu et al. 2021).

Os isolados haplótipos originários da cultura da soja e caruru foram coletados em uma mesma área em Cabeceira-Grande MG, onde oito meses antes do plantio da soja havia ocorrido um surto da queima bacteriana em cebola. Esses isolados formaram um haplótipo único, no entanto, somente com essas informações não é possível afirmar que se trate da mesma bactéria presente em cebola. Estudos externos a essa pesquisa envolvendo testes de patogenicidade em casa de vegetação estão sendo realizados, para avaliar se os isolados bacterianos encontrados em soja são patogênicos a cebola o que os caracterizaria como sendo da patovar *allii*.

Com base nos resultados obtidos no MLSA foi confirmado que os isolados pertencem à mesma espécie, pois, todos agruparam no clado de *X. euvesicatoria*. Essa técnica com uso de um esquema de quatro genes é confiável para a identificação apropriada de espécies de *Xanthomonas*, como realizado por Young et al. (2008) e Young et al. (2010), ambos utilizaram diferentes espécies de *Xanthomonas* e através da análise MLSA utilizando os genes *housekeeping dnaK*, *fyuA*, *gyrB* e *rpoD* evidenciaram diversidade entre diferentes isolados do gênero.

A identificação como *X. euvesicatoria* já está de acordo com a nova reclassificação proposta por Constantin et al. (2016), que alterou a espécie *X. axonopodis*, inclusive da patovar *allii*, através de análises MLSA, *DNA–DNA hybridization* e sequenciamento genômico, agrupando a espécie no clado II de *Xanthomonas* que corresponde a *X. euvesicatoria*. Através da análise MLSA também foi possível observar a variabilidade entre os isolados oriundos de campos de cultivo de cebola do cerrado brasileiro, os mesmos formaram quatro cladogramas distintos na árvore filogenética. O isolado A-2018-01 agrupou próximo a um isolado de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* do Havaí (CFBP6359), que forma um clado com outros isolados internacionais incluindo o isolado referência de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* das Ilhas Reunião (CFBP6369). Os isolados A-2019-02 de leiteira, A-2018-08, A-2019-11, A-2019-09 e A-2019-04 oriundos de cebola agruparam em um clado distante de outras referências, porém, é possível que possuam um ancestral comum com espécies de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *alfafae* já que na árvore agruparam relativamente próximos filogeneticamente a isolados dessa espécie. Os isolados A-2019-16 e A-2018-3 agruparam em um clado juntamente com um isolado de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* brasileiro (CFBP6362).

Os isolados de soja e caruru que formaram um haplótipo único na análise de BOX-PCR agruparam distantes de outras referências, porém, integrando a espécie *Xanthomonas euvesicatoria* e distantes filogeneticamente dos isolados de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* que causam a mancha bacteriana em soja. Os isolados de soja foram coletados de plantas que apresentavam sintomas relativamente fracos contendo lesões necróticas circulares de tamanho bem reduzido e sem halo clorótico e em um campo onde havia ocorrido o plantio de cebola oito meses antes. O plantio de cebola em rotação de culturas com leguminosas é uma prática comum o que pode contribuir para a sobrevivência epifítica da *Xanthomonas* de cebola em soja e na planta invasora (caruru), fato muito semelhante já foi relatado por Gent et al. (2005) da sobrevivência do inóculo de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* em leguminosas e plantas

daninhas de forma epifítica no Colorado (EUA), entre as diversas espécies de plantas relatadas pelo autor podemos destacar *Amaranthus retroflexus* (caruru) e também *Glycine max* (soja). Em plantas daninhas as populações epifíticas de *X. euvesicatoria* pv. *allii* foram recuperadas de campos que tinham menos de 10 meses que havia ocorrido o plantio de cebola. Em um estudo anterior, porém, publicado no mesmo ano Gent et al. (2005) também no Colorado (EUA), relataram a sobrevivência epifítica de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* em plantas de feijão em condições de campo onde ocorria a rotação de culturas, após inoculação em testes de campo as populações epifíticas de *X. euvesicatoria* pv. *allii* foram recuperadas de feijão e lentilha, porém, a bactéria não sobreviveu em soja e grão de bico. O primeiro estudo relatando os hospedeiros alternativos de *X. euvesicatoria* pv. *allii* foi realizado por O'Garro e Paulraj (1997) em Barbados, onde foi evidenciado que além de ser patogênica a cebola também causava sintomas em leguminosas naquela região como feijão-francês, feijão-alado e soja, entre seis a oito dias já foi possível observar os sintomas causados por *X. euvesicatoria* pv. *allii* após inoculação artificial. No estudo foi sugerido que não fosse realizada a rotação de culturas entre feijão e cebola, já que era uma prática comum em Barbados, pois, poderia ocasionar em perdas na produção da leguminosa. Diante do exposto podemos especular uma possível ocorrência de sobrevivência epifítica de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* em soja e caruru, o que seria a teoria mais provável, ou mesmo, um *host jump* de cebola para soja o que pode ser melhor comprovado diante de testes de patogenicidade.

Os genomas sequenciados dos isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* apresentam um tamanho que varia entre 4,8 a 4,9 Mb e conteúdo G+C acima de 62 %, com valores aproximados a sequência do genoma completo do isolado de referência da espécie que apresenta um tamanho de genoma com mais de 5,4 Mb e conteúdo G+C de 64,4 % (Gagnevin et al. 2014), esses valores relacionados ao tamanho e conteúdo genômico são também os

esperados para bactérias do gênero *Xanthomonas* que geralmente apresentam genoma de 4,8 a 5,3 Mb e conteúdo G+C acima de 60% (Ryan et al. 2011).

A análise comparativa entre os genomas sequenciados dos isolados bacterianos provenientes de cebola e o isolado referência *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* baseada no estudo do pan-genoma possibilitou uma visão da diversidade entre o conteúdo gênico presente nos isolados avaliados. O pan-genoma de um gênero ou espécie em comparação com o genoma de um único isolado é determinado como o agrupamento de todas as famílias de genes ou proteínas identificados ao menos uma vez no genoma dessa espécie ou gênero (Tettelin et al. 2005, Medini et al. 2005). A baixa diversidade do pan-genoma pode estar relacionada a uma população bacteriana estável, em contrapartida pode ser indício de uma espécie com baixo *fitness* (Snipen e Ussery, 2010).

Os isolados A-2019-02 e A-2019-04 foram os que menos se divergiram em relação ao conteúdo gênico, vale ressaltar que na análise MLSA agruparam em um clado próximo (Figura 5). Os genes podem ser separados em classes de acordo com seu nível de conservação dentro do pan-genoma, com isso, o pan-genoma foi dividido em três grupos definidos por *core* (sempre presentes no genoma da espécie ou gênero, altamente conservados), *shell* (genes que podem ser encontrados no genoma com frequência) e *cloud* (genes pouco encontrados, raros no genoma da espécie ou gênero) (Koonin e Wolf, 2008; Snipen e Ussery, 2010). Com base na análise do genoma *core*, *shell* e *cloud* dos isolados sequenciados foi obtido um gráfico (Figura 7) evidenciando um total de 3586 genes presentes no genoma *core*, 1776 no *shell* e *cloud* igual a zero. Assim como nesse estudo, o pan-genoma de diferentes espécies do gênero *Xanthomonas* já foi elucidado principalmente no intuito de evidenciar fatores evolutivos e de diversidade com base no conteúdo gênico de determinados isolados como em *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Bansal et al. 2017), *Xanthomonas euvesicatoria* e *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Jibrin et al. 2018), *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* (Nakato et al. 2020).

Nos genomas dos isolados sequenciados nesse estudo não foram identificados plasmídeos. Os plasmídeos quando presentes no genoma bacteriano estão intimamente ligados a fatores de patogenicidade, virulência e adaptação ecológica ou sobrevivência de espécies, por serem transmitidos de forma horizontal, permitem uma rápida evolução de isolados, no entanto, sua conservação no genoma está sujeita a ocorrência de seleção positiva ao longo do tempo contribuindo para o aumento do *fitness* bacteriano (Sundin, 2007). A presença de plasmídeos já foi detectada em diferentes espécies de *Xanthomonas* como em *X. citri* pv. *glycines* (Kim et al. 2006), *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Niu et al. 2015), *X. oryzae* pv. *oryzae* (Kaur et al. 2019). Gochez et al. (2018) por meio do sequenciamento de plasmídeos, identificaram distinções entre isolados de *X. citri* pv. *citri* com base na presença e ausência de determinados efetores nos plasmídeos dos isolados analisadas. O mesmo foi demonstrado por Webster et al. (2020) que através de sequenciamento genômico evidenciaram uma distribuição distinta de plasmídeos entre isolados de *X. citri* pv. *citri* patótipo A, além disso os isolados agruparam em três clados diferentes, apresentando características genômicas diferenciais para virulência e genes de resistência ao cobre. A diversidade de plasmídeos também já foi identificada em diferentes gêneros bacterianos como em *Xylela fastidiosa* (Pierry et al. 2020). A presença de plasmídeos também já foi relatada em *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* e *X. perforans* associadas à mancha bacteriana em tomate, pimenta e pimentão (Roach et al. 2019).

O genoma dos isolados são desprovidos de plasmídeos o que atesta que possivelmente possuam um baixo acervo de genes relacionados a virulência e resistência ao cobre, já que o *operon cop* na maioria das bactérias está contido em plasmídeos (Mellano e Cooksey, 1988; Cha e Cooksey, 1991; Behlau et al. 2013). No entanto um estudo de Roach et al. (2020) evidenciaram a ocorrência de tolerância ao cobre em isolados de *Xanthomonas* pertencentes ao complexo da mancha bacteriana em solanáceas na Austrália e apontou que a tolerância a compostos cúpricos não tinha relação direta com a existência de genes de resistência ao cobre

ou mesmo com a presença de plasmídeos, já que a maioria dos genes de tolerância ao cobre foram encontrados no cromossomo dos isolados.

Além da ausência de plasmídeos também foi constatado que não há a ocorrência de regiões CRISPR nos genomas dos isolados sequenciados. O *locus* CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) corresponde à um conjunto de genes organizados em sequências curtas repetitivas intercaladas por espaçadores, que podem estar presentes tanto em plasmídeos quanto no cromossomo (Bolotin et al. 2005; Grissa et al. 2007). O CRISPR abrange um arsenal de genes responsáveis pela resposta de defesa de bactérias a DNA exógeno e bacteriófagos (Barrangou et al. 2007). O CRISPR foi inicialmente descoberto na década de 1980 na bactéria *Escherichia coli* (Ishino et al. 1987; Nakata et al, 1989) e somente nos anos 2000 a sua função biológica foi melhor elucidada, como integrante de processos de proteção contra elementos externos à célula bacteriana (Mojica et al. 2000; Jansen et al. 2002; Bolotin et al. 2005; Mojica et al. 2005; Pourcel et al. 2005), contudo apenas cerca de 45% das bactérias apresentam o *locus* CRISPR (Grissa et al. 2007). A ausência de regiões CRISPR não torna uma bactéria completamente suscetível a interferência de elementos genéticos móveis ou bacteriófagos já que existem outros mecanismos que atuam na defesa da célula (Rostøl et al. 2019).

Os genes efetores são determinantes para a severidade e virulência do patógeno, sendo que alguns efetores são capazes de suprimir a indução de resposta de hipersensibilidade (HR) em plantas (Fujikawa et al. 2006). Nesse estudo foram identificadas nos genomas dos isolados sequenciados proteínas efetoras do sistema de secreção tipo III (T3SS), esse sistema está relacionado com a patogênese bacteriana. Entre os isolados avaliados, treze efetores são comuns e presente em todos os genomas. Os isolados A-2019-16 de cebola e A-2019-21 oriundo de soja destacam-se por possuírem o maior número de genes efetores entre os isolados avaliados, um total de 32 proteínas efetoras foram identificadas em seus genomas, sendo que o isolado A-

2019-21 possui seis efetores exclusivos, que somente foram encontrados nesse isolado, essa peculiaridade pode melhor explicar o fato de sua aptidão por infectar soja. Os demais isolados desse estudo apresentam um arsenal de efetores que variam de 27 a 30 presentes no genoma. Para tanto, consideramos o limiar de similaridade estabelecido por Fonseca et al. (2019) em um estudo genômico com isolados de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*, onde efetores com 60 % de cobertura e/ou identidade foram considerados presentes nos genomas analisados. Ao invadir o tecido da hospedeira *Xanthomonas* se torna sujeita a respostas de defesa desencadeadas pela planta como PTI (*PAMP-triggered immunity*) e ETI (*effector-triggered immunity*) (Büttner, 2016; Timilsina et al. 2020). Para superar essas repostas imunes, a bactéria libera na célula hospedeira proteínas efetoras do tipo III, como Avr (*Avirulence*) ou Xop (*Xanthomonas outer proteins*) (Büttner e Bonas, 2010). Muitos efetores necessitam ser melhor elucidados sobre sua função, porém, diversos autores já identificaram a forma de ação de alguns efetores T3SS, como exemplo da identificação de funcionalidade de alguns efetores temos as proteínas efetoras XopP, XopL, XopB, XopR, AvrBs2, XopK, XopN e XopS que mediam a supressão de fatores que desencadeiam a resposta PTI (Kim et al. 2009; Akimoto-Tomiyama et al. 2012; Schulze et al. 2012; Taylor et al. 2012; Singer et al. 2013; Li et al. 2015; Qin et al. 2018; Deb et al. 2020; Os efetores XopZ, XopN, XopQ e XopX que suprimem respostas imunes provocadas por DAMP (*damage-associated molecular patterns*) e XopH e XopQ que inibem respostas de defesa PTI e ETI (Song et al. 2010; Teper et al. 2014; Teper et al. 2015; Popov et al. 2016; Medina et al. 2017). Considerando que poucos efetores tiveram suas funções esclarecidas, não se pode inferir qual a sua participação na infecção de cebola ou soja, porém acredita-se que esse conjunto de efetores *core*, presentes em todos os isolados da patovar *allii*, possa explicar a capacidade de infectar hospedeiras do gênero *Allium*.

É provável que os isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* sejam sensíveis ao cobre, já que não foram identificados genes relacionados a resistência em nenhuma das análises.

Os domínios gênicos *copABCD* e *copLAB* que regem a resistência ao cobre em bactérias fitopatogênicas geralmente se localizam nos plasmídeos (Voloudakis et al. 2005; Behlau et al. 2011, Behlau et al. 2013), no entanto, nenhum plasmídeo foi detectado nos isolados desse estudo. Os genes de resistência ao cobre também podem estar presentes nos cromossomos (Lee et al. 1994, Basim et al. 2005), entretanto, a análise via BLAST não encontrou genes equivalentes em nenhum dos isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. Há também os genes *coh* relacionados a tolerância ao cobre em células bacterianas (Arguello et al. 2013), para identificação desses genes seriam necessários testes específicos para verificar a presença de fenótipos tolerantes entre os isolados. Os isolados desse estudo não expressam genes de resistência ao cobre, porém, não exclui a possibilidade de possuírem genes do tipo *coh* e de que possam vir a ocorrer eventos de conjugação e transferência de genes associados a insensibilidade ao cobre. É possível que bactericidas cúpricos possam ser usados no controle da queima bacteriana de cebola em condições de campo nas regiões de Cristalina GO, Cabeceira-Grande MG e PAD DF.

5. CONCLUSÃO

- Os isolados de *Xanthomonas* provenientes de campos de cebola objetos desse estudo apresentam uma grande diversidade, o que sugere a ocorrência de diferentes eventos de introdução do patógeno no país via sementes;
- MLSA confirmou a identidade dos isolados como *Xanthomonas euvesicatoria* especificamente da patovar *allii* em função da hospedeira infectada;
- A diversidade do patógeno determinada por BOX-PCR e MLSA indica correlação entre haplótipos e cultivares de cebola, o que sugere a possibilidade da entrada de cada haplótipo por sementes de cultivares específicas;
- Os isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* sequenciados apresentam um conjunto de mais de 27 proteínas efetoras do sistema de secreção T3 existindo variação entre eles;
- Os isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* presentes nesse estudo não possuem o *operon cop* que confere resistência ao cobre, o que sugere que o uso de compostos cúpricos no controle da queima bacteriana da cebola tende a ser durável como opção de manejo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd-Alla MH, Bashandy SR (2012) Production of Quorum Sensing Inhibitors in Growing Onion Bulbs Infected with *Pseudomonas aeruginosa* E (HQ324110). ISRN Microbiology 2012: 1-7.

Adeoti O, Oyedele OA, Yusuf A (2021) The water footprint of dry onion production in Nigeria. Water Resources and Industry 25.

Afgan E, Baker D, Batut B, Van Den Beek M, Bouvier D, Čech M, ... Blankenberg, D (2018) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. Nucleic acids research 46(W1): W537-W544.

Akimoto-Tomiyama C, Furutani A, Tsuge S, Washington EJ, Nishizawa Y, Minami E, Ochiai H (2012) XopR, a Type III Effector Secreted by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Suppresses Microbe-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant-Microbe Interactions 25(4): 505-514.

Alvarez AM, Buddenhagen IW, Buddenhagen ES, Domen HY (1978) Bacterial blight of onion, a new disease caused by a *Xanthomonas* sp. Phytopathology 68:1132-1136.

Araújo ER, Alves DP, Higashikawa FS (2018) Cultivar resistance and chemical, biological and fertilizer treatments for controlling *Botrytis* leaf blight of onion. Tropical Plant Pathology 43(2): 160-164.

Araújo ER, Gonçalves PAS, Alves DP (2017) Acibenzolar-S-methyl, and potassium and calcium phosphites are not effective to control downy mildew of onion in Brazil. Australasian Plant Disease Notes 12(1).

Araújo ER, Resende RS (2020). Propineb efficiency in controlling downy mildew of onion under field conditions. Australasian Plant Disease Notes, 15(1).

Arguello JM, Raimunda D, Padilla-Benavides TJFIC, Microbiology I (2013) Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. 3: 73.

Arshiya M, Suryawanshi A, More D, Baig MMV (2014) Repetitive PCR based detection of Genetic Diversity in *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* Strains. *Journal of Applied Biology e Biotechnology* 2(01): 017-022.

Asgarani E, Ghashghaei T, Soudi MR, Alimadadi N (2015) Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR based genetic diversity of *Xanthomonas* spp. and its relation to xanthan production. *Iranian Journal Microbiology* 7(1):38-44.

Assis RAB, Varani AM, Sagawa CHD, Patané JSL, Setubal JC, Uceda-Campos G, da Silva AM, Zaini PA, Almeida NF, Moreira LM, Dandekar AM (2021) A comparative genomic analysis of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains reveal hallmarks of mobile genetic elements in the adaptation and accelerated evolution of virulence. *Genomics* 113: 2513-2525.

Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, Wishart DSJNaR (2016) Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. 44: W147-W153.

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5):455–477.

Bansal K, Midha S, Kumar S, Patil PB (2017) Ecological and Evolutionary Insights into *Xanthomonas citri* Pathovar Diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 83(9).

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007) CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 315(5819):1709-1712.

Basim H, Minsavage GV, Stall RE, Wang JF, Shanker S, Jones JB (2005) Characterization of a unique chromosomal copper resistance gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:8284-8291.

Behlau F, Canteros BI, Minsavage GV, Jones JB, Graham JH (2011) Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and

Xanthomonas alfalfae subsp. *citrumelonis*. Applied and Environmental Microbiology 77:4089-4096.

Behlau F, Gochez AM, Jones JB, JTPP (2020) Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. 1-13.

Behlau F, Hong JC, Jones JB, Graham JHJP (2013) Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads. 103: 409-418.

Bhattarai K, Louws FJ, Williamson JD, Panthee DR (2017) Resistance to *Xanthomonas perforans* race T4 causing bacterial spot in tomato breeding lines. Plant Pathology 66(7): 1103-1109.

Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD (2005) Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology 151(8):2551-2561.

Büttner D (2016). Behind the lines—actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. FEMS Microbiology Reviews 40(6):894-937.

Büttner D, Bonas U (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. FEMS Microbiology Reviews 34(2):107-133.

Canteros BI (1999) Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: Mahadevan A (ed) Plant pathogenic bacteria. Proceedings of the International Society of Bacteriology. Centre for Advanced Study in Botany, University of Madras, Chennai 455-459.

Carisse O, Tremblay D-M, McDonald MR, Brodeur L, McRoberts N (2011) Management of *Botrytis* Leaf Blight of Onion: The Québec Experience of 20 Years of Continual Improvement. Plant Disease 95(5): 504-514.

Carvalho Bispo R, Oliveira GM, de Queiroz SOP, de Santos IMS, Pessoa ES (2018) Produtividade da cebola sob diferentes manejos de irrigação. Irriga 23(2): 262-272.

Cha JS, Cooksey DA (1991) Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(20): 8915–8919.

Choi HJ, Oh BU (2011) A partial revision of *Allium* (Amaryllidaceae) in Korea and north-eastern China. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 167(2): 153-211.

Christenhusz MJM, Byng JW (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261(3): 201.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2021) Batata, cebola e tomate: Caracterização da produção e da comercialização na Região Integrada de Desenvolvimento Econômico do Distrito Federal e Entorno - Ride-DF. <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3842-estudo-inedito-da-conab-analisa-dados-da-producao-de-hortalicas-no-df-e-entorno>

Constantin EC, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, Van Malderghem C, De Vos P, Cottyn B (2016) Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathology* 65(5):792-806.

COOPERCITRUS (2021) Cebola: Terceira hortaliça mais produzida no mundo. <http://www.coopercitrus.com.br/index.php?pag=revista&p=materia&codigo=6177>

Dar A, Sharma S, Mahajan R, Mushtaq M, Salathia A, Ahamad S, Sharma JP (2020) Overview of purple blotch disease and understanding its management through chemical, biological and genetic approaches. *Journal of Integrative Agriculture* 19.

Deb S, Ghosh P, Patel HK, Sonti RV (2020) Interaction of the *Xanthomonas* effectors XopQ and XopX results in induction of rice immune responses. *The Plant Journal*.

DERAL - Departamento de Economia Rural (2018) Olericultura - Análise da Conjuntura Agropecuária. SEAB- Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento Paraná https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2019-09/olericultura_2019_v1.pdf

DERAL - Departamento de Economia Rural (2020) Boletim Semanal, 25. SEAB- Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento Paraná https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-10/boletim_semanal_25_deral_23_outubro_2020.pdf

Develash RK, Sugha SK (1997) Incidence of onion downy mildew and its impact on yield. *Indian Phytopathology* 50: 127-129.

Du H, Li W, Wang Y, Yang W (2014) Identification of Genes Differentially Expressed between Resistant and Susceptible Tomato Lines during Time-Course Interactions with *Xanthomonas perforans* Race T3. *PLoS ONE* 9(3): e93476.

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (2018) Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina. <https://webdoc.epagri.sc.gov.br/sintese.pdf>

EPPO. *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (2016). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epp.12273>

Etana MB, Aga MC, Fufa BO (2019) Major Onion (*Allium cepa* L.) Production Challenges in Ethiopia: A Review. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 9(7).

FAOSTAT (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION STATISTICS) (2013) Food and agriculture organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

FAOSTAT (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION STATISTICS) (2021) Food and agriculture organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

Fargier E, Saux MFL, Manceau C (2011) A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. *Systematic and Applied Microbiology* 34(2):156-165.

Faruk I (2019) Efficacy of Organic Soil Amendments and a Nematicide for Management of Root-Knot Nematode *Meloidogyne* Spp. of Onion. *American Journal of Bioscience and*

Bioengineering 7(4): 57-64.

Fonseca NP, Patané JS, Varani AM, Felestrino ÉB, Caneschi WL, Sanchez AB, Cordeiro IF, Lemes CGDC, Assis RDaB, Garcia CCMJFIM (2019) Analyses of seven new genomes of *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* strains, causative agents of citrus canker B and C, show a reduced repertoire of pathogenicity-related genes. *Frontiers in Microbiology* 10: 2361.

Fujikawa T, Ishihara H, Leach JE, Tsuyumu S (2006) Suppression of Defense Response in Plants by theavrBs3/pthAGene Family of *Xanthomonas* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(3):342-349.

Gagnevin L, Bolot S, Gordon JL, Pruvost O, Verniere C, Robene I, Arlat M, Noel LD, Carrère S, Jacques MA, Koebnik R (2014) Draft Genome Sequence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* Strain CFBP 6369. *Genome Announcements* 2(4).

Gent DH, Al-Saadi A, Gabriel DW, Louws FJ, Ishimaru CA, Schwartz H F (2005) Pathogenic and Genetic Relatedness Among *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and Other Pathovars of *X. axonopodis*. *Phytopathology* 95(8): 918-925.

Gent DH, Lang JM, Bartolo ME, Schwartz HF (2005). Inoculum Sources and Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* in Colorado. *Plant Disease* 89(5): 507-514.

Gent DH, Lang JM, Schwartz HF (2005) Epiphytic Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on Leguminous Hosts and Onion. *Plant Disease* 89(6):558-564.

Gent DH, Schwartz HF (2005) Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with a plant activator, biological control agents, and copper bactericides. *Plant Disease* 89:631-639.

Gent DH, Schwartz HF, Ishimaru CA, Louws FJ, Cramer RA, Lawrence CB (2003) Polyphasic Characterization of *Xanthomonas* Strains from Onion. *Phytopathology* 94(2):184-195.

Gochez AM, Huguet-Tapia JC, Minsavage GV, Shantaraj D, Jalan N, Strauß A, Lahaye T, Wang N, Canteros BI, Jones JB, Potnis N (2018) Pacbio sequencing of copper-tolerant

Xanthomonas citri reveals presence of a chimeric plasmid structure and provides insights into reassortment and shuffling of transcription activator-like effectors among *X. citri* strains. BMC Genomics 19:(1).

Gonçalves PAS (2006) Manejo ecológico das principais pragas da cebola. In: Wordell Filho JA, Rowe E, Gonçalves PA. Manejo fitossanitário na cultura da cebola. Florianópolis: Epagri (226):168-189.

Gonçalves PAS, Araújo ER, Menezes Júnior FOG (2018) Agentes de controle biológico, óleo de nim e fertilizantes foliares no manejo de tripes e míldio em cebola. Global Science and Technology 11(1): 58-66.

Grissa I, Vergnaud G, Pourcel CJNaR (2007) CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. 35: W52-W57.

HORTIFRUTI BRASIL, CEPEA (2020) <https://www.hfbrasil.org.br/br/retrospectiva-2020-cebola.aspx>

Horvath DM, Stall RE, Jones JB, Pauly MH, Vallad GE, Dahlbeck D, Staskawicz BJ, Scott JW (2012) Transgenic Resistance Confers Effective Field Level Control of Bacterial Spot Disease in Tomato. PLoS ONE 7(8): e42036.

Humeau L, Roumagnac P, Picard Y, Robène-Soustrade I, Chiroleu F, Gagnevin L, Pruvost O (2006) Quantitative and molecular epidemiology of bacterial blight of onion in seed production fields. Phytopathology 96:1345-1354.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2020) Produção agrícola municipal 2018 <http://www.sidra.ibge.gov.br/>

Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. Journal of Bacteriology 169(12):5429-5433.

Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM (2002). Identification of a Novel Family of Sequence Repeats among Prokaryotes. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 6(1):23–33.

Jibrin MO, Potnis N, Timilsina S, Minsavage GV, Vallad GE, Roberts PD, Jones JB, Goss EM (2018) Genomic Inference of Recombination-Mediated Evolution in *Xanthomonas euvesicatoria* and *X. perforans*. *Applied and Environmental Microbiology* 84(13): e00136-18.

Jimenez HJ, da Silva ADF, Martins LSS, Carvalho R, Moraes Filho RM (2020) Comparative genomics plastomes of the Amaryllidaceae family species. *Scientia Plena* 16(6).

Kadota I, Uehara K, Shinohara H, Nishiyama K (2000) Bacterial Blight of Welsh Onion: A New Disease Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *allii* pv. Nov. *Journal of General Plant Pathology* 66: 310-315.

Kaur A, Bansal K, Kumar S, Sonti RV, Patil PB. Complete genome dynamics of a dominant-lineage strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* harbouring a novel plasmid encoding a type IV secretion system. (2019) *Access Microbiology* 1(9): e000063.

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran CJB (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *BMC Bioinformatics* 13: 15. doi:10.1186/1471-2107-13-15

Kim J-G, Choi S, Oh J, Moon JS, Hwang I (2006) Comparative analysis of three indigenous plasmids from *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. *Plasmid* 56(2): 79–87.

Kim J-G, Li X, Roden JA, Taylor KW, Aakre CD, Su B, Lalonde S, Kirik A, Chen Y, Baranage G, McLane H, Martin GB, Mudgett MB (2009) *Xanthomonas* T3S Effector XopN Suppresses PAMP-Triggered Immunity and Interacts with a Tomato Atypical Receptor-Like Kinase and TFT1. *The Plant Cell Online* 21(4): 1305-1323.

Konstantinidis KT, Tiedje JM (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(7): 2567-2572.

Koonin EV, Wolf YI (2008) Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Research* 36(21):6688-6719.

Lang JM, Gent DH, Schwartz HF (2007) Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. *Plant Summa Phytopathologia* 91:871-878.

Lang JM, Gent DH, Schwartz HF (2007) Management of *Xanthomonas* Leaf Blight of Onion with Bacteriophages and a Plant Activator. *Plant Disease* 91(7):871-878.

Leach A, Reiners S, Nault B (2020) Challenges in integrated pest management: A case study of onion thrips and bacterial bulb rot in onion. *Crop Protection* 105123.

Lee Y, Hendson M, Panopoulos N, Schroth M (1994) Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. *Journal of Bacteriology* 176:173-188.

Li N, Zhang X, Yang W (2019) Marker-assisted development and characterization of near-isogenic lines carrying the Rx4 gene for hypersensitive resistance to *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* race T3 in tomato. *Molecular Breeding* 39(12).

Li S, Wang Y, Wang S, Fang A, Wang J, Liu L, Zhang K, Mao Y, Sun W (2015) The Type III Effector AvrBs2 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* Suppresses Rice Immunity and Promotes Disease Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28(8):869-880.

Lipps SM, Samac DA (2021) *Pseudomonas viridiflava*: An internal outsider of the *Pseudomonas syringae* species complex. *Molecular Plant Pathology*.

Liu Q, Yuan M, Zhou Y, Li X, Xiao J, Wang S (2011) A paralog of the MtN3/saliva family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice. *Plant, Cell and Environment* 34(11): 1958-1969.

Liu X, Meng G, Wang M, Qian Z, Zhang Y, Yang W (2021) Tomato SIPUB24 enhances resistance to *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* race T3. *Horticulture Research* 8(1).

Lopes LHR, Boiteux LS, Rossato M, Aguiar FM, Fonseca MEN, Oliveira VR, Reis A (2021) Diversity of *Colletotrichum* species causing onion anthracnose in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 159:339-357.

Mahuku GS, Jara C, Henriquez MA, Castellanos G, Cuasquer J (2006) Genotypic Characterization of the Common Bean Bacterial Blight Pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by rep-PCR and PCR-RFLP of the Ribosomal Genes. *Journal of Phytopathology* 154(1): 35-44.

Manglli A, Tomassoli L, Tiberini A, Agosteo GE, Fontana A, Pappu HR, Albanese G (2020) A survey on the infection of Onion yellow dwarf virus and Iris yellow spot tospovirus in seed and bulb productions systems of onion in Calabria, Italy. *European Journal of Plant Pathology* 156: 767-778.

Marconatto LJ, Koehler HS, Marcuzzo LL (2017) Incidência de doenças em cebola armazenada na região do alto vale do Itajaí/SC. *Summa Phytopathologica* 43(3):243-245.

Marin T, Galvanin A, Lanza F, Behlau FJPP (2019) Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains. 68: 1088-1098.

Marouelli WA, Costa EL, Silva HR (2005) Irrigação da cultura da cebola. Embrapa Hortaliças, Circular Técnica 37

Marzu JC, Straley E, Havey MJ (2018) Genetic Analyses and Mapping of Pink-Root Resistance in Onion. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 143(6): 503-507.

Medina CA, Reyes PA, Trujillo CA, Gonzalez JL, Bejarano DA, Montenegro NA, Jacobs JM, Joe A, Restrepo S, Alfano JR, Bernal A (2017) The role of type III effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in virulence and suppression of plant immunity. *Molecular Plant Pathology* 19(3): 593-606.

Medini D, Donati C, Tettelin H, Massignani V, Rappuoli R (2005) The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics e Development* 15(6):589-594.

Mellano VJ, Cooksey DA (1988) Development of host range mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Applied and Environmental Microbiology* 54:884-889.

Mishra RK, Jaiswal RK, Kumar D, Saabale PR, Singh A (2014) Management of major diseases and insect pests of onion and garlic: A comprehensive review. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 6(11): 160-170.

Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E (2005) Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution* 60:174-182.

Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G (2000) Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology* 36:244-246.

Moreira LM, Almeida NF, Potnis N, Digiampietri LA, Adi SS, Bortolossi JC, da Silva AC, da Silva AM, de Moraes FE, de Oliveira JC, de Souza RF, Facincani AP, Ferraz AL, Ferro MI, Furlan LR, Gimenez DF, Jones JB, Kitajima EW, Laia ML, Leite Júnior RP, Nishiyama MY, Neto JR, Nociti LA, Norman DJ, Ostroski EH, Pereira Júnior HA, Staskawicz BJ, Tezza RI, Ferro JA, Vinatzer BA, Setubal JC (2010) Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. *BMC Genomics* 11(1):238.

Nakata A, Amemura M, Makino K (1989) Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of Bacteriology* 171(6): 3553-3556.

Nakato GV, Studholme DJ, Blomme G, Grant M, Coutinho TA, Were EM, Wicker E, Mahuku G (2020) SNP-based genotyping and whole-genome sequencing reveal previously unknown genetic diversity in *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* causal agent of banana *Xanthomonas* wilt, in its presumed Ethiopian origin. *Plant Pathology* 70(3).

Nanda S, Chand SK, Mandal P, Tripathy P, Joshi RK (2016) Identification of Novel Source of Resistance and Differential Response of Allium Genotypes to Purple Blotch Pathogen, *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri. The Plant Pathology Journal 32(6): 519-527.

Neto JR, Malavolta Júnior VA, Cardelli MA, Sinigaglia C (1987). Ocorrência de uma nova doença bacteriana em cebola no estado de São Paulo. Summa Phytopathologica 13:10.

Nga NTT, Tran TN, Holtappels D, Kim Ngan NL, Hao NP, Vallino M, Tien DTK, Khanh-Pham NH, Lavigne R, Kamei K, Wagemans J, Jones JB (2021) Phage Biocontrol of Bacterial Leaf Blight Disease on Welsh Onion Caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. Antibiotics 10(5):517.

Niu X-N, Wei Z-Q, Zou H-F, Xie G-G, Wu F, Li K-J, Jiang W, Tang J-L, He Y-Q (2015) Complete sequence and detailed analysis of the first indigenous plasmid from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. BMC Microbiology 15:(1).

Ntambo MS, Meng JY, Rott P, Royer M, Lin LH, Zhang HL, Gao SJPP (2019) Identification and characterization of *Xanthomonas albilineans* causing sugarcane leaf scald in China using multilocus sequence analysis. 68: 269-277.

Nunez JJ, Gilbertson RL, Meng X, Davis RM (2002) First report of *Xanthomonas* leaf blight of onion in California. Plant Disease 86:330.

Ochiai H, Inoue Y, Takeya M, Sasaki A, Kaku H (2005) Genome Sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Suggests Contribution of Large Numbers of Effector Genes and Insertion Sequences to Its Race Diversity. Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ 39(4):275-287.

O'Garro LW, Paulraj LP (1997) Onion leaf blight caused by *Xanthomonas campestris*: alternative hosts and resistant onion genotypes. Plant Disease 81:978-982.

Ogunjobi AA, Fagade OE, Dixon AGO (2010) Comparative analysis of genetic variation among *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* isolated from the western states of Nigeria using RAPD and AFLP. Indian Journal of Microbiology 50(2):132-138.

Okechalu OB, Zwalnan ND, Agaba OA, Danahap LS (2020) The efficacy of aqueous leaf extracts of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit and *Ocimum basilicum* (L.) in the control of *Meloidogyne* spp infecting Onion, *Allium cepa* (L.). Journal of Biological Research e Biotechnology 18(1): 1111-1119.

Orio AGA, Brücher E, Ducasse DA (2016) A strain of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* shows a specific antagonistic activity against the soil-borne pathogen of onion *Setophoma terrestris*. European Journal of Plant Pathology 144(1): 217-223.

Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J (2015) Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. Bioinformatics 31(22): 3691-3693.

Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz, P, Tyson GW (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome research 25(7):1043-1055.

Pereira IS, Tebaldi ND (2013) Occurrence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* causing onion bacterial blight in Minas Gerais State, Brazil. Summa Phytopathologica 39(4):297.

Picard Y, Roumagnac P, Legrand D, Humeau L, Robène-Soustrade I, Chiroleu F, Gagnevin L, Pruvost O (2008) Polyphasic Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* Associated with Outbreaks of Bacterial Blight on Three *Allium* Species in the Mascarene Archipelago. Phytopathology 98(8): 919-925.

Pierry PM, Uceda-Campos G, Feitosa-Junior OR, Martins-Junior J, de Santana WO, Coletta-Filho HD, Zaini PA, da Silva AM (2020) Genetic Diversity of *Xylella fastidiosa* Plasmids Assessed by Comparative Genomics. Tropical Plant Pathology.

Poirier S, Dauphinais N, Van der Heyden hervé, Véronneau P-Y, Bélair G, Gravel V, Mimee B (2018) Host range and genetic characterization of *Ditylenchus dipsaci* populations from eastern Canada. Plant Disease 103(3).

Popov G, Fraiture M, Brunner F, Sessa G (2016) Multiple *Xanthomonas euvesicatoria* Type III Effectors Inhibit flg22-Triggered Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29(8): 651–660.

Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G (2005) CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151(3):653-663.

Qin J, Zhou X, Sun L, Wang K, Yang F, Liao H, Rong W, Yin J, Chen H, Chen X, Zhang J (2018) The *Xanthomonas* effector XopK harbours E3 ubiquitin-ligase activity that is required for virulence. *New Phytologist*

Rademaker J, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, de Bruijn FJ (2000) 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* 50(2): 665-677.

Restrepo S, Vélez CM, Verdier V (2000) Measuring the Genetic Diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Within Different Fields in Colombia. *Phytopathology* 90(7):683-690.

Richard D, Boyer C, Javegny S, Boyer K, Grygiel P, Pruvost O, Rioualec AL, Rakotobe V, Iotti J, Picard R, Vernière C, Audusseau C, François C, Olivier V, Moreau A, Chabirand A (2016) First report of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A causing Asiatic citrus canker in Martinique, France. *Plant Disease* 100(9): 1946.

Richard D, Tribot N, Boyer C, Terville M, Boyer K, Javegny S, Roux-Cuvelier M, Pruvost O, Moreau A, Chabirand A, Vernière C (2017) First report of copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A causing Asiatic citrus canker in Réunion, France. *Plant Disease* 101(3): 503.

Richter M, Rosselló-Móra RJ, POTNaOS (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *106: 19126-19131.*

Rivera-Méndez W, Brenes-Madriz J, Alvarado-Marchena L (2021) Effect of *Setophoma terrestris*, *Sclerotium cepivorum*, and *Trichoderma* spp. on in vitro onion (*Allium cepa*) root tissues and the final yield at the field. *European Journal of Plant Pathology*, 160: 53-65.

Roach R, Mann R, Gambley CG, Chapman T, Shivas RG, Rodoni B (2019) Genomic sequence analysis reveals diversity of Australian *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli. *BMC Genomics* 20(1).

Roach R, Mann R, Gambley CG, Shivas RG, Chapman T, Rodoni B (2020) Pathogenicity and copper tolerance in Australian *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot. *Crop Protection* 104923.

Robène I, Perret M, Jouen E, Escalon A, Maillot MV, Chabirand A, Moreau A, Laurent A, Chiroleu F, Pruvost O (2015) Development and validation of a real-time quantitative PCR assay to detect *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* from onion seed. *Journal of Microbiological Methods* 114:78-86

Robène-Soustrade I, Legrand D, Gagnevin L, Chiroleu F, Laurent A, Pruvost O (2010) Multiplex nested PCR for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* from onion seeds. *Applied and Environmental Microbiology* 76:2697-2703.

Rodriguez RLM, Grajales A, Arrieta-Ortiz M, Salazar C, Restrepo S, Bernal A (2012) Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. *BMC Microbiology* 12(1):43.

Rostøl JT, Marraffini LJCH, *Microbe* (2019) (Ph) ighting phages: how bacteria resist their parasites. *Cell Host e Microbe* 25(2):184-194.

Roumagnac P (2004) Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(1):15-24.

Roumagnac P, Gagnevin L, Pruvost O (2000) Detection of *Xanthomonas* sp., the causal agent of onion bacterial blight, in onion seeds using a newly developed semi-selective isolation medium. *European Journal of Plant Pathology* 106:867-877.

Roumagnac P, Pruvost O, Chiroleu F, Hughes G (2004) Spatial and temporal analyses of bacterial blight of onion caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. *Phytopathology* 94:138-146.

Rubel M, Robin A, Natarajan S, Vicente J, Kim H-T, Park J-I, Nou I-S (2017) Whole-Genome Re-Alignment Facilitates Development of Specific Molecular Markers for Races 1 and 4 of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the Cause of Black Rot Disease in Brassica oleracea. *International Journal of Molecular Sciences* 18(12): 2523.

Ryan RP, Vorhölter F-J, Potnis N, Jones JB, Van Sluys M-A, Bogdanove AJ, Dow JM JNRM (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Reviews Microbiology* 9(5): 344-355.

Sabiu S, Madende M, Ajao AA, Aladodo RA, Nurain, IO, Ahmad JB (2019) The Genus *Allium* (Amaryllidaceae: Alloideae): Features, Phytoconstituents, and Mechanisms of Antidiabetic Potential of *Allium cepa* and *Allium sativum*. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* 9: 137-154.

Sanders FH, Langston Jr DB, Brock JH, Gitaitis RD, Curry DE, Torrance RL (2003) First Report of a Leaf Blight of Onion Caused by *Xanthomonas* spp. in Georgia. *Plant Disease Journal* 84:749.

Schulze S, Kay S, Büttner D, Egler M, Eschen-Lippold L, Hause G, Kruger A, Lee J, Muller O, Scheel D, Szczesny R, Thieme F, Bonas U (2012) Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytologist* 195(4): 894–911.

Schwartz HF, Otto K (2000) First report of leaf blight of onion caused by *Xanthomonas campestris* in Colorado. *Plant Disease* 84:922.

Schwartz HF, Otto KL, Gent DH (2003). Relation of Temperature and Rainfall to Development of *Xanthomonas* and *Pantoea* Leaf Blights of Onion in Colorado. *Plant Disease* 87(1):11-14.

Seemann T (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30(14):2068-2069.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding JJMSB (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *7*: 539.

Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM (2015) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31(19):3210-3212.

Singer AU, Schulze S, Skarina T, Xu X, Cui H, Eschen-Lippold L, Egler M, Srikumar T, Raught B, Lee J, Scheel D, Savchenko A, Bonas U (2013) A Pathogen Type III Effector with a Novel E3 Ubiquitin Ligase Architecture. *PLoS Pathogens* 9(1): e1003121.

Snipen L, Ussery DW (2010) Standard operating procedure for computing pangenome trees. *Standards in Genomic Sciences* 2(1):135-141.

Song C, Yang B (2010) Mutagenesis of 18 Type III Effectors Reveals Virulence Function of XopZPXO99 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(7).

Soumia PS, Karuppaiah V, Singh M (2017) Integrated management of pests on onion and garlic. *Indian Horticulture*.

Steentjes MBF, Tonn S, Coolman H, Langebeeke S, Scholten OE, van Kan JAL (2021) Visualization of Three Sclerotiniaceae Species Pathogenic on Onion Reveals Distinct Biology and Infection Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 22(4): 1865.

Stoyanova M, Moncheva P, Bogatzevska N (2012) Occurrence of phytopathogenic bacteria of Enterobacteriaceae family in bulbs of cultural and ornamental plants. *Science and Technologies* 2(6).

Sundin G, Jones A, Fulbright D (1989) Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. *Phytopathology* 79:861-865.

Sundin GW (2007) Genomic insights into the contribution of phytopathogenic bacterial plasmids to the evolutionary history of their hosts. *Annual Review of Phytopathology* 45(1):129-151.

Tanović B, Koščica M, Hrustić J, Mihajlović M, Trkulja V, Delibašić G (2019) *Botrytis squamosa*: The causal agent of onion leaf blight in Bosnia and Herzegovina. *Pesticid Fitomedicina* 34: 9-17.

Tatusova T, Dicuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J (2016) NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *PLoS* 11(12): e0162241.

Taylor KW, Kim J-G, Su XB, Aakre CD, Roden JA, Adams CM, Mudgett MB (2012) Tomato Tft1 Is Required for PAMP-Triggered Immunity and Mutations that Prevent T3S Effector XopN from Binding to Tft1 Attenuate *Xanthomonas* Virulence. *PLoS Pathogens* 8(6): e1002768.

Teper D, Salomon D, Sunitha S, Kim J-G, Mudgett MB, Sessa G (2014) *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopQ interacts with tomato and pepper 14-3-3 isoforms to suppress effector-triggered immunity. *The Plant Journal* 77(2): 297-309.

Teper D, Sunitha S, Martin GB, Sessa G (2015) Five *Xanthomonas* type III effectors suppress cell death induced by components of immunity-associated MAP kinase cascades. *Plant Signaling & Behavior* 10(10): e1064573.

Teshika JD, Zakariyyah AM, Toorabally Z, Zengin G, Rengasamy KR, Pandian SK, Mahomoodally FM (2018) Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1-75.

Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, ... Fraser CM (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial “pan-genome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(39):13950-13955.b

Timilsina S, Potnis N, Newberry EA, Liyanapathirana P, Iruegas-Bocardo F, White FF, Goss EM, Jones JB (2020) *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology* 18:415-427.

Tosta AL, Marouelli WA, Oliveira VR, Seleguini A (2014) Resposta de genótipos de cebola a níveis crescentes de deficit hídrico. *Horticultura Brasileira* 31: S2365-S2372.

Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings JIJOS, *Microbiology E* (1995) Reclassification of *xanthomonas*. 45: 472-489.

Vauterin L, Swings J (1997) Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19(2): 77-82.

Versalovic J, Schneider M, De Bruijn F, Lupski JRJMIM, *Biology C* (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. 5: 25-40.

Vicente JG, Conway J, Roberts SJ, Taylor JD (2001) Identification and Origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races and Related Pathovars. *Phytopathology* 91(5): 492-499.

Voloudakis AE, Bender CL, Cooksey DA (1993) Similarity between copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1627-1634.

Voloudakis AE, Reignier TM, Cooksey DA (2005) Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:782-789.

Wayne L, Brenner D, Colwell R, Grimont P, Kandler O, Krichevsky M, Moore L, Moore W, Murray R, Stackebrandt EJJOS, Microbiology E (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. 37: 463-464.

Webster J, Bogema D, Chapman TA (2020). Comparative Genomics of *Xanthomonas citri* pv. *citri* A* Pathotype Reveals Three Distinct Clades with Varying Plasmid Distribution. *Microorganisms* 8(12):1947.

Wick RR., Judd LM., Gorrie CL, Holt KE (2017) Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology* 13(6): e1005595.

Wheeler EJ, Mashayekhi S, McNeal DW, Columbus JT, Pires JC (2013) Molecular systematics of *Allium* subgenus *Amerallium* (Amaryllidaceae) in North America. *American Journal of Botany* 100(4): 701-711.

Wordell Filho A, Boff P (2006) Doenças de origem parasitária. In: Wordell Filho A, Rowe E, Gonçalves PAS, Debarba F, Boff P, Thomazelli LF. Manejo fitossanitário da cebola. Florianópolis: EPAGRI, 19-126.

Yanti Y (2015). Peroxidase Enzyme Activity of Rhizobacteria-introduced Shallots Bulbs to Induce Resistance of Shallot towards Bacterial Leaf Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv *allii*). *Procedia Chemistry* 14:501-507.

Young JM, Park D-C, Shearman H, Fargier EJS, Microbiology A (2008) A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 366-377.

Young JM, Wilkie JP, Park D-C, Watson DRW (2010) New Zealand strains of plant pathogenic bacteria classified by multi-locus sequence analysis; proposal of *Xanthomonas dyeisp.* nov. *Plant Pathology* 59(2):270-281.

Zaid AM, Bonasera JM, Beer SV (2012) OEM - A new medium for rapid isolation of onion-pathogenic and onion-associated bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 91(3): 520-526.

Zamani Z, Bahar M, Jacques MA, Lak MR, Akhavan AJWJOM, Biotechnology (2011) Genetic diversity of the common bacterial blight pathogen of bean, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, in Iran revealed by rep-PCR and PCR–RFLP analyses. World Journal of Microbiology and Biotechnology 27: 2371-2378.

Zhang X, Li N, Liu X, Wang J, Zhang Y, Liu D, Wang Y, Cao H, Zhao B, Yang W (2020) Tomato protein Rx4 mediates the hypersensitive response to *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* race T3. The Plant Journal 105(6): 1630-1644.