



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

***Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*: VARIABILIDADE E
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DETECÇÃO POR PCR**

ANGELICA RODRIGUES ALVES

ANGELICA RODRIGUES ALVES

***Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*: VARIABILIDADE E DESENVOLVIMENTO DE
MÉTODO DE DETECÇÃO POR PCR**

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

Coorientadora

Dra. Alice Maria Quezado Duval

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL**

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Angelica Rodrigues

Xanthomonas euvesicatoria pv. *allii*: variabilidade e desenvolvimento de método de detecção por PCR / Angelica Rodrigues Alves

Brasília, 2022.

Número de páginas p.77.

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

1. Variabilidade - Filogenia.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*: variabilidade e desenvolvimento de método de detecção por PCR.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família e amigos que
sempre acreditaram em mim.*

**“Always walk through life as if you have
something new to learn, and you will.”**

Vernon Howard

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças para caminhada.

A minha família, José e Valdemira meus pais, Jakson e Elisangela meus irmãos, por todo apoio e incentivo a lutar pelos meus objetivos e principalmente por não deixar desistir diante dos obstáculos. E em especial a meu sobrinho Pietro por todo amor.

Agradeço aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília pelos ensinamentos e por transmitirem seu conhecimento possibilitando a realização de um sonho, Mestrado em Fitopatologia.

Em especial agradeço ao meu orientador professor Maurício Rossato por toda paciência, dedicação, disposição, compreensão e principalmente pelos ensinamentos e estímulo de sempre buscar fazer o meu melhor. Agradeço Imensamente!

Agradeço a Dra. Alice Maria Quezado Duval minha coorientadora, pela disponibilização dos isolados para o estudo, os quais pertencem à coleção de trabalho de Bactérias Fitopatogênicas de Hortaliças da Embrapa Hortaliças.

Agradeço a Capes pela concessão da bolsa e financiamento desse projeto e a Universidade de Brasília pela oportunidade de expandir minha formação.

Agradeço a meus amigos Gabriel, Izamara, Gustavo, Simone, Gislaine, Angel, Gyovanni, Sarah Maria e Tereza pelo incentivo, apoio e encorajamento mesmo que de longe, dando forças para se manter firme na realização desse sonho.

Agradeço a meus amigos do PPG - FIT, Leila, Luciellen, Isabella, Izaías, Erivaldo e Ian Carlos por toda ajuda durante o desenvolvimento deste projeto e principalmente pela amizade nesses dias difíceis.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Professor Maurício Rossato** e coorientação da **Doutora Alice Maria Quezado Duval**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

***Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*: VARIABILIDADE E DESENVOLVIMENTO DE
MÉTODO DE DETECÇÃO POR PCR**

ANGELICA RODRIGUES ALVES

DISSERTAÇÃO APROVADA em 05/09/2022 por:

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
2022

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO GERAL	vi
GENERAL ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA	8
A CULTURA	8
A QUEIMA BACTERIANA	12
O PATÓGENO (<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>).....	15
DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Xanthomonas</i>	16
Objetivo geral.....	19
Objetivos específicos.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
Coleção de isolados.....	20
Extração de DNA	22
Identificação dos novos isolados a nível de gênero por PCR.....	23
BOX - PCR e seleção de haplótipos.....	24
<i>Multilocus sequence analysis</i> (MLSA)	25
Multiplex Nested PCR para detecção da patovar <i>allii</i>	29
LAMP para detecção de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	29
Desenho de Primers.....	30
Teste dos <i>primers</i> desenhados	31
Otimização das reações	31
Ensaio de Sensibilidade.....	32
Especificidade determinada frente à microbiota de cebola	32
3. RESULTADOS.....	32
Identificação dos isolados a nível de gênero por PCR	32
BOX - PCR e seleção de haplótipos.....	33
<i>Multilocus sequence analysis</i> (MLSA)	35
Multiplex Nested PCR.....	38
LAMP para <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	38
Desenho de <i>primers</i>	39
Avaliação por Primer Blast dos <i>primers</i> desenhados	41
Teste dos <i>primers</i> desenhados e otimização da reação	41
Avaliação dos <i>primers</i> desenhados com a microbiota de plantas de cebola	46
Otimização das reações	49

Sensibilidade dos <i>primer</i> desenhados.....	49
4. DISCUSSÃO	50
5. CONCLUSÃO	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de <i>Xanthomonas</i> utilizados neste estudo.....	21
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados neste estudo, com suas respectivas sequências de nucleotídeos e referências.....	23
Tabela 3. Espécies, isolados e acessos do gênero <i>Xanthomonas</i> do GenBank utilizados para as análises filogenéticas.....	27
Tabela 4. Isolados e haplótipos de <i>Xanthomonas</i> de cebolas com queima foliar identificados a partir da análise visual do BOX-PCR.....	34
Tabela 5. Haplótipos e isolados representativos usados em MLSA e suas respectivas hospedeiras e cultivares de origem.....	35
Tabela 6. <i>Primers</i> desenhados para este estudo com suas respectivas sequências de nucleotídeos, família gênica e gene.....	40
Tabela 7. Pares de <i>primers</i> desenhados para <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i> que obtiveram hits pelo Primer Blast.....	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Colônias isoladas a partir de folhas sintomáticas de cebola (*Allium cepa*) em Unai-MG, 2021. Foto: Arquivo pessoal.....21
- Figura 2.** Eletroforese da PCR, com os *primers* X-gumD F7 e X-gumD R7, de isolados coletados em plantas de cebola apresentando queima foliar no cerrado brasileiro. M: marcador 1 Kb Plus Invitrogen®. Fragmento gerado de 350 bp. N: controle negativo.....33
- Figura 3.** Eletroforese com os perfis de BOX-PCR com o *primer* BOX-A1R da coleção com isolados representativos dos haplótipos anteriormente descritos por (Ferreira, 2021) e os novos isolados de *Xanthomonas* de campos de cultivo de cebola de regiões produtora no cerrado brasileiro. M: marcador 1 Kb Plus da Invitrogen®. N: controle negativo.....34
- Figura 4.** Análise filogenética por inferência Bayesiana com sequencias concatenadas dos genes *housekeeping dnaK* (Heat shock protein 70), *gyrB* (Gyrase subunit B) *fyuA* (TonB - dependent transporter) e *rpoD* (RNA polymerase sigma -70 factor) de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* com 2 milhões de gerações e modelo GTR+G+I. Isolados coletados em 2021, objetos deste estudo, estão identificados em vermelho.....37
- Figura 5.** Eletroforese da Multiplex Nested PCR com os *primers* Nxaa1U, Nxaa1L, Nxaa2U e Nxaa2L, com os isolados haplótipos da coleção de *X. euvesicatoria* pv. *allii*. M: marcador 1 Kb Plus da Invitrogen®. N: controle negativo.....38
- Figura 6.** Eletroforese com todos os isolados tipos dos haplótipos com 2,5 ng de DNA por reação e isolado tipo (IBSBF 1770) de *X. euvesicatoria* pv. *allii* (Cebola) e isolado tipo de *X. euvesicatoria* (Tomate). M: marcador 1 Kb Plus da Invitrogen®. N: controle negativo.....39
- Figura 7.** Eletroforese de quatro pares de *primers*, 5038_ID11, 5054_ID62, 5038_ID4 e 5038_ID9 na temperatura de anelamento de 57 °C com três isolados da coleção de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, A-2018-1, A-2018-3 e A-2019-04. M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.....42
- Figura 8.** Eletroforese de quatro pares de *primers*, 1993_ID24, 2475_ID60 e 1993_ID61 com três isolados da coleção de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, A-2018-1, A-2018-3 e A-2019-04 para teste de especificidade dos *primers* na temperatura de anelamento de 57 °C. M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.....42
- Figura 9.** Eletroforese de três conjuntos de *primers*, 5038_ID4, 5038_ID11 e 1993_ID24 com três isolados da coleção, A-2018-1, A-2018-3 e A-2019-04 com a temperatura de anelamento de 62 °C. M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.....43
- Figura 10.** Eletroforese de quatro conjuntos de *primers*, 2475_ID60, 1993_ID61 e 5054_ID62 na temperatura de anelamento de 62 °C com três isolados da coleção, A-2018-1, A-2018-3 e A-2019-04. M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.....44
- Figura 11.** Eletroforese da amplificação de isolados haplótipos, com temperatura de anelamento a 62 °C, utilizando os *primers* 5038_ID11 F/R. M: Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N: Controle Negativo.....44
- Figura 12.** Eletroforese da amplificação de isolados haplótipos, com temperatura de anelamento a 62 °C, utilizando os *primers* 5054_ID62 F/R. M: Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N: Controle Negativo.....45

Figura 13. Eletroforese da amplificação de isolados haplótipos, com temperatura de anelamento a 69 °C, utilizando os <i>primers</i> 5038_ID9 F/R. M: Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N: Controle Negativo.....	45
Figura 14. Eletroforese da PCR com o par de <i>primers</i> XgumD F7/R7 com isolados da microbiota de folha de cebola. Isolados de 1 a 8 proveniente de macerado de folha, isolado IBSBF 1770 controle positivo de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i> . M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.....	47
Figura 15. Eletroforese da avaliação do par de <i>primers</i> 5038_ID9 com a microbiota de folha de cebola. Isolados de 1 a 8 proveniente de macerado de folha, isolado IBSBF 1770 controle positivo de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i> . M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.....	47
Figura 16. Eletroforese da avaliação do par de <i>primers</i> 5038_ID11 com a microbiota de folha de cebola. Isolados de 1 a 8 proveniente de macerado de folha, isolado IBSBF 1770 controle positivo de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i> . M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.....	48
Figura 17. Eletroforese da avaliação do par de <i>primers</i> 5054_ID62 com a microbiota de folha de cebola. Isolados de 1 a 8 proveniente de macerado de folha, isolado IBSBF 1770 controle positivo de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i> . M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.....	48
Figura 18. Eletroforese a 1% com amplificação a 69 °C, utilizando o par de <i>primers</i> 5038_ID9 F/R com todos os haplótipos e ajuste da reação e configuração do termociclador para PCR convencional. M: Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N: Controle Negativo.....	49
Figura 19. Eletroforese do teste de sensibilidade do par de <i>primers</i> 5038_ID9 utilizando entre 50.000, 5.000, 500, 50, 5 e 0,5 pg de DNA extraído do isolado A-2018-1 de <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i> . M: Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N – Controle Negativo.....	50

RESUMO GERAL

ALVES, Angelica Rodrigues. *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*: **variabilidade e desenvolvimento de método de detecção por PCR**. 2022. 77p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma importante hortaliça cultivada desde a antiguidade e distribuída mundialmente. É a terceira hortaliça mais cultivada no mundo. Desde 2018 tem sido observado um aumento na ocorrência de queima bacteriana em campos de cultivo de cebola nos estados de Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal, ameaçando a qualidade e a produtividade da cebola no Cerrado brasileiro. Foram coletadas amostras sintomáticas de folhas e os isolados bacterianos obtidos pertencente à coleção de Bactérias Fitopatogênicas de Hortaliças da Embrapa Hortaliças, utilizados para ampliar os conhecimentos sobre o patógeno. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar os isolados coletados em 2021 e desenvolver um novo método de detecção por PCR para *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* (*Xea*). Os isolados tiveram seu gênero confirmado como *Xanthomonas* pela amplificação do gene *gumD* e a variabilidade intraespecífica analisada por BOX-PCR. Haplótipos definidos por BOX-PCR foram selecionados para o sequenciamento de quatro regiões genômicas para *Multilocus sequence analysis* (MLSA). Para o desenvolvimento de um novo método de detecção, os seis genomas de *Xea*, disponíveis no GenBank foram reanotados, e por subtração *in silico*, buscou-se genes presentes entre todos os isolados e ausentes para demais espécies e patovares de *Xanthomonas*. Para o desenho de *primers*, as sequências dos genes exclusivos foram usadas no software NEB LAMP Primer Design Tool. Os *primers* sintetizados foram avaliados quanto à amplificação de todos os isolados de *Xea*, sensibilidade e especificidade com microbiota isolada de folha de cebola. Todos os isolados de cebola pertenciam ao gênero *Xanthomonas* e por BOX-PCR foi possível identificar a presença de quatro haplótipos na coleção de 2021 além dos oito haplótipos definidos em trabalho prévio com isolados dos anos 2018/2019. MLSA revelou o pertencimento dos isolados a *Xea*, os isolados de 2021 agruparam aos de 2018/2019, com elevados valores de probabilidade posterior, porém o isolado A-2021-01 agrupou em um clado mais distante, com isolados da patovar *alfalfae*. Somente o par de *primers* 5038_ID9 amplificou somente o fragmento esperado de 200 pb, com sensibilidade de amplificação de concentrações iguais ou superiores à 50 pg DNA. Especificidade foi confirmada pela ausência de amplificação com DNA de oito isolados da microbiota de folhas de cebola.

Palavras-chave: *Allium cepa*, BOX-PCR, MLSA, *primers* específicos

Orientador - Dr. Maurício Rossato - Universidade de Brasília

Coorientadora - Dra. Alice Maria Quezado Duval - Embrapa Hortaliças

GENERAL ABSTRACT

ALVES, Angelica Rodrigues. *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*: variability and development of PCR detection method. 2022. 77p. Dissertation (Master in Plant Pathology) - Universidade de Brasilia, Brasilia, DF.

Onion (*Allium cepa* L.) is an important vegetable cultivated since ancient times and distributed worldwide. It is the third most cultivated vegetable in the world. Since 2018, an increase in the occurrence of bacterial blight has been observed in onion fields in the states of Goiás, Minas Gerais and the Distrito Federal, threatening onion quality and productivity in the Brazilian Cerrado. Symptomatic leaf samples and bacterial isolates obtained from the Embrapa Vegetables collection of Phytopathogenic Bacteria of Vegetables were collected, used to increase knowledge about the pathogen. Thus, the objective of this work was to identify and characterize the isolates collected in 2021 and to develop a new PCR detection method for *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* (*Xea*). The isolate had their gender confirmed by the amplification of the XgumD gene and the intraspecific variability analyzed by the BOX-PCR. Haplotypes defined by BOX-PCR were selected for sequencing four genomic regions for multilocus sequence analysis (MLSA). For the development of a new detection method, the six genomes of *Xea*, available in GenBank, were re-annotated, and by *in silico* subtraction, genes present among all isolates and absent for other *Xanthomonas* species and pathovars were searched. For primers design, the unique gene sequences were used in the software NEB LAMP Primer Design Tool. The synthesized primers were evaluated for the amplification of all *Xea* isolates, sensitivity and specificity with microbiota isolated from onion leaf. All onion isolates belonged to the genus *Xanthomonas* and by BOX-PCR it was possible to identify the presence of four haplotypes in the 2021 collection in addition to the eight haplotypes defined in a previous work with isolates from the years 2018/2019. MLSA revealed that the isolates belong to *Xea*, the 2021 isolates grouped with the 2018/2019 isolates, with high posterior probability values, but the A-2021-01 isolate clustered in a more distant clade with isolates from the *alfalfae* pathovar. Only the 5038_ID9 primer pair amplified only the expected 200 pb fragment, with amplification sensitivity of concentrations equal to or greater than 50 pg of DNA. Specificity was confirmed by the absence of amplification with DNA of eight isolates from the microbiota on onion leaves.

Keywords: *Allium cepa*, BOX-PCR, MLSA, specific primers

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

Master's co-advisor - Dra. Alice Maria Quezado Duval - Embrapa Hortaliças

1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

A CULTURA

A cebola, *Allium cepa* L., é uma das espécies mais importantes da família Amaryllidaceae, que compreende cerca de 75 gêneros botânicos (Christenhusz e Byng, 2016). O centro de origem e domesticação é provavelmente localizado no continente Asiático, no entanto, a América do Norte é considerada o segundo centro de diversidade e domesticação (Choi e Oh, 2011; Jimenez et al. 2020). A cebola é uma das plantas cultivadas mais antigas e possui ampla distribuição, sendo cultivada em mais de 170 países (Teshika et al. 2018). A China se destaca como maior produtor mundial, seguido da Índia e Egito (FAOSTAT, 2022).

No ano de 2020, o Brasil teve uma produção de 1.495.618 toneladas de cebola em uma área plantada de 47.504 hectares, ficando entre os vinte maiores produtores mundiais (FAOSTAT, 2022). Os estados de Santa Catarina, Bahia e São Paulo se destacam na produção nacional com 28,1%, 15,0% e 12,1% respectivamente (IBGE, 2020). As maiores produtividades são observadas em áreas de Cerrado das regiões centro-oeste e sudeste, com destaque para o estado de Goiás com 65.527 Kg/ha, Minas Gerais com 58.330 Kg/ha e Distrito Federal com 50.000 Kg/ha, que estão acima da média brasileira de 31.495 Kg/ha (IBGE, 2020).

A produção brasileira de cebola é destinada ao consumo interno, mas ainda é necessária a importação do produto de outros países. No ano de 2020 o Brasil importou 155,09 mil toneladas da Argentina, o que representou 78,4% do total de importação de cebola, seguido de 23,14 mil toneladas do Chile e 14,3 mil toneladas da Holanda, que juntos somam cerca de 19,0% do total de importação (EPAGRI, 2021).

O grande consumo dessa hortaliça se deve à sua utilização *in natura* no preparo de alimentos nas mais diferentes formas, assados, grelhados, fritos, refogados, em conserva e em saladas (Adeoti et al. 2021). Também pode ser utilizada seca, como condimento no preparo de alimentos na forma de flocos ou em pó. No entanto, no Brasil a destinação da produção de

bulbos para industrialização para preparo de pastas, pickles e na forma desidratada ainda é incipiente (Zhao et al. 2021).

Com o decorrer dos avanços nos estudos acerca da importância do consumo da cebola para a saúde humana descobriu-se que a cebola possui uma gama de compostos bioativos/fitoquímicos como fenólicos, organossulfúricos, saponinas e polissacarídeos. Estes compostos conferem propriedades nutricionais benéficas à saúde humana atuando como anti-inflamatórios, anticancerígenos, antiobesidade, antioxidantes, neuroprotetoras, antidiabéticas, imunomoduladores, antialérgicas, protetoras cardiovasculares, protetora hepatorenal, protetora do sistema digestivo e protetora respiratória (Lamson e Brignall, 2000; Nemeth e Piskula, 2007; Suleria et al. 2013; Nicastro et al. 2015; Bahadoran et al. 2017; Marrelli et al. 2018; Kazimierczak et al. 2021; Ren e Zhou 2021; Taglienti et al. 2021).

A recomendação da utilização da cebola para melhoria da saúde humana não é recente, pois há relatos datados de 1550 a.C., onde médicos egípcios indicavam seu consumo para tratar ou prevenir diversas enfermidades (Taglienti et al. 2021).

A cebola também possui importância socioeconômica, visto que é a terceira hortaliça mais produzida no mundo, atrás somente da batata e tomate (Teshika et al. 2018). Por ser uma hortícola, sua produção está associada em grande parte à agricultura familiar, contribuindo não somente para a formação da renda dos produtores, mas também com o fornecimento de empregos no campo devido à sua exigência de mão-de-obra para a realização do plantio, tratamentos culturais e colheita, o que colabora com a permanência das famílias no campo (Coopercitrus, 2021). No estado de Santa Catarina, o maior produtor de cebola do país, segundo a EPAGRI (2018) a cebolicultura foi fonte de renda para mais de oito mil famílias residentes na região do Vale do Itajaí, que compreende o município de Ituporanga, o maior produtor de cebola do estado (CEPEA, 2020).

No Cerrado da região Centro-Oeste o município de Cristalina - GO, que pertence à RIDE-DF (Região Integrada de Desenvolvimento do Distrito Federal e Entorno) se destaca como maior produtor de cebola da região compreendendo 11,20 % da produção total de cebola do país (CONAB, 2021). Este fato se deve ao elevado nível tecnológico empregado em lavouras de grande extensão comumente empregadas nessas regiões (Vilela et al. 2005).

Um dos entraves para o sucesso do cultivo são as pragas e doenças bióticas e abióticas que acometem a cultura da cebola, que é desfavorecida por possuir uma parte aérea com arquitetura simplificada, propiciando o ataque de diferentes pragas e patógenos (Wordell Filho et al. 2006). Dentre as causas abióticas, a deficiência hídrica que causa necrose do tecido do ápice foliar caracterizado como seca dos ponteiros, é a de maior relevância por ocasionar grandes perdas na produção, devido à suscetibilidade da cebola ao estresse hídrico (Marouelli et al. 2005; Wordell e Boff, 2006; Tosta et al. 2014).

Entre as pragas que acometem a cultura da cebola causando perdas significativas na produção brasileira e mundial está o tripses (*Thrips tabaci*) que causa seca dos ponteiros, enrolamento foliar e lesões de coloração esbranquiçada, ocasionando perdas na produtividade pelo mal desenvolvimento dos bulbos (Gonçalves, 2006; Gill et al. 2015; Gonçalves et al. 2018). A cebola também pode ser atacada por outros insetos como a mosca-minadora (*Liriomyza* spp.), lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*) e mosca-da-cebola (*Delia* spp.) que também causam prejuízos (Michereff Filho et al. 2012; Soumia et al. 2017).

As viroses que causam doenças na cultura da cebola, *Onion yellow dwarf virus* e *Iris yellow spot virus* que causam nanismo amarelo e virose sapeca, respectivamente, afetam diretamente a produção de bulbos (Arya et al. 2006; Gent et al. 2006; Manglli et al. 2020). Do grupo dos nematoides, *Ditylenchus dipsaci*, conhecido como nematoide dos bulbos e caules é o principal na cultura da cebola (Poirier et al. 2019). Além desse, também há ocorrência do

nematoide das galhas, *Meloidogyne* spp., que pode reduzir o rendimento dos bulbos em até 70% (Mishra et al. 2014; Faruk, 2019; Okechalu et al. 2020).

Dentre os patógenos fúngicos que atacam a cultura, *Stemphylium vesicarium*, agente causal da queima das folhas, é um importante patógeno que causa a redução da produção de bulbos em até 85% (Tomaz e Lima 1986; Leach et al. 2020b). *Alternaria porri*, é o causador da doença foliar mais destrutiva da cebola, conhecida como mancha púrpura, que pode causar perdas de até 97% no rendimento da produção de bulbos (Nanda et al, 2016; DAR et al. 2020). A antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, presente nas regiões tropicais e subtropicais, leva a perdas significativas na produção, qualidade dos bulbos e sementes (Lopes et al. 2021). A raiz rosada da cebola, causada por *Setophoma terrestris*, possui distribuição mundial, e assim como a antracnose, ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Orio et al. 2016; Marzu et al. 2018; Rivera-Méndez et al. 2021). A queima das folhas de *Botrytis squamosa*, descrita há quase 100 anos, é uma doença importante na cebolicultura e ocorre em todo o mundo (Steenjtes et al. 2021a). O complexo de espécies formado por *Botrytis aclada*, *B. byssoidea* e *B. allii* causam a doença pós-colheita na cebola denominada de podridão do pescoço (Nielsen e Yohalem, 2001; Steenjtes et al. 2021b). O fungo *Sclerotium cepivorum*, causador da podridão branca, é uma doença que pode levar a perdas de até 100% na cultura e inapropriação do campo para o cultivo de cebola (Steenjtes et al. 2021a). *Perenospora destructor*, agente causal do míldio da cebola, uma das doenças da cultura da cebola no sul do país, pode ocasionar perdas de até 75% da produção de bulbos quando em condições ideais para o desenvolvimento da doença (Develash e Sugha, 1997; Araújo et al. 2017; Menezes et al. 2021).

Das bactérias fitopatogênicas que acometem a cultura da cebola, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causa podridão mole nos bulbos de cebola (Marconatto et al. 2017). As espécies *Burkholderia gladioli*, *B. cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pantoea*

ananatis causam sintomas de podridões das escamas no Brasil, reduzindo em até 50% a produção, sendo que a última também pode causar sintoma foliar em cebola (Wordell Filho e Boff, 2006; Abd-Alla e Bashandy, 2012; Zaid et al. 2012; Leach et al. 2020a; Resende et al. 2022). *Pseudomonas viridiflava*, também provoca sintomas foliares, além de causar podridão em bulbos de cebola (Zaid et al. 2012; Marconatto et al. 2017; Lipps e Samac, 2021).

Entre as diversas espécies relatadas, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* é uma das mais importantes. O patógeno causa queima foliar da cebola, não induz sintomas nos bulbos, mas diminui sua qualidade pela redução na área fotossintética (Schwartz e Otto, 2000; Nunez et al. 2002). É uma doença que tem sido relatada em diversas áreas de cultivo de cebola em todo o mundo, se tornando uma doença emergente (Robène et al. 2015; Nga et al. 2021).

A QUEIMA BACTERIANA

A queima bacteriana ocorre em diversos países que cultivam cebola nos continentes Americano, Asiático e Africano (CABI, 2019). Foi observada pela primeira vez em Barbados em 1971 (Small, 1973), mas só foi associada a bactéria no Havaí em 1975 por Alvarez et al. (1978). No Brasil, o primeiro relato foi feito por Neto et al. (1987) em campos de cebola no estado de São Paulo, posteriormente Pereira e Tebaldi (2013) a relataram em Minas Gerais e desde 2018 a doença tem sido observada nas regiões da PAD DF, Cristalina - GO e Cabeceira Grande - MG (Ferreira, 2021). Apesar de não afetar os bulbos diretamente, pode causar perdas significativas na produção, de 10 a 50%, diminuindo a qualidade e o rendimento dos bulbos devido a redução da taxa fotossintética e assimilação de nutrientes (Schwartz e Otto, 2000; Sanders et al. 2003; Nunez et al. 2002; Robène et al. 2015; Nga et al. 2021).

Xanthomonas euvesicatoria pv. *allii* pode causar sintomas em qualquer estágio de desenvolvimento em cultivares de dias curtos e após a bulbificação em cultivares de dias longos, podendo ser visualizados nas folhas e caules de sustentação das flores (EPPO, 2016).

Os sintomas iniciam nas folhas mais velhas, como pequenas lesões cloróticas circundadas por um halo encharcado, que aumentam rapidamente, tornando-se alongadas com coloração bronzeada a marrom e margens encharcadas. À medida que as estrias coalescem, ocorre a morte das pontas e queima das folhas, resultando em plantas atrofiadas e redução do tamanho dos bulbos (Nunez et al. 2002; Picard et al. 2008; EPPO, 2016). O desenvolvimento da doença é favorecido em regiões de clima quente e úmido com temperaturas de 28 a 35 °C (Schwartz et al. 2003; Humeau et al. 2006).

A transmissão da queima bacteriana ocorre principalmente por meio de sementes de cebola infectada, fato ao qual atribui-se sua rápida disseminação mundial (Roumagnac et al. 2000; Humeau et al. 2006). Há também relatos de plantas invasoras, culturas utilizadas em rotação, restos de cultura e água de irrigação como fontes de inóculo de *X. euvesicatoria* pv. *allii* (Gent et al. 2005b). Em busca de um método para detecção de *X. euvesicatoria* pv. *allii* em sementes de cebola, Robène-Soustrade et al. (2010) utilizaram a técnica de Multiplex Nested PCR, por meio da amplificação de dois genes, montagem do pilus (*pilW* e *pilX*) e *avrRxv*, presentes no genoma de *X. euvesicatoria* pv. *allii*. O protocolo por Multiplex Nested PCR, permite a detecção da bactéria em lotes de sementes com uma sensibilidade de uma semente infectada em 27.340 sementes. Já em 2015, Robène et al. desenvolveram um ensaio de PCR em tempo real para detecção de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, com um limite de detecção superior, de uma semente infectada em 32.790 sementes.

O controle da queima bacteriana da cebola causada por *X. euvesicatoria* pv. *allii* é realizado principalmente por múltiplas aplicações de bactericidas a base de cobre combinados com fungicidas do grupo dos etilenobisditiocarbamatos (Gent e Schwartz, 2005; Lang et al. 2007). No entanto, são necessárias novas estratégias para reduzir o uso dos bactericidas que elevam os custos do produtor assim como o impacto ao meio ambiente (Gent e Schwartz, 2005). O manejo integrado torna-se uma ótima opção com a utilizando da rotação de culturas e o

controle biológico, mesmo não sendo tão eficazes como o controle convencional, devido à falta de maior conhecimento sobre o patógeno (EPPO, 2016).

Devido à capacidade de sobrevivência epifítica e/ou patogênica da bactéria em algumas leguminosas, é necessário mais estudo sobre a utilização dessas espécies em alternância com cebola em um cronograma de rotação de culturas (O'Garro e Paulraj, 1997; Gent et al. 2005b; Gent et al. 2005c). Estudo realizado com isolados bacterianos de *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas fluorescens* para o controle biológico da queima bacteriana em cebola reduziu a severidade da doença tão ou mais que aplicações semanais de bactericidas a base cobre (Gent e Schwartz, 2005). No Brasil ainda não existem formulações de controle biológico registradas para o controle da queima bacteriana em cebola.

Lang et al. (2007) em busca de uma estratégia mais sustentável em substituição as aplicações de bactericidas a base de cobre, utilizando misturas de bacteriófagos e um ativador de defesa da planta, o acibenzolar-S-metil, demonstraram que aplicações quinzenais, levaram a uma redução de até 50% da severidade da doença em campo, evidenciando seu potencial para compor um programa de controle da queima bacteriana da cebola. Em um estudo mais recente, Nga et al. (2021), demonstrou a eficácia do uso de três bacteriófagos líticos específicos de *X. euvesicatoria* pv. *allii* no controle da queima bacteriana em cebolinha, com redução da incidência dos sintomas na área foliar em cerca de 70% em casa de vegetação. Em condições de campo, a aplicação de um dos bacteriófagos levou à redução da incidência dos sintomas igualmente ao bactericida comercial Starner (Nga et al. 2021). Yanti (2015) realizou um estudo avaliando a indução de resistência à queima bacteriana em plantas de chalota (*Aoschaninii*) com a introdução de rizobactérias, no entanto, seis dias após a inoculação, a atividade enzimática passou a diminuir continuamente. Yanti et al. (2022) realizaram um estudo utilizando microrganismos que podem aumentar a resistência das plantas que atuam de forma similar as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, foram obtidos sete isolados capazes de

suprimir o ataque de *X. euvesicatoria* pv. *allii* em chalotas. Até o momento não há cultivares registradas no Brasil que possuam algum tipo de resistência a *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Por sua vez, em 1997, O'Garro e Paulraj realizaram um estudo avaliando dezenove genótipos comerciais de cebola em Barbados, sendo que duas das 19 cultivares avaliadas apresentaram crescimento bacteriano restrito e mostraram-se livres de sintomas.

O PATÓGENO (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*)

O primeiro relato da queima bacteriana da cebola foi feito por Alvarez et al. (1978) no Havaí em 1975, associando a doença ao gênero *Xanthomonas*. Em 1993, Paulraj e O'Garro classificaram o patógeno como *Xanthomonas campestris*, com base em testes bioquímicos e fisiológicos. No ano 2000, Kadota et al. reclassificaram como *X. campestris* pv. *allii*, com base nas características fisiológicas, bioquímicas e teste de gama de hospedeira com isolados de plantas de cebola galesa (*Allium fistulosum*) no Japão. Em 2004, Roumagnac, reclassificou a espécie como *X. axonopodis* pv. *allii*, grupo rep-PCR 9.2 de *X. axonopodis*, com base na caracterização polifásica empregando técnicas moleculares de FAFLP (*Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis*) e *DNA–DNA hybridization*, além de estudos fenotípicos e bioquímicos. Por último, Constantin et al. (2016) reclassificou a espécie como *X. euvesicatoria* pv. *allii*, pertencente ao grupo II do gênero *Xanthomonas*, fundamentado em *DNA–DNA hybridization*, MLSA (*Multilocus sequence analysis*) e sequenciamento genômico.

Xanthomonas euvesicatoria pv. *allii* (Kadota et al. 2000) Constantin et al. 2016, pertence ao filo Pseudomonadota, classe Gammaproteobacteria, ordem Lysobacterales, família Lysobacteraceae e gênero *Xanthomonas* (CABI, 2022). É uma bactéria fitopatogênica gram-negativa, móvel, aeróbia obrigatória, de metabolismo oxidativo, catalase positiva, colônias de aspecto liso, mucóide, circular, convexo e de coloração amarela (Kadota et al. 2000; Roumagnac et al. 2004).

Além de *Allium cepa*, outras espécies do gênero *Allium* já foram relatadas como hospedeiras de *X. euvesicatoria* pv. *allii* em campo, como cebola galesa (*A. fistulosum*), chalota (*A. oschaninii*), alho (*A. sativum*), alho-poró (*A. porrum*) e cebolinha (*A. schoenoprasum*) (Kadota et al. 2000; Roumagnac et al. 2004; Kavhiza et al. 2021). Em casa de vegetação já foi relatada a sobrevivência epifítica de *X. euvesicatoria* pv. *allii* em algumas leguminosas como lentilha, grão de bico, alfafa, feijão e soja, sendo que nesta última já foram recuperados isolados em condições de campo, assim como das plantas daninhas, caruru e leiteiro (Gent et al. 2005b; Gent et al. 2005c; Ferreira, 2021).

Atualmente existem seis sequências genômicas completas disponíveis de *X. euvesicatoria* pv. *allii*. O genoma possui 5.425.942 bp e conteúdo G + C de 64,4%, com regiões típicas de outras espécies de *Xanthomonas*, como o sistema de secreção do tipo III (TTSS) e cerca de 22 genes efetores do tipo III (Gagnevin et al. 2014; NCBI, 2022). Os isolados da patovar *allii* possuem menor especificidade em relação ao hospedeiro e uma maior diversidade genética do que se espera de uma patovar do gênero *Xanthomonas* (Gent et al. 2005a; Gagnevin et al. 2014).

Tendo em vista que a queima bacteriana causada por *X. euvesicatoria* pv. *allii* é uma doença emergente e que afeta diretamente a produção da cebola em diversos países, se faz necessário a realização de estudos aprofundados acerca deste patógeno (Robène et al. 2015).

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* possui 34 espécies descritas, das quais a maioria possui importância fitossanitária, por serem agentes causadores de doenças de plantas, impactando diretamente em perdas ambientais e econômicas (Timilsina et al. 2020). Diversas espécies de plantas já foram descritas como hospedeiras das espécies de *Xanthomonas*. Este é um conhecimento importante, visto que a gama de hospedeiras de uma bactéria fitopatogênica é

traduzida em patovar, que agrupa isolados de uma mesma espécie com especialização patogênica para uma mesma gama de hospedeiras (Dye et al. 1980; Catara et al. 2021). Essas diferenças a nível infra-específico exigem que ferramentas de detecção altamente específicas sejam utilizadas na identificação da diversidade presente em *Xanthomonas*.

Avanços nos estudos incorporando a genômica e a filogenia tornaram o gênero *Xanthomonas* um dos maiores grupos de bactérias descritos por meio de *fingerprinting* e homologia DNA-DNA (Vauterin et al. 1995; Vauterin e Swings 1997; Constantin et al. 2016). Entretanto, o estudo da diversidade por meio da hibridização DNA-DNA é inviabilizado devido à sua complexidade e alto custo (Wayne et al. 1987; Rademaker et al. 2000).

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

Restrepo et al. (2000), utilizando marcadores rep-PCR, AFLP e RFLP, evidenciou uma grande diversidade entre 238 isolados de *X. phaseoli* pv. *manihotis* na Colômbia. Mahuku et al. (2006) encontrou um alto nível de distância genética entre *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans* e *X. citri* pv. *phaseoli*, empregando a técnica de REP-PCR. Ogunjobi et al. (2010), avaliando a variabilidade genética entre isolados *X. phaseoli* pv. *manihotis* com as técnicas RAPD e AFLP, conseguiu separar os isolados em quatro clados distintos. Arshiya et al. (2014) descobriu uma grande diversidade genética entre isolados de *X. citri* pv. *citri* através do uso de marcadores REP, BOX e ERIC, sendo que o BOX-PCR se mostrou mais eficiente na avaliação da diversidade de *X. citri* pv. *citri* por revelar mais bandas polimórficas que os demais marcadores.

Em *X. euvesicatoria* pv. *allii*, estudos de caracterização polifásica utilizando marcadores moleculares evidenciaram a diversidade entre isolados da espécie. Com marcadores rep-PCR (BOX, ERIC e REP), Gent et al. (2004) constataram a proximidade genética entre isolados de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, *X. euvesicatoria* pv. *alfalfae* e *X. euvesicatoria* pv. *citrumelonis* (Gent et al. 2005a). Com o uso de marcadores AFLP e RFLP, Picard et al. (2008) relataram uma grande diversidade entre isolados de *X. euvesicatoria* pv. *allii* de duas ilhas do arquipélago Mascarenhas. Ferreira (2021), em um estudo sobre a variabilidade existente entre 34 isolados *X. euvesicatoria* pv. *allii* proveniente de regiões produtoras do Cerrado brasileiro, identificou oito haplótipos gerados por BOX-PCR, evidenciando a diversidade presente em *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

O uso da filogenia molecular também tem sido importante para o conhecimento da diversidade desse gênero. Inicialmente utilizava-se da análise de um único *locus*, como o uso dos espaçadores entre as regiões do 16S e 23S rDNA, sequências do gene da girasse (*gyrB*) e do 16S rRNA, mas sem resolução suficiente para avaliar a diversidade e elucidar a filogenia a nível de espécie ou abaixo (Rodriguez et al. 2012). MLSA (*multilocus sequence analysis*) proposta por Young et al. (2008) com o sequenciamento dos genes *housekeeping dnaK*, *rpoD*, *fyuA* e *gyrB*, resultou na diferenciação mais clara entre as espécies e se tornando uma ferramenta preciosa para estudos da diversidade em *Xanthomonas*. Young et al. (2010) identificaram uma grande diversidade de *Xanthomonas* na Nova Zelândia, propondo a criação de uma nova espécie, *X. dyei*, utilizando os mesmos quatro genes *housekeeping*. Um estudo de MLSA realizado por Fargier et al. (2011) identificou um alto nível de diversidade genética devido a recombinação e retenção de mutações pontuais em *X. campestris*. Em 2019, Ntambo et al. avaliaram a filogenia de *X. albilineans* e demonstrou a variabilidade presente entre os isolados utilizando cinco genes *housekeeping* (*atpD*, *glnA*, *gyrB*, *abc* e *rpoD*). Em um estudo reavaliando a taxonomia de *X. axonopodis* baseado em MLSA, juntamente com hibridação DNA-DNA e

ANI (average nucleotide identity), Constantin et al. (2016) propuseram várias reclassificações. Na proposta, *X. axonopodis* pv. *allii* passaria a pertencer a espécie *X. euvesicatoria* (clado II de *Xanthomonas*), de acordo com a análise filogenética realizada.

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). Com a popularização dos métodos de sequenciamento genômico e relativa redução dos custos, houve uma crescente disponibilidade de genomas completos, favorecendo os estudos baseados em genômica comparativa e evolutiva para *Xanthomonas* (Moreira et al. 2010; Rodriguez et al. 2012; Faure e Joly, 2015). Entretanto, até o momento existem apenas seis genomas completos de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, cinco deles do Brasil. Com o aumento da disponibilidade de genomas, novos alvos para o desenvolvimento de métodos de detecção estão disponíveis. Em *Ralstonia*, por exemplo, Paudel et al. (2022) desenvolveram PCR para diferenciação de suas espécies com base no grande número de genomas disponíveis. Larrea-Sarmiento et al. (2018) desenvolveram LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) para detecção precisa de *Xanthomonas euvesicatoria*, com sequências disponíveis no Genbank, bem como Pečenka et al. (2020) que desenvolveram PCR também para detecção específica de *X. euvesicatoria* do complexo de bactérias causadoras de mancha bacteriana do tomateiro.

Perante o exposto, é necessário estender os conhecimentos acerca da variabilidade presente entre isolados bacterianos de *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Além do desenvolvimento de novos métodos de detecção, que seja simples, eficiente, exclusivo e inclusivo, cobrindo toda a variabilidade presente entre os isolados desta patovar.

Objetivo geral

Caracterizar a variabilidade genética de isolados coletados em 2021 do agente causador da queima bacteriana da cebola, avaliar protocolos de detecção para *X. euvesicatoria* pv. *allii* e

desenvolver um novo método de detecção por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) voltado para a variabilidade genética brasileira do patógeno.

Objetivos específicos

- Identificar os isolados obtidos em 2021 em lavouras de cebola no Cerrado brasileiro em nível de gênero e espécie, bem como de plantas daninhas presentes nas áreas de cultivo dessa hospedeira;
- Avaliar a variabilidade presente entre os isolados que infectam cebola por meio do marcador molecular BOX-PCR e *Multilocus sequence analysis* (MLSA);
- Avaliar a eficiência dos métodos de Multiplex Nested PCR e do LAMP, previamente descritos, frente a uma coleção de isolados brasileiros;
- Desenvolver um novo método de PCR com *primers* específicos para *X. euvesicatoria* pv. *allii* eficiente para a detecção de isolados brasileiros dessa patovar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Coleção de isolados

Os isolados utilizados neste estudo pertencem à Coleção de Bactérias Fitopatogênicas da Embrapa Hortaliças, Laboratório de Fitopatologia, Gama, DF. Os isolados foram provenientes de isolamentos de plantas de cebola com sintomas foliares típicos, lesões cloróticas com margens encharcadas, que aumentam rapidamente tornando-se bronzeadas e, ao coalescer, causam a morte das pontas folhas, conferindo aspecto de queima. A coleção utilizada neste estudo é composta de 17 isolados coletados entre os anos de 2018 a 2021 nas cidades de Cristalina - GO, Cabeceira Grande – MG, Unaí – MG e Paranoá – DF (PAD-DF) (Tabela 1). Em estudo realizado anteriormente por Ferreira (2021), foram utilizados isolados desta coleção referente aos anos de 2018 à 2020, das cultivares Taila, Andrômeda, Irati e plantas espontâneas leiteiro, soja e caruru. Já no presente estudo foram utilizados os isolados coletados no ano de

2021, obtido de plantas sintomáticas de duas outras cultivares de cebola, Rebecca e Terena, assim como isolados de soja (*Glycine max*), caruru (*Amaranthus* sp.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) provenientes dos campos de cultivo de cebola. O isolado IBSBF 1770, oriundo de cebola e obtido da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Instituto Biológico (IBSBF), Campinas – SP, anteriormente transferido para a Embrapa Hortaliças, foi utilizado como referência em todos os ensaios. Todos os isolados apresentaram características como descrito originalmente por Kadota et al. (2000), colônias de coloração amarela, lisas, convexas e aparência mucoide (Figura 1).

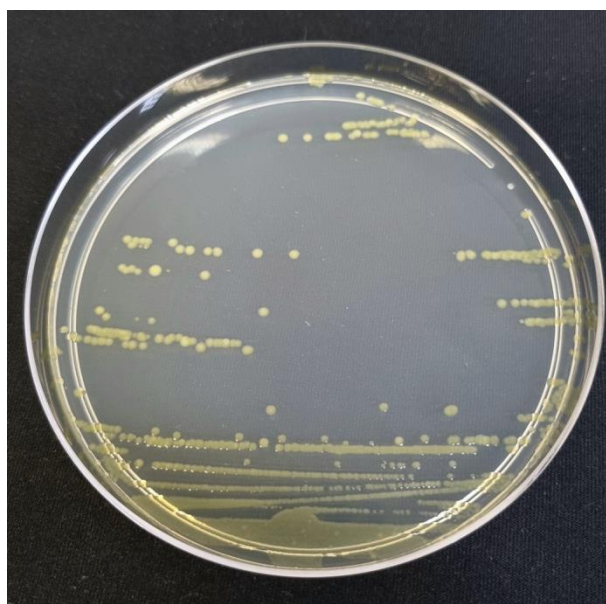


Figura 1. Colônias isoladas a partir de folhas sintomáticas de cebola (*Allium cepa*) em Unai-MG, 2021. Foto: Arquivo pessoal.

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

Isolado	Origem	Hospedeira/Cultivar
A-2018-01	Cristalina-GO	Cebola/Taila
A-2018-03	Cristalina-GO	Cebola/Taila
A-2018-08	PAD-DF	Cebola/Taila
A-2019-02	Cristalina-GO	Cebola/Andrômeda
A-2019-09	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Andrômeda
A-2019-16	Cabeceira Grande-MG	Cebola/Irati
A-2021-01	Unai - MG	Cebola/Terena
A-2021-02	Unai - MG	Cebola/Terena
A-2021-03	Unai - MG	Cebola/Terena
A-2021-04	Unai - MG	Cebola/Terena
A-2021-05	Unai - MG	Cebola/Rebecca
A-2019-21	Cabeceira Grande-MG	Soja (<i>Glycine max</i>)

S-2021-01	Unaí - MG	Soja (<i>Glycine max</i>)
C-2021-01	Cabeceira Grande-MG	Caruru (<i>Amaranthus</i> sp.)
L-2021-01	Cabeceira Grande-MG	Leiteiro (<i>Euphorbia heterophylla</i>)
A-2019-11	Cabeceira Grande-MG	Leiteiro (<i>Euphorbia heterophylla</i>)
Ceb PONT	Desconhecida	Desconhecida

Extração de DNA

Os isolados utilizados nesse estudo foram previamente cultivadas em meio Nutriente Ágar (NA) e acondicionados em câmara de crescimento por 48 horas com uma temperatura de 28°C. Colônias com características típicas de *Xanthomonas* foram repicadas para novas placas contendo meio NA e acondicionados nas mesmas condições para obtenção de cultura pura. Após 48 horas, colônias foram retiradas com auxílio da alça bacteriológica e adicionadas em microtubos de 1,5 mL com água ultrapura e armazenadas no congelador (-20°C) até a extração.

A extração de DNA seguiu protocolo de Mahuku (2004) com modificações. Inicialmente as colônias descongeladas foram homogeneizadas no vórtex, seguido de centrifugação por cinco minutos a 13.000 FCR e retirada do sobrenadante para remoção de exopolissacarídeos e outros compostos solúveis em água que podem interferir na extração de DNA. Este processo foi repetido por duas vezes e ao *pellet* bacteriano restante foram adicionados 200 µL de Tris EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), 30 µL de SDS (20%) e 10 µL de Proteinase K (0,02 g/mL), com homogeneização em vortex e incubação por 40 min a 65 °C. Em seguida, foram adicionados 250 µL de acetato de amônio 7,5 M, homogeneizados novamente em vórtex e incubados à -20 °C por 10 min. Posteriormente a suspensão foi centrifugada por 20 min a 13000 FCR e o sobrenadante (~ 400 µL) transferido para um novo tubo previamente identificado. Volume igual de isopropanol gelado foi adicionado e incubou-se por 1 hora a -20°C. Depois, procedeu-se a centrifugação por 20 minutos a 13000 FCR e o sobrenadante foi descartado. Adicionados 800 µL de etanol 70%, os tubos foram centrifugados por 5 min a 13000 FCR. Após descarte do etanol, o *pellet* foi seco em câmara de fluxo laminar, posteriormente hidratado com água ultrapura e armazenado no congelador. Foi realizada a aferição da concentração de

DNA de todos os isolados em um ultra espectrofotômetro de microvolumes, NanoDrop One (Thermo Scientific, EUA), ajustada para 25 ng/μL.

Identificação dos novos isolados a nível de gênero por PCR

Para confirmar que os novos isolados pertenciam ao gênero *Xanthomonas*, foi realizada a PCR utilizando os *primers* X-gumD F7 e X-gumD R7, descritos por Adriko et al. (2014), para amplificar o gene *gumD*, componente do *operon* responsável pela síntese do exopolissacarídeo conhecido como goma xantana.

Para todas os ensaios de PCR realizados, foi utilizado o kit GoTaq qPCR (Promega, EUA) e amplificação em termociclador Bio-Rad T100™ (Bio-Rad Laboratories, EUA). Para preparo da reação adicionou-se: 0,5 mM de cada um dos *primers* X-gum F7/R7, 5 μL do kit master mix GoTaq Buffer, 0,2 μL da enzima GoTaq Enzyme, 50 ng de DNA de cada isolado e 1,8 μL de água ultrapura, resultando em uma reação com volume final de 10 μL. A amplificação foi realizada no termociclador previamente programado para desnaturação inicial de 4 min a 95 °C, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58 °C e 1 min a 72 °C e extensão final de 6 min a 72 °C. A análise dos *amplicons* foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1 %, 120V, com tampão de corrida TBE e marcador 1 Kb plus (Invitrogen, EUA). Para visualização dos *amplicons* sob luz ultravioleta (UV) em transiluminador foi utilizado Gel Red (Biotium, EUA) com posterior fotodocumentação.

Tabela 2. *Primers* utilizados neste estudo, com suas respectivas sequências de nucleotídeos e referências.

Primer	Sequência (5' - 3')	Referências
X-gumD F7	GGCCGCGAGTTCTACATGTTCAA	Identificação do gênero (Adriko et al. 2014)
X-gumD R7	CACGATGATGCGGATATCCAGCCACAA	
BOX A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	BOX-PCR (Versalovic et al. 1994)

emidnaK1F	ACCAAGGACGGCGAAGTGCT	
emidnaK2R	CGATCGACTTCTTGACCAGG	
emigrB2F	CGCTACCACCGCATCATCCT	<i>Multilocus sequence analysis (MLSA)</i> (Fargier et al. 2011)
emigrB3R	AGGTGCTGAAGATCTGGTCG	
emifyuA5F	ACGGCACGCCGTTCTGGGG	
emifyuA6R	GATCAGGTTACGCCGA ACT	
emirpo27R	GAAATCGCCATCGCCAAGC	
emirpo12R	CGGTTGGTGTACTTCTTGG	
Pxaa1U	GGTCTAATACGACGTTGACGAT	
Pxaa1L	AAATTCATGCGCGTTTTCAATAG	
Pxaa2U	CTCAAGCAGCAGTCGTTTTCA	Multiplex Nested PCR <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i> (Robène-Soustade et al. 2010)
Pxaa2L	ATGCTTCGATTGACATGTGT	
Nxaa1U	TTACGTCGCAAACAATCCAGATA	
Nxaa1L	GGGCACCATTGACATTATCAGTT	
Nxaa2U	ATGCCTGGTTTCGTGAA	
Nxaa2L	CTACGGCTCAGCGACTC	
XeRec-F3	CCATGTAGGGCTTGTTGACG	
XeRec-B3	GTGGGTCGCATCTTCATTGG	
XeRec-FIP	ACCGCTCACGGAAAACGTGCC- TTCAGCGATGGACAGC	LAMP <i>X. euvesicatoria</i> (Larrea-Sarmiento et al. 2018)
XeRec-BIP	GAGGCCACGTTGGCGATGAG- GTGAACGACGACGGTTCG	
XeRec-LF	ACCCGGCAGGCACGGTGCT	
XeRec-LB	AGCAACGTCGGCGCCGGATA	

BOX - PCR e seleção de haplótipos

Visando verificar a variabilidade genética de isolados coletados em 2021 das cultivares de cebola Terena e Rebecca, em comparação com os isolados do surto da doença que ocorreu entre 2018/2019 e já caracterizados previamente, foi utilizado o *primer* BOX-A1R (Versalovic et al. 1994). Para a seleção de haplótipos foi realizada PCR com DNA dos isolados obtidos dos

campos de cebola e o isolado referência IBSBF 1770, como controle positivo. Como controle negativo foram utilizadas reações livres de DNA.

A reação foi preparada utilizando 2 µL de água ultrapura, 5 µL do GoTaq Buffer, 1 mM do *primer* BOX-A1R, 0,2 µL da GoTaq Enzyme e 50 ng de DNA de cada um dos isolados, com volume final de reação de 10,2 µL. O processo de amplificação foi realizado em termociclador com desnaturação inicial a 95°C por 7 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C e 8 min a 65 °C com extensão final de 15 min a 65 °C.

A separação e visualização dos *amplicons* foi feita por eletroforese a 120 V em gel de agarose a 1,5%, utilizando tampão TBE, marcador 1 Kb Plus (Invitrogen) e Gel Red. A visualização foi realizada em um transiluminador com posterior fotodocumentação.

A análise do perfil de bandas foi realizada comparando o perfil de cada isolado com os haplótipos identificados por Ferreira (2021) e o isolado de referência IBSBF 1770. Posteriormente os haplótipos foram selecionados por análise visual de acordo com os padrões de bandas gerados por BOX-PCR, e foram separados em grupos, com um isolado representativo para cada um deles. O BOX-PCR foi repetido por três vezes para confirmação dos resultados obtidos.

Multilocus sequence analysis (MLSA)

Após a seleção dos haplótipos no BOX-PCR, foi realizado PCR para a amplificação e sequenciamento das regiões dos genes *housekeeping dnaK* (Heat shock protein 70), *gyrB* (Gyrase subunit B) *fyuA* (TonB - dependent transporter) e *rpoD* (RNA polymerase sigma -70 factor) com os *primers* emidnaK1F/emidnaK2R, emigyrB2F/emigyrB3R, emifyuA5F/emifyuA6R e emirpo27F/emirpo12R respectivamente (Tabela 2) (Fargier et al. 2011).

A reação foi preparada utilizando 13,2 µl de água ultra pura, 20 µl do GoTaq Buffer, 2 mM de cada *primer*, 0,6 µl da GoTaq Enzyme e 50 ng de DNA dos haplótipos para um volume de reação final de 40 µl. O programa de amplificação consistiu em um ciclo inicial de 94 °C por 30 s seguido de 35 ciclos de 94 °C por 50 s, com temperatura de anelamento variável de acordo com a região, sendo *rpoD* 65 °C, *gyrB* 65 °C, *fyuA* 67,7 °C e *dnaK* 67,7 °C e 72 °C por 1 minuto e extensão final por 7 minutos a 72 °C.

Para confirmar a amplificação, uma pequena porção dos produtos gerados na PCR foram utilizados para visualização em gel de agarose 1% e coradas com GelRed. Posteriormente, as amostras foram purificadas com o kit PureLink PCR Purification Kit, conferido as concentrações em NanoDrop One (Thermo Scientific, EUA) e sequenciadas pela plataforma Sanger na empresa ACTGene.

As sequências obtidas por Sanger foram montadas, analisadas e corrigidas no *software* Geneious Prime 2022 (Kearse et al. 2012). Em seguida, foram extraídas sequências das quatro regiões genômicas previamente descritas de sequências completas de genomas bacterianos de espécies e patovares do gênero *Xanthomonas* disponíveis no GenBank (Tabela 3). Desse modo, para o alinhamento das sequências foi utilizado o algoritmo Clustal Omega (Sievers et al. 2011). Na sequência, procedeu-se com o corte e a correção manual dos alinhamentos correspondentes a cada gene *housekeeping*, individualmente. Após, foi realizada a escolha do melhor modelo de substituição através do software Mega X (Kumar et al. 2018) para cada um dos genes analisados. As sequências foram concatenadas e, posteriormente, foi realizada a análise filogenética pelo método de inferência Bayesiana com o *plugin* do MrBayes (Huelsenbeck e Ronquist 2001) no Geneious Prime 2022, sendo adotado o modelo de substituição de nucleotídeos GTR+G+I, com 2 milhões de gerações e burn-in de 25% do total de árvores geradas. A árvore filogenética obtida foi utilizada para a organização dos agrupamentos e consequente reformulação dos haplótipos.

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

Espécie/Patovar	Isolado	Acesso
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	A-2018-1	JAINFG000000000
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	A-2019-2	JAINFE000000000
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	A-2019-04	JAINFF000000000
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	A-2019-16	JAINFH000000000
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>	A-2019-21	JAINFI000000000
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Xaj 417	NZ_CP012251.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>commiphoreae</i>	LMG26789	NZ_CP031059.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Xac29-1	CP004399.1
<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>	NCPBP 902	NZ_CP034657.1
<i>Xanthomonas vasicola</i>	NCPBP 1060	NZ_CP034649.1

<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	LM159	NZ_CP018470.1
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	LMG 911	NZ_CP018725.1

Multiplex Nested PCR para detecção da patovar *allii*

Para avaliar *primers* de Multiplex Nested PCR descrita por Robène-Soustrade et al. (2010) para detecção de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, a coleção de haplótipos foi testada. A primeira PCR foi preparada utilizando 3 µl de água ultra pura, 5 µl do GoTaq Buffer, 0,2 mM de cada *primer* (Pxaa1U, Pxaa1L, Pxaa2U, Pxaa2L), 0,2 µl da GoTaq Enzyme e 25 ng de DNA dos haplótipos totalizando 10 µl de reação final. O processo de amplificação consistiu na desnaturação a 94 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos 95 °C por 1 min, anelamento de primers a 63 °C por 1 min, extensão de 72 °C por 2 min e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Para a segunda reação, com o conjunto de *primers* internos, foi realizada uma diluição de 1:100 com os *amplicons* obtidos a partir da primeira reação e preparada uma reação semelhante a primeira, exceto que se utilizou 0,2 mM de cada *primer* (Nxaa1U, Nxaa1L, Nxaa2U, Nxaa2L) e 1 µl da diluição dos *amplicons*. A amplificação foi realizada com desnaturação 95 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 30 segundos, extensão de 72 °C por 40 segundos e extensão final de 5 min a 72 °C. A visualização e documentação dos *amplicons* das duas rodadas de amplificações foi feita por protocolo anteriormente descrito.

LAMP para detecção de *Xanthomonas euvesicatoria*

A reação LAMP descrita por Larrea-Sarmiento et al. (2018) para a espécie *X. euvesicatoria* foi utilizada para avaliar o seu potencial de uso para detecção da patovar *allii*. As reações LAMP foram preparadas utilizando 13,5 µl de água ultra pura, 2,5 µl do BST Buffer,

8 mM de MgSO₄, 1,4 mM de mix dNTPs, mix de *primers* (0,2 µM de XeRec-F3/B3, 0,4 µM XeRec-LF/LB e 1,6 µM XeRec-FIP/BIP), 320 U da Bst Enzyme 3.0 e 25 ng de DNA, totalizando 25 µl de reação final. O LAMP foi testado com os isolados haplótipos, isolado referência IBSBF 1770 e um isolado de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, EH2009-130 da coleção de Bactérias Fitopatogênicas de Hortaliças, da Embrapa Hortaliças, Laboratório de Fitopatologia. As reações foram conduzidas em termociclador por 1 hora a 65 °C. A visualização da PCR foi feita em gel de agarose 1%, com corrida a 120 V por 55 minutos e coradas com GelRed para visualização dos *amplicons*.

Desenho de Primers

Para o desenho de *primers* específicos para a patovar *allii*, foi utilizada a abordagem de subtração *in silico*. Para isso, foram utilizados os cinco genomas sequenciados previamente por Ferreira (2021) e também pelo único outro genoma, desta patovar disponível no GenBank (NCBI), proveniente da Ilha Reunião. Visando buscar regiões exclusivas da patovar *allii*, outros 64 genomas de *Xanthomonas* de diversas espécies também foram usados nas análises (Tabela 3).

Os genomas foram reanotados com o *software* Prokka (Seemann, 2014) com as configurações padrão, usando uma base de dados atualizada extraída do GenBank e encontrada em espécies do gênero *Xanthomonas*. Em seguida, foi feita a análise comparativa dos isolados pelo programa Roary (Page et al. 2015) também com configurações padrão.

Os genes comuns a todos os isolados da patovar *allii* e ausentes nas demais patovares e espécies, foram selecionados e usados para o desenho de *primer*. Quando não foi possível encontrar genes exclusivos para a patovar estudada, foram selecionadas regiões com presença no menor número de genomas de outras patovares. Visando o desenho de *primers* que pudessem ser adaptados para PCR, qPCR e também para LAMP, foram utilizados critérios de desenho

que atendessem todas as técnicas, geralmente sendo esses os de *primers* para LAMP. O desenho dos *primers* foi realizado utilizando o software NEB LAMP (New England BioLabs - <https://lamp.neb.com/#/>) e a especificidade confirmada *in silico* utilizando a ferramenta Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) contra o banco de dados disponível no NCBI.

Teste dos *primers* desenhados

Para o teste com PCR convencional, a reação foi preparada adicionando 1,8 µL de água ultrapura, 5 µL do kit master mix GoTaq Buffer, 1 mM dos *primers* F/R, 0,2 µL da enzima GoTaq Enzyme, 50 ng de DNA de cada haplótipo, totalizando 10 µL de volume de reação final. A amplificação foi realizada no termociclador programado para desnaturação inicial de 95 °C por 3 min, seguida por 34 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1:30 min a 57 °C e 1:30 min a 72 °C, com extensão final de 72 °C por 10 min.

Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% a 120V, em tampão de corrida TBE, marcador 1 Kb plus de acordo com recomendações do fabricante. A visualização foi feita como descrito anteriormente.

Otimização das reações

Após a seleção do melhor par entre os *primers* sintetizados e testados com a diversidade presente em nosso estudo, foi realizado o refinamento da reação a fim de, otimizar o tempo, aumentar a especificidade e a redução da formação de dímeros. Foi alterada a concentração de *primers* que passou de 1 mM para 0,3 mM. A configuração do termociclador foi ajustada para desnaturação inicial de 94 °C por 3 min, seguida por 34 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 30 segundos a 69 °C e 30 segundos a 72 °C, com extensão final de 72 °C por 5 min.

Ensaio de Sensibilidade

A sensibilidade dos *primers* foi avaliada utilizando gradientes de concentração entre 50 ng μL^{-1} e 0,5 pg μL^{-1} de DNA purificado do isolado A-2018-1, em seis intervalos distintos. Os gradientes foram obtidos por meio de diluições seriadas em 10 vezes. O controle negativo constou somente da adição de água. O ensaio de sensibilidade foi realizado com todos os haplótipos nas condições já descritas para PCR e visualização por eletroforese em gel.

Especificidade determinada frente à microbiota de cebola

Para avaliar a especificidade dos *primers* para além dos testes *in silico*, várias folhas de cebola coletadas de lavouras comerciais, tiveram sua microbiota isolada através da maceração de tecidos não desinfestados. O macerado foi riscado em meio NA com o auxílio de uma alça microbiológica e após 24 horas a 28°C, colônias de diferentes fenótipos foram repicadas para outras placas sob as mesmas condições para estabelecimento de culturas puras. Após a incubação, os isolados bacterianos tiveram seus DNAs extraídos pelo método de Mahuku (2004) e avaliados se pertenciam ao gênero *Xanthomonas* através do uso dos *primers* Xgum F7/R7. Após confirmação, o DNA dos isolados foram usados em PCRs com os *primers* previamente selecionados.

3. RESULTADOS

Identificação dos isolados a nível de gênero por PCR

Todos os 9 novos isolados obtidos de manchas foliares da cebola, apresentaram amplificação com os *primers* X-gumD F7/R7 (Figura 2). O tamanho dos fragmentos obtidos a partir da amplificação parcial do gene *gumD* de cada um dos isolados foi visualmente semelhante ao esperado (350 bp), como descrito por Adriko et al. (2014). Todos os isolados

foram confirmados como pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, devido à presença do gene de síntese da goma xantana.

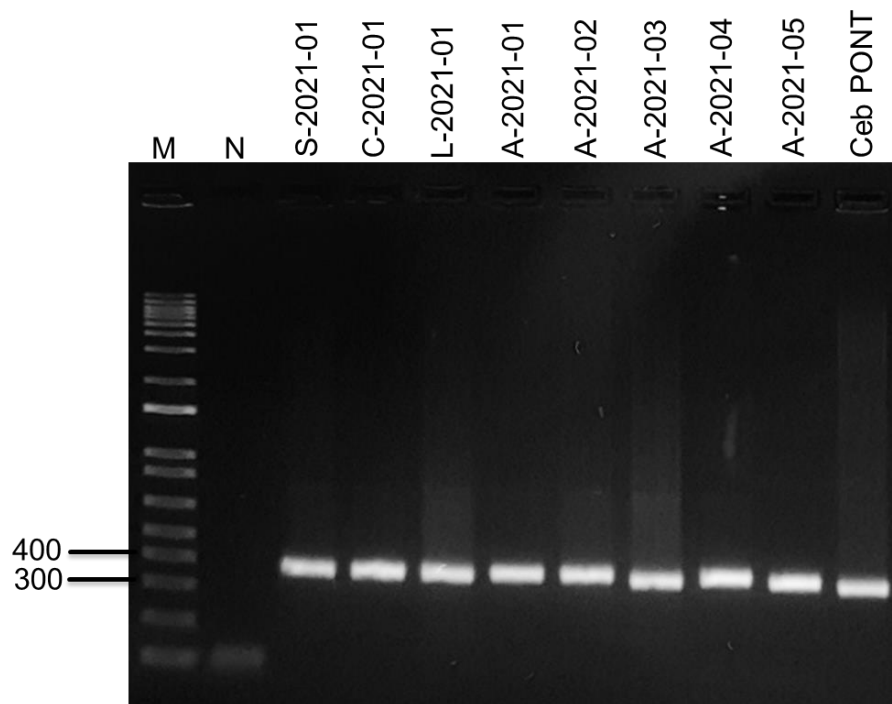


Figura 2. Eletroforese da PCR, com os *primers* X-gumD F7 e X-gumD R7, de isolados coletados em plantas de cebola apresentando queima foliar no cerrado brasileiro. M: marcador 1 Kb Plus Invitrogen®. Fragmento gerado de 350 bp. N: controle negativo.

BOX - PCR e seleção de haplótipos

Pela análise visual dos perfis de fragmentos gerados (Figura 3), foi possível identificar um total de 10 haplótipos, 6 entre os isolados dos anos de 2018 e 2020 descritos por Ferreira (2021) e 4 de 2021 descritos no presente trabalho (Tabela 4). Haplótipo 1: isolado A-2018-01; haplótipo 2: isolado A-2018-03; haplótipo 3: isolado A-2018-08; haplótipo 4: isolado A-2019-09; haplótipo 5: isolado A-2019-17; haplótipo 6: A-2019-20; haplótipo 7: isolados S-2021-01 e C-2021-01; haplótipo 8: isolados A-2021-01, A-2021-02 e A-2021-03; haplótipo 9: A-2021-04; e por fim haplótipo 10: isolados L-2021-01, A-2021-05 e Ceb PONT.

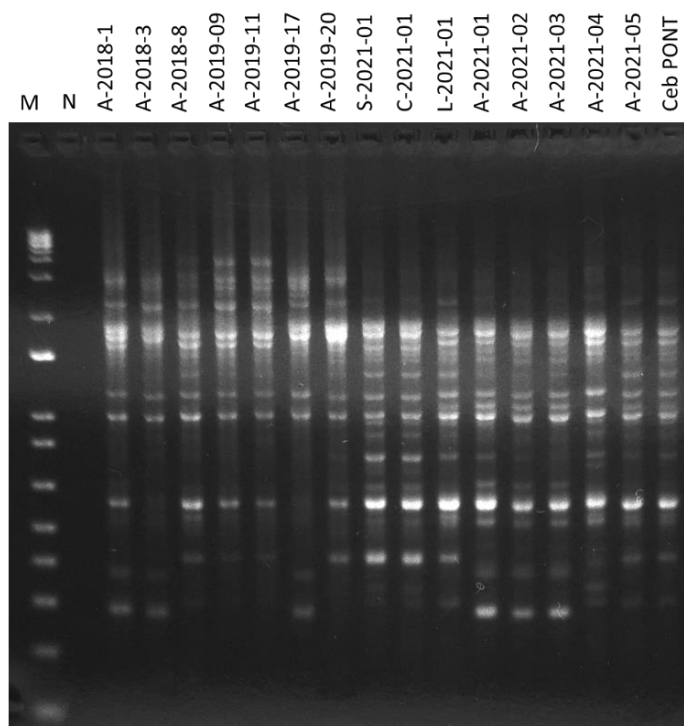


Figura 3. Eletroforese com os perfis de BOX-PCR com o *primer* BOX-A1R da coleção com isolados representativos dos haplótipos anteriormente descritos por (Ferreira, 2021) e os novos isolados de *Xanthomonas* de campos de cultivo de cebola de regiões produtora no cerrado brasileiro. M: marcador 1 Kb Plus da Invitrogen®. N: controle negativo.

Tabela 4. Isolados e haplótipos de *Xanthomonas* de cebolas com queima foliar identificados a partir da análise visual do BOX-PCR.

Haplótipos	Isolados
Haplótipo 1	A-2018-01
Haplótipo 2	A-2018-03
Haplótipo 3	A-2018-08
Haplótipo 4	A-2019-09
Haplótipo 5	A-2019-17
Haplótipo 6	A-2019-20
Haplótipo 7	S-2021-01, C-2021-01
Haplótipo 8	A-2021-01, A-2021-02, A-2021-03
Haplótipo 9	A-2021-04
Haplótipo 10	L-2021-01, A-2021-05, Ceb PONT

Multilocus sequence analysis (MLSA)

A partir da análise de *fingerprints* dos isolados obtidos no BOX-PCR, foram selecionados quatro novos haplótipos e um isolado representativo de cada para integrar o MLSA (Tabela 5). Foi obtida uma sequência de 3.302 pb após a concatenação das sequências dos genes *housekeeping* de 783 pb (*rpoD*), 901 pb (*dnaK*), 817 pb (*fyuA*) e 801 pb (*gyrB*). A árvore filogenética apresentou elevados valores de probabilidade posterior e evidenciou o agrupamento dos isolados bacterianos de cebola em cinco clados distintos (Figura 4). No primeiro clado o isolado A-2021-01 agrupou próximo a *X. euvesicatoria* pv. *alfalfae*. O clado 2 formado pelos isolados A-2018-01, A-2021-04 que se encontra filogeneticamente próximo a três isolados da patovar *allii*, um das Ilhas Maurício, outro do Havaí (EUA) e o último, o isolado CFBP 6369 das Ilhas Reunião referência por ser o único com genoma completo disponível no Genbank. Os isolados A-2018-03 e A-2019-16 agruparam-se junto a um isolado brasileiro de *X. euvesicatoria* pv. *allii* formando o clado 3. No clado 4 estão os isolados A-2019-02, A-2021-05, A-2018-8, A-2019-09, A-2019-11, e A-2019-04, distantes de *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Destes apenas o isolado A-2019-11 não é proveniente de cebola, mas sim da planta invasora leiteiro. O clado 5 forma um agrupamento individual onde se encontram os isolados A-2019-19, C-2021-01 de caruru (*Amaranthus* sp.) e A-2019-20, A-2019-21 de soja (*Glycine max*). Os isolados proveniente de soja agruparam filogeneticamente distantes dos isolados de *X. citri* pv. *glycines* agente causador da mancha bacteriana em soja. Todos os isolados coletados no DF, MG e GO foram classificados como espécie *X. euvesicatoria*.

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

Haplótipos	Isolados/Haplótipos	Hospedeira/cultivar
1	A-2018-1	Cebola/Taila
2	A-2018-3	Cebola/Taila
3	A-2018-8	Cebola/Taila

	A-2019-02	Cebola/Andrômeda
4	A-2019-11	Leiteiro
	A-2019-04	Cebola/Andrômeda
	A-2019-09	Cebola/Andrômeda
	5	A-2019-16
6	A-2019-19	Caruru
	A-2019-20	Soja
	A-2019-21	Soja
7	C-2021-01	Caruru
8	A-2021-01	Cebola/Terena
9	A-2021-04	Cebola/Terena
10	A-2021-05	Cebola/Rebecca

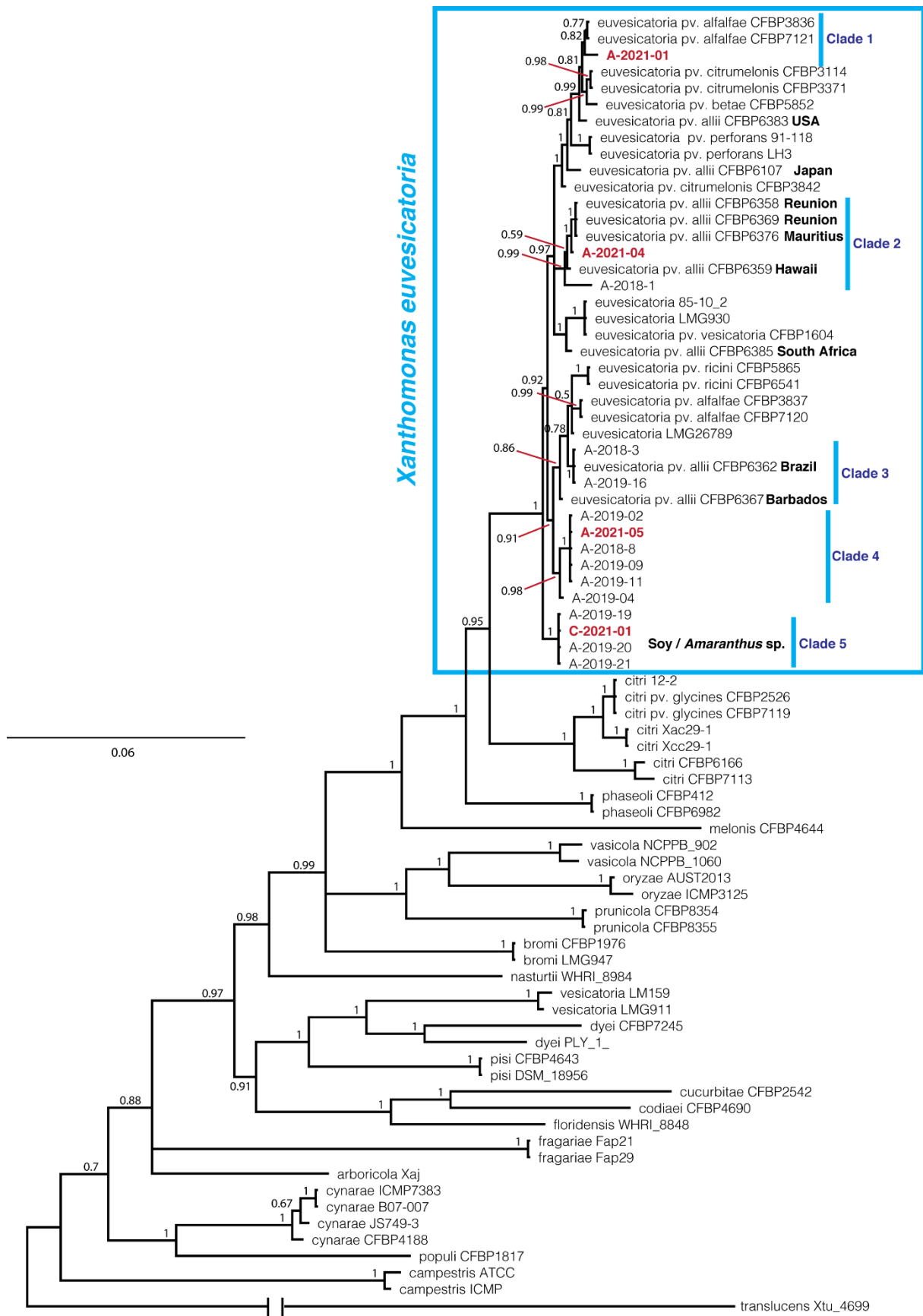


Figura 4. Análise filogenética por inferência Bayesiana com sequencias concatenadas dos genes *housekeeping dnaK* (Heat shock protein 70), *gyrB* (Gyrase subunit B) *fyuA* (TonB -

dependent transporter) e *rpoD* (RNA polymerase sigma -70 factor) de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* com 2 milhões de gerações e modelo GTR+G+I. Isolados coletados em 2021, objetos deste estudo, estão identificados em vermelho.

Multiplex Nested PCR

A Multiplex Nested PCR resultou na amplificação para todos os isolados neste estudo (Figura 5). A maioria dos isolados apresentou amplificação para os marcadores referentes aos dois genes de interesse, *avrRxv* e do pilus (*pilW* e *pilX*), sendo eles A-2018-1, A-2018-3, A-2018-8, A-2019-09, A-2019-11, A-2019-17, A-2019-20, no entanto, C-2021-01, A-2021-01, A-2021-04 e A-2021-05 amplificaram apenas uma das regiões.

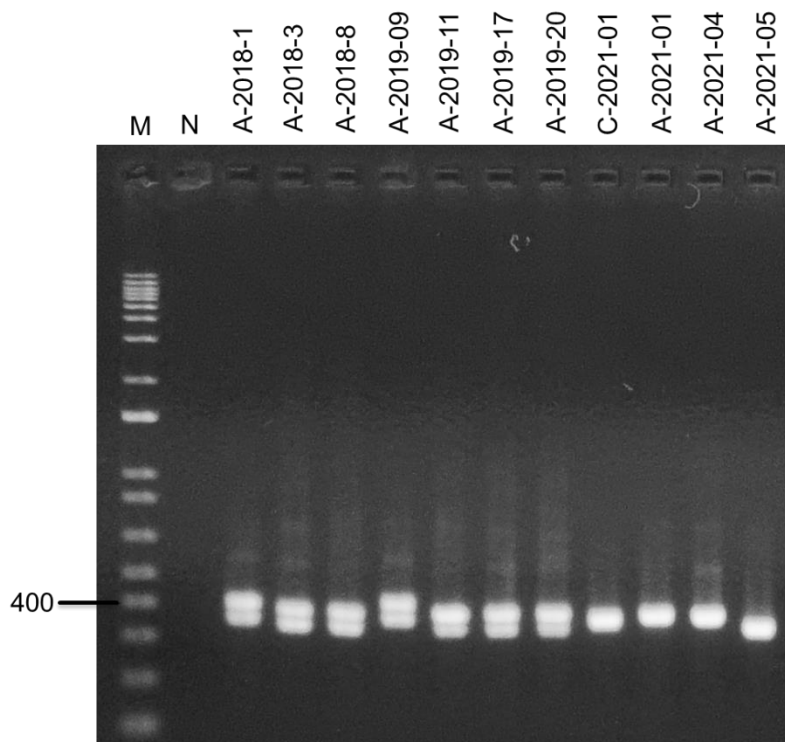


Figura 5. Eletroforese da Multiplex Nested PCR com os *primers* Nxaa1U, Nxaa1L, Nxaa2U e Nxaa2L, com os isolados haplótipos da coleção de *X. euvesicatoria* pv. *allii*. M: marcador 1 Kb Plus da Invitrogen®. N: controle negativo.

LAMP para *Xanthomonas euvesicatoria*

O protocolo LAMP descrito para *X. euvesicatoria* avaliado para os haplótipos definidos neste estudo não gerou amplificação para todos os isolados (Figura 6). Os isolados A-2018-3,

A-2018-8, A-2019-20, C-2021-01 e A-2021-01 não apresentaram amplificação, assim como o controle negativo (sem DNA). Os demais isolados apresentaram o padrão de amplificação típico de reações LAMP, assim como o isolado de referência de *Xanthomonas* de cebola IBSBF 1770 e o isolado de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* de tomate utilizado como controle positivo.

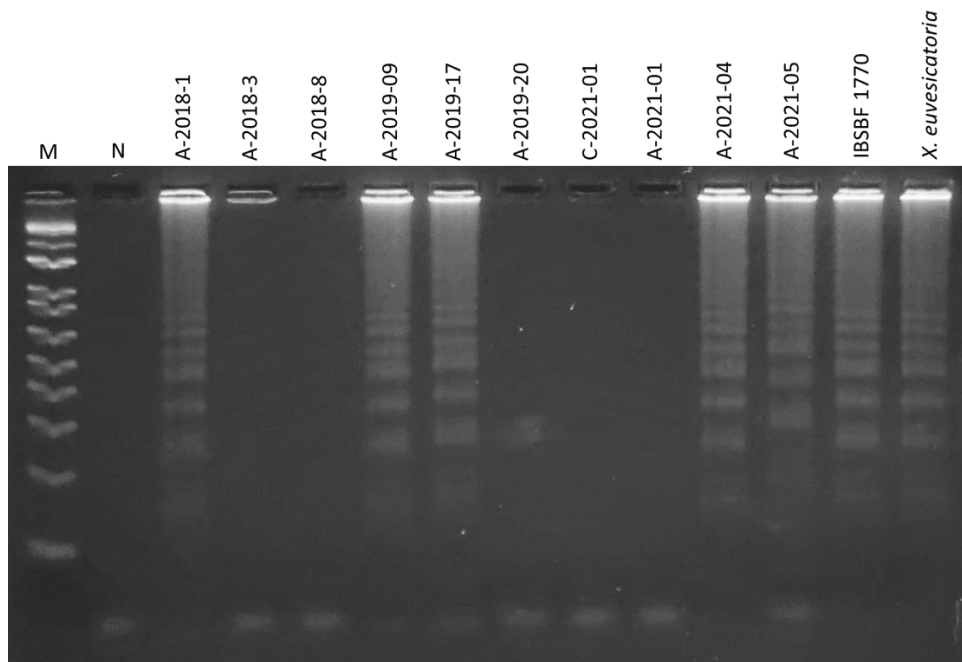


Figura 6. Eletroforese com todos os isolados tipos dos haplótipos com 2,5 ng de DNA por reação e isolado tipo (IBSBF 1770) de *X. euvesicatoria* pv. *allii* (Cebola) e isolado tipo de *X. euvesicatoria* (Tomate). M: marcador 1 Kb Plus da Invitrogen®. N: controle negativo.

Desenho de *primers*

Foram desenhados 13 conjuntos de primers externos (Tabela 6), que serão tratados no presente trabalho como pares de *primers*, já que que o método a ser desenvolvido foi alterado de LAMP para PCR convencional. Após avaliação dos parâmetros de qualidade exigidos para *primers* F3/B3 de LAMP, visando ter *primers* versáteis com possível uso em qPCR e LAMP para detecção de *X. euvesicatoria* pv. *allii* em cebola, foram sintetizados sete pares de *primers*: 5038_ID11 F/R, 5038_ID9 F/R, 5038_ID4 F/R, 5054_ID62 F/R, 1993_ID24 F/R, 1993_ID61 F/R e 2475_ID60 F/R pela Thermo Fisher Scientific. Por meio da análise de subtração *in silico*,

foi possível observar que nenhum dos 13 *primers* desenhados são exclusivos para a patovar *allii*, sendo comum a outras três patovares, *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e *X. euvesicatoria* pv. *citrumelonis*.

Tabela 6. *Primers* desenhados para este estudo com suas respectivas sequências de nucleotídeos, família gênica e gene.

Primers desenhados para este estudo.			
Primer	Sequência (5' - 3')	Família	Gene
3519_ID34_F	TTTCACCACGCAGATCCG	Flagellin_N	Bacterial flagellin N-terminal helical region
3519_ID34_R	GTCAGCTGCTTGA CTTCCG		
5038_ID11_F	CGAAGGAGCTGCACATCG	23S rRNA IVP	23S rRNA-intervening sequence protein
5038_ID11_R	TGTCGCGACTTTCCCAAC		
5038_ID9_F	CCGCGATCAGCATTCAT	23S rRNA IVP	23S rRNA-intervening sequence protein
5038_ID9_R	GATCAATGCGTTGAGCTTGG		
5038_ID4_F	GAACGCTTTGGGCTGACG	23S rRNA IVP	23S rRNA-intervening sequence protein
5038_ID4_R	GCGTTGAGCTTGCAAAC		
5054_ID62_F	CTGACCCAGCTCATCATGG	0	No matches
5054_ID62_R	AAAGCCACCGCCGAAC		
5054_ID50_F	TGCTGACCCAGCTCATCA	0	No matches
5054_ID50_R	AAAGCCACCGCCGAAC		
1993_ID24_F	AGTTGCTGATCGTGGTGAC	Rce1-like	Type II CAAX prenyl endopeptidase Rce1-like
1993_ID24_R	ACTGCGGCCTCCATCC		
1993_ID161_F	TCACCTATCCACTGACGCT	Rce1-like	Type II CAAX prenyl endopeptidase Rce1-like
1993_ID161_R	CGGACCCTGATACAGGTGAT		
1993_ID61_F	GATCTGGTCCAGCCTTTTCG	Rce1-like	Type II CAAX prenyl endopeptidase Rce1-like
1993_ID61_R	ACACCGCCAGCAAGCC		
2475_ID12_F	CGCCAGATGTCCAGCTATC	Phosphonate-bd	ABC transporter, phosphonate, periplasmic substrate-binding protein
2475_ID12_R	GTTCTGCAATGCCAGGGT		
2475_ID60_F	CAGTCGCTGTCGCAGTTG	Phosphonate-bd	ABC transporter, phosphonate, periplasmic substrate-binding protein
2475_ID60_R	CGAACGCGGCAACGT		
2838_ID1_F	TCGTCGCCTCTCGATGG	Glyco_transf_28	Glycosyltransferase family 28 N-terminal domain
2838_ID1_R	GTCGCCATTTACGGATGTCT		
2838_ID10_F	GGCCGGGAGTGGAGAT	Glyco_transf_28	Glycosyltransferase family 28 N-terminal domain
2838_ID10_R	TCACGGGGCACCTCCT		

Avaliação por Primer Blast dos *primers* desenhados

Com base na análise de especificidade realizada no Primer BLAST, alguns *primers* apresentaram *hits* com algumas espécies de *Xanthomonas* (Tabela 7) e os pares 3519_ID34, 5038_ID11, 5054_ID62, 5054_ID50, 1993_ID24, 1993_ID61, 2475_ID60 com nenhuma espécie.

Tabela 7. Pares de *primers* desenhados para *X. euvesicatoria* pv. *allii* que obtiveram hits pelo Primer Blast.

Primer	Primer Blast hits	Primer Blast hits
5038_ID9_F	CCGCGATCAGCATTCAT	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>commiphoreae</i> , <i>X. euvesicatoria</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>citrumelonis</i>
5038_ID9_R	GATCAATGCGTTGAGCTTGG	
5038_ID4_F	GAACGCTTTGGGCTGACG	<i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>alfalfae</i> , <i>X. axonopodis</i> pv. <i>commiphoreae</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>citrumelonis</i>
5038_ID4_R	GCGTTGAGCTTGCAAAC	
1993_ID161_F	TCACCTATCCACTGACGCT	<i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> , <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>alfalfae</i> , <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> , <i>X. phaseoli</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> , <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>citrumelonis</i> , <i>X. vesicatoria</i>
1993_ID161_R	CGGACCCTGATACAGGTGAT	
2475_ID12_F	CGCCAGATGTCCAGCTATC	>10 espécies/patovares
2475_ID12_R	GTTCTGCAATGCCAGGGT	
2838_ID1_F	TCGTCGCCTCTCGATGG	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>commiphoreae</i> , <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> , <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citrumelonis</i> , <i>X. vesicatoria</i>
2838_ID1_R	GTCGCCATTTACGGATGTCT	
2838_ID10_F	GGCCGGGAGTGGAGAT	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>commiphoreae</i> , <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> , <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citrumelonis</i> , <i>X. vesicatoria</i>
2838_ID10_R	TCACGGGGCACCTCCT	

Teste dos *primers* desenhados e otimização da reação

Dos sete pares de *primers* sintetizados, apenas a PCR com o par 5038_ID9 não apresentou amplificação de fragmentos inespecíficos com os três isolados utilizados para o teste (Figura 7). Os demais pares testados apresentaram inespecificidade de amplificação (Figuras 7 e 8), em que além da amplificação do fragmento esperado (200 pb), também houve amplificação de outros fragmentos com tamanhos variáveis.

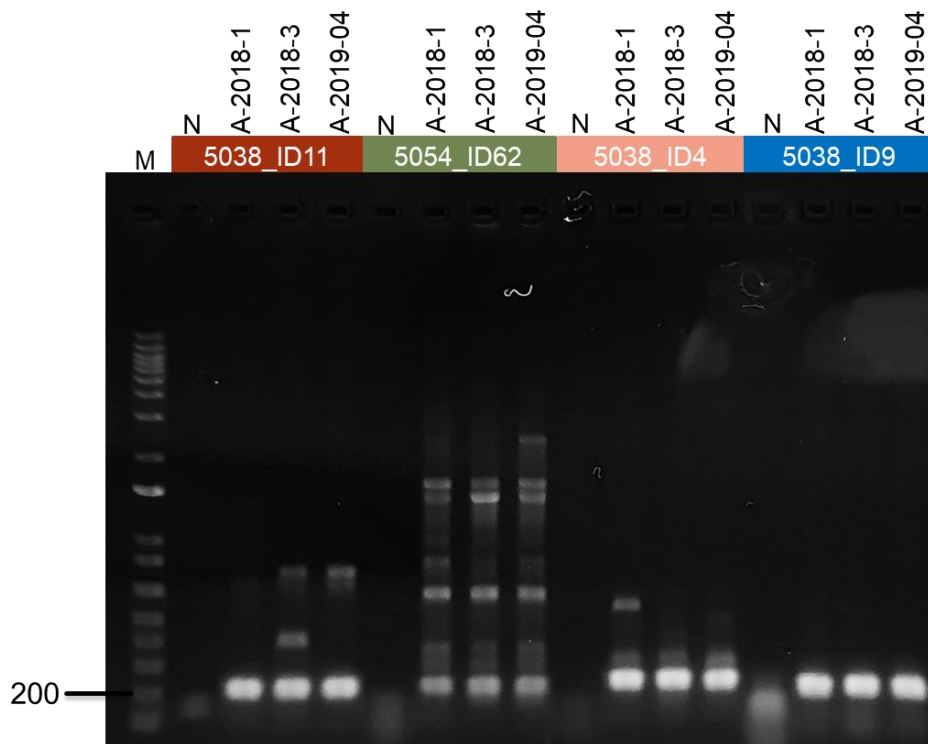


Figura 7. Eletroforese de quatro pares de *primers*, 5038_ID11, 5054_ID62, 5038_ID4 e 5038_ID9 na temperatura de anelamento de 57 °C com três isolados da coleção de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, A-2018-1, A-2018-3 e A-2019-04. M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.

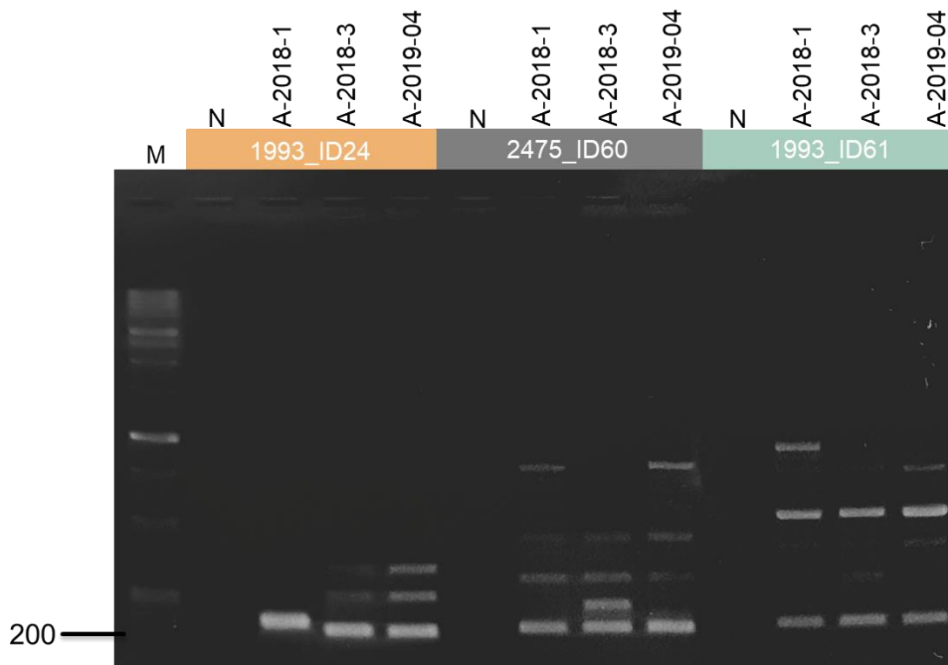


Figura 8. Eletroforese de quatro pares de *primers*, 1993_ID24, 2475_ID60 e 1993_ID61 com três isolados da coleção de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, A-2018-1, A-2018-3 e A-2019-04 para teste de especificidade dos *primers* na temperatura de anelamento de 57 °C. M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.

O aumento de temperatura de anelamento de 57 °C para 62 °C levou à redução na amplificação de fragmentos inespecíficos (Figura 9 e 10). A PCR com os pares 5038C_ID4, 5038_ID11 e 5054_ID62 resultou na amplificação unicamente do fragmento esperado de 200 pb, o que não ocorreu com os pares 1993_ID24, 2475_ID60 e 1993_ID61.

No teste dos pares de *primers* com todos os haplótipos, com temperatura de anelamento em 62 °C, tanto o 5038_ID11 (Figura 11), quanto o 5054_ID62 (Figura 12), resultou em amplificações específicas, inclusive para o isolado de referência IBSBF 1770. O par de *primers* 5038_ID9 apresentou em alguns isolados, como A-2019-09 e A-2021-04, amplificações inespecíficas, portanto a temperatura foi aumentada para 65 °C e depois para 69 °C eliminando amplificações indesejadas (Figura 13).

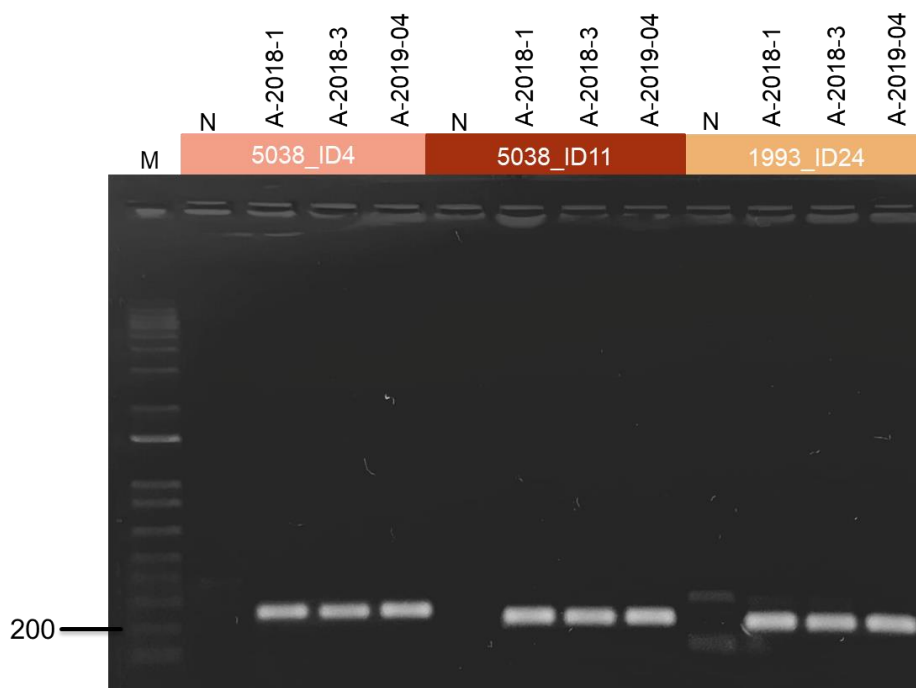


Figura 9. Eletroforese de três conjuntos de *primers*, 5038_ID4, 5038_ID11 e 1993_ID24 com três isolados da coleção, A-2018-1, A-2018-3 e A-2019-04 com a temperatura de anelamento de 62 °C. M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.

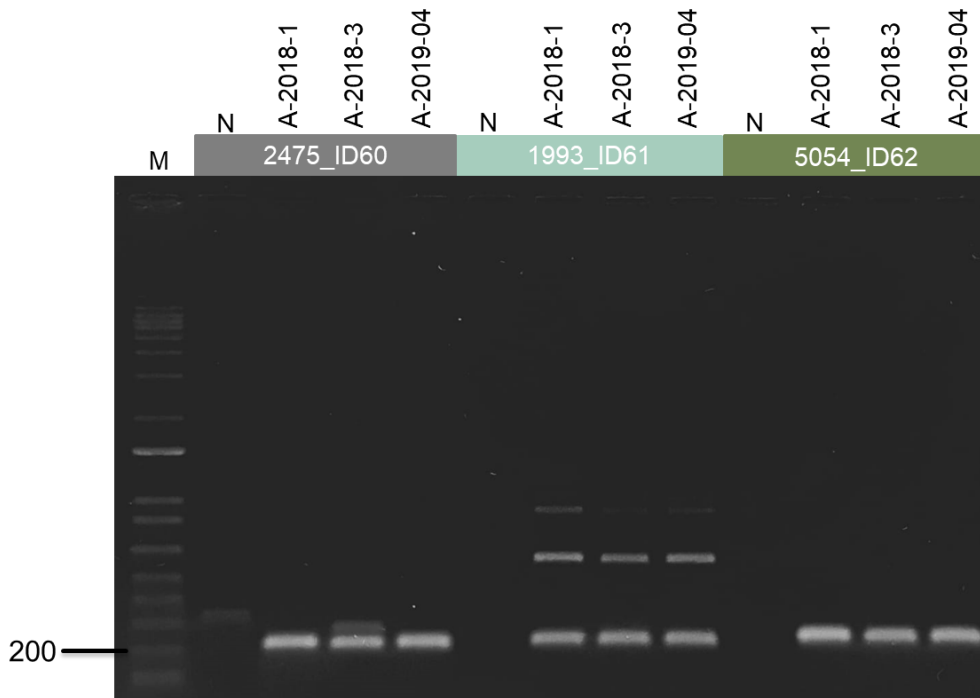


Figura 10. Eletroforese de quatro conjuntos de *primers*, 2475_ID60, 1993_ID61 e 5054_ID62 na temperatura de anelamento de 62 °C com três isolados da coleção, A-2018-1, A-2018-3 e A-2019-04. M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.

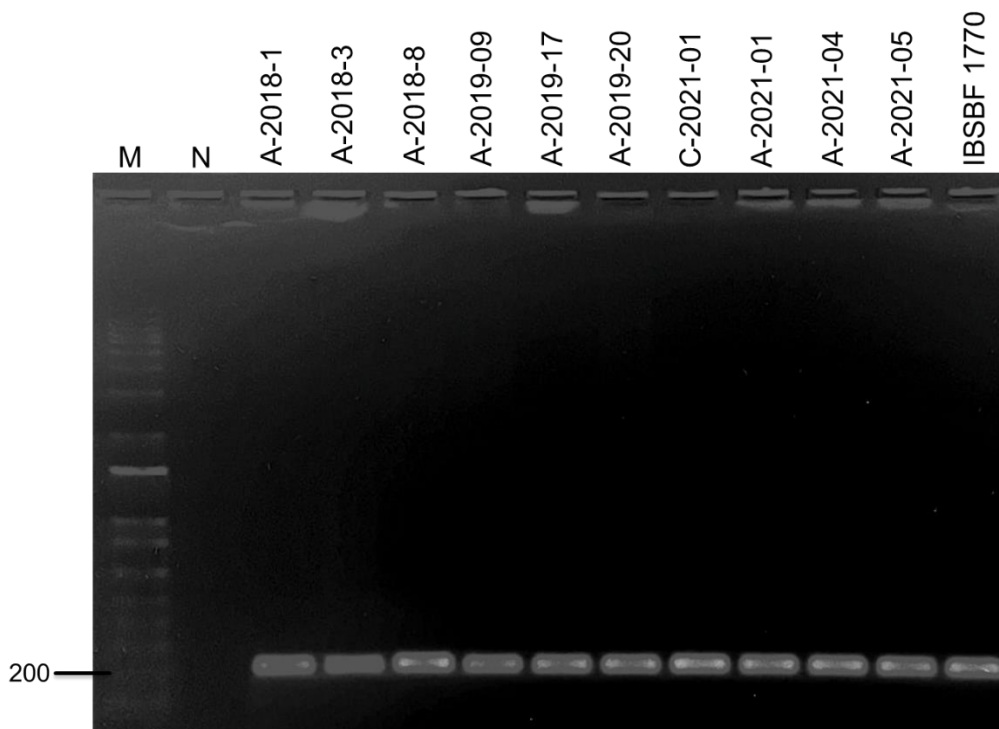


Figura 11. Eletroforese da amplificação de isolados haplótipos, com temperatura de anelamento a 62 °C, utilizando os *primers* 5038_ID11 F/R. M: Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N: Controle Negativo.

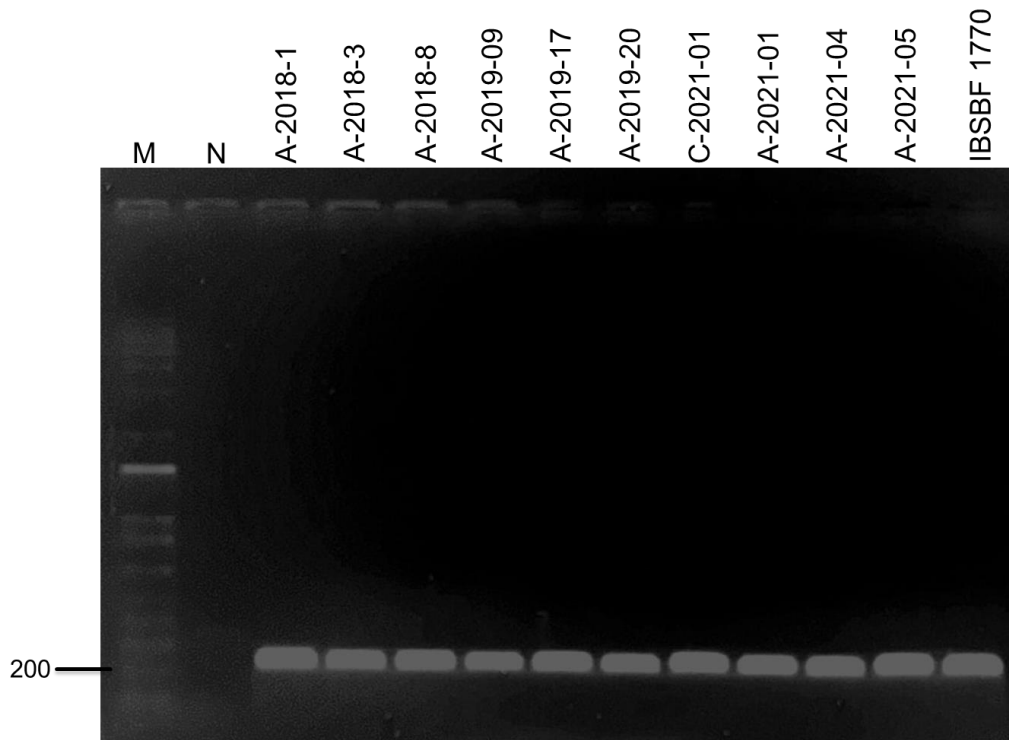


Figura 12. Eletroforese da amplificação de isolados haplótipos, com temperatura de anelamento a 62 °C, utilizando os *primers* 5054_ID62 F/R. M: Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N: Controle Negativo.

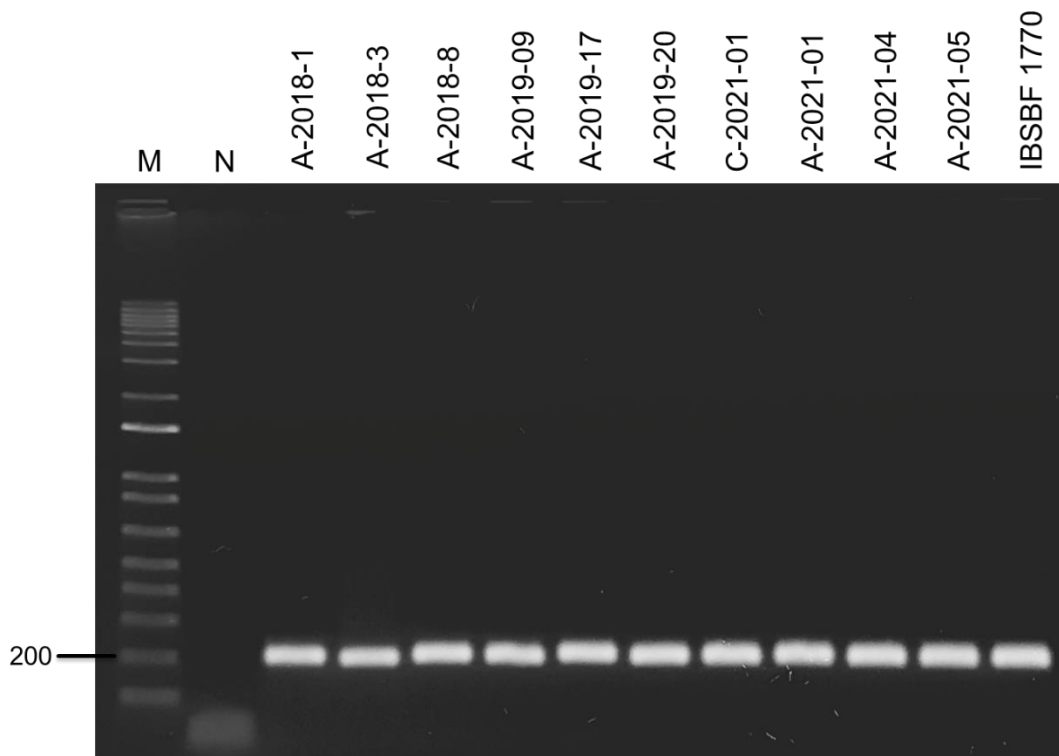


Figura 13. Eletroforese da amplificação de isolados haplótipos, com temperatura de anelamento a 69 °C, utilizando os *primers* 5038_ID9 F/R. M: Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N: Controle Negativo.

Avaliação dos *primers* desenhados com a microbiota de plantas de cebola

A especificidade dos pares de *primers* 5038_ID9, 5038_ID11 e 5054_ID62 foram confirmadas pelo teste de PCR com oito isolados bacterianos provenientes de folhas representando a microbiota presente na folha de cebola. Foram selecionadas oito colônias morfológicamente distintas, advindas do isolamento de macerado de folha, que serão futuramente identificadas por meio do sequenciamento e filogenia da região 16S rRNA. Inicialmente, para confirmar o não pertencimento dos isolados da microbiota ao gênero *Xanthomonas*, foi realizado PCR com o par de *primers* XgumD F7/R7. Ocorreu a amplificação de fragmentos apenas do isolado de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* IBSBF 1770, utilizado como controle positivo (Figura 14).

O par de *primers* 5038_ID9 não levou à amplificação para nenhum dos oito isolados de microbiota de folha de cebola, exceto para o isolado de *X. euvesicatoria* pv. *allii* IBSBF 1770 (Figura 15). O par 5038_ID11 não se mostrou específico, resultando na amplificação dos isolados de microbiota 3, 4, 6, 7 e 8 (Figura 16). O par 5054_ID62 também apresentou amplificação para todos isolados exceto o isolado 5 da microbiota da folha de cebola (Figura 17).

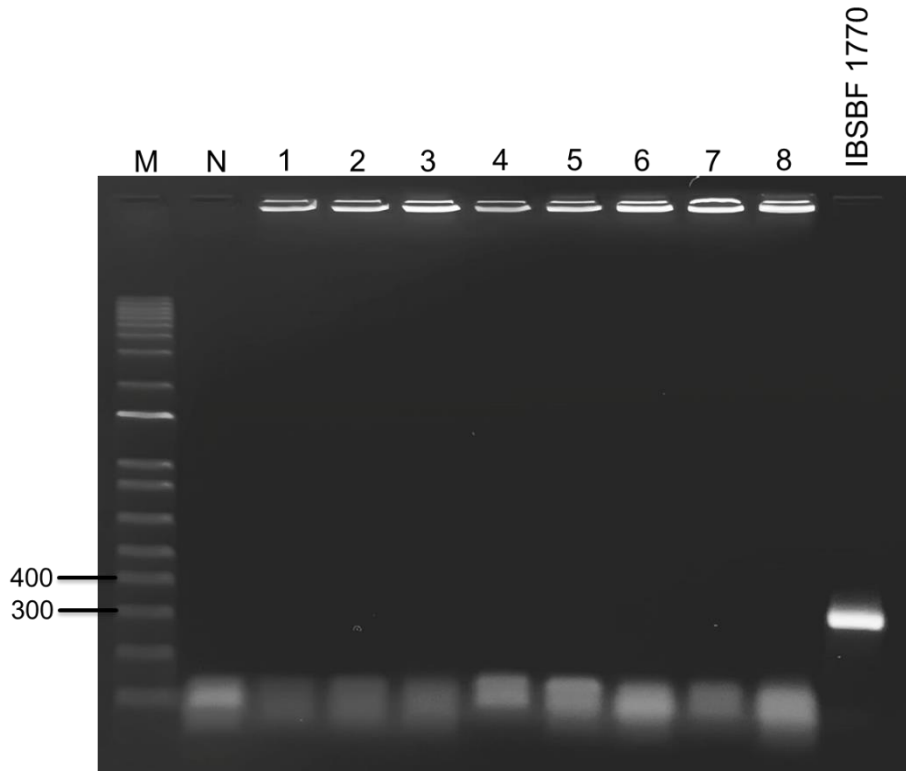


Figura 14. Eletroforese da PCR com o par de *primers* XgumD F7/R7 com isolados da microbiota de folha de cebola. Isolados de 1 a 8 proveniente de macerado de folha, isolado IBSBF 1770 controle positivo de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.



Figura 15. Eletroforese da avaliação do par de *primers* 5038_ID9 com a microbiota de folha de cebola. Isolados de 1 a 8 proveniente de macerado de folha, isolado IBSBF 1770 controle positivo de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.

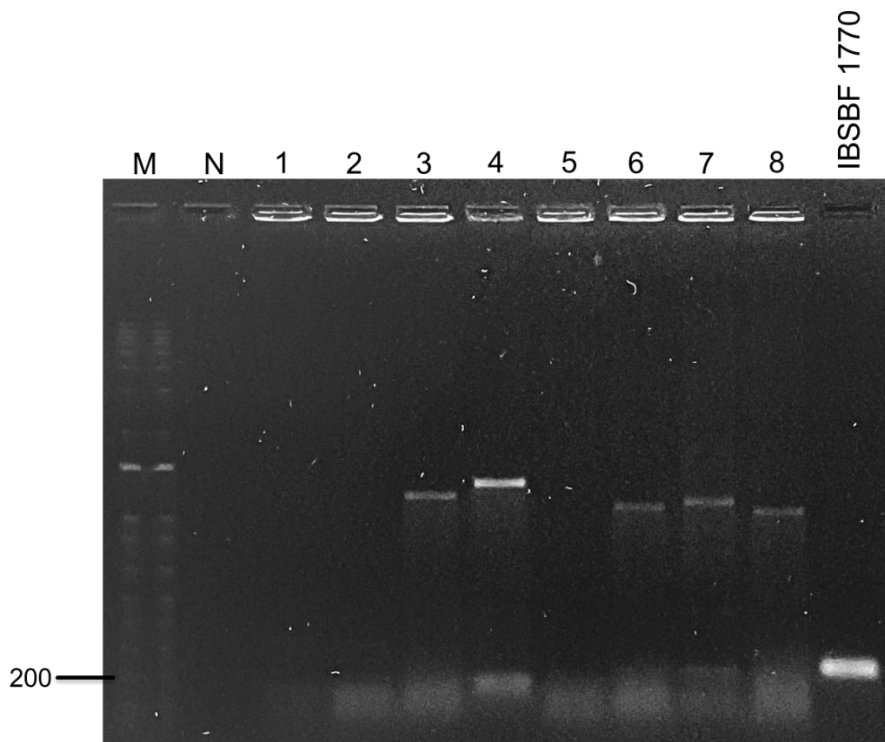


Figura 16. Eletroforese da avaliação do par de *primers* 5038_ID11 com a microbiota de folha de cebola. Isolados de 1 a 8 proveniente de macerado de folha, isolado IBSBF 1770 controle positivo de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.

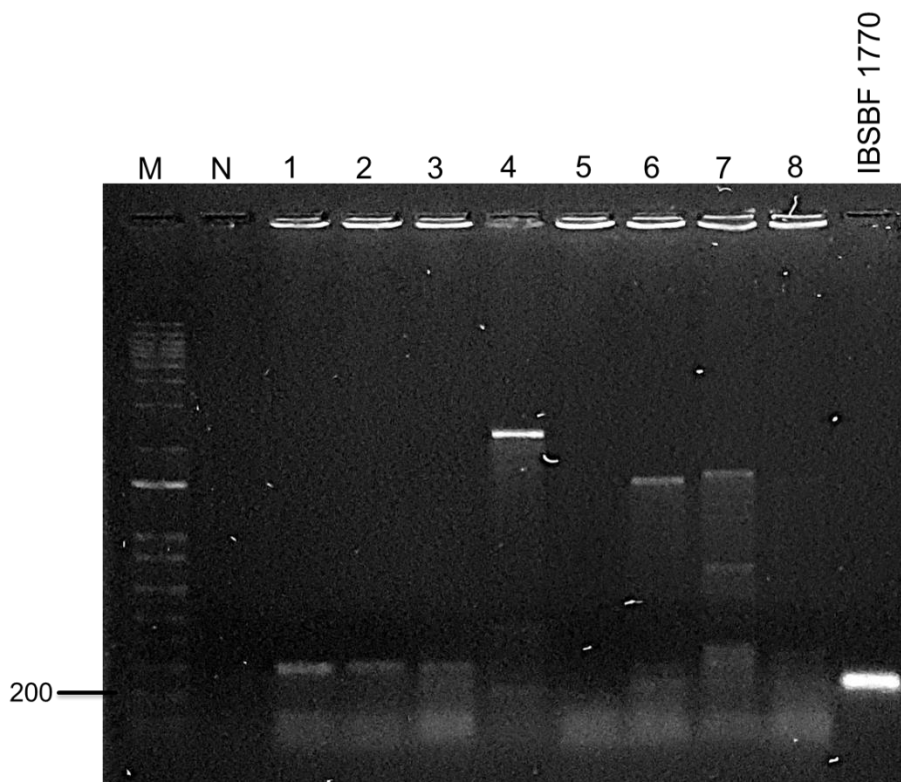


Figura 17. Eletroforese da avaliação do par de *primers* 5054_ID62 com a microbiota de folha de cebola. Isolados de 1 a 8 proveniente de macerado de folha, isolado IBSBF 1770 controle positivo de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. M- Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N- Controle Negativo.

Otimização das reações

Diante da maior especificidade do par de *primers* 5038_ID9 F/R, foi feita a redução da concentração de *primers* de 1 μM para 0,3 μM e ajuste da configuração do termociclador, diminuindo a duração das etapas de anelamento e extensão de 1:30 minutos para 30 segundos cada, resultando na eliminação de dímeros, e otimização do tempo empregado na realização da análise PCR (Figura 18).

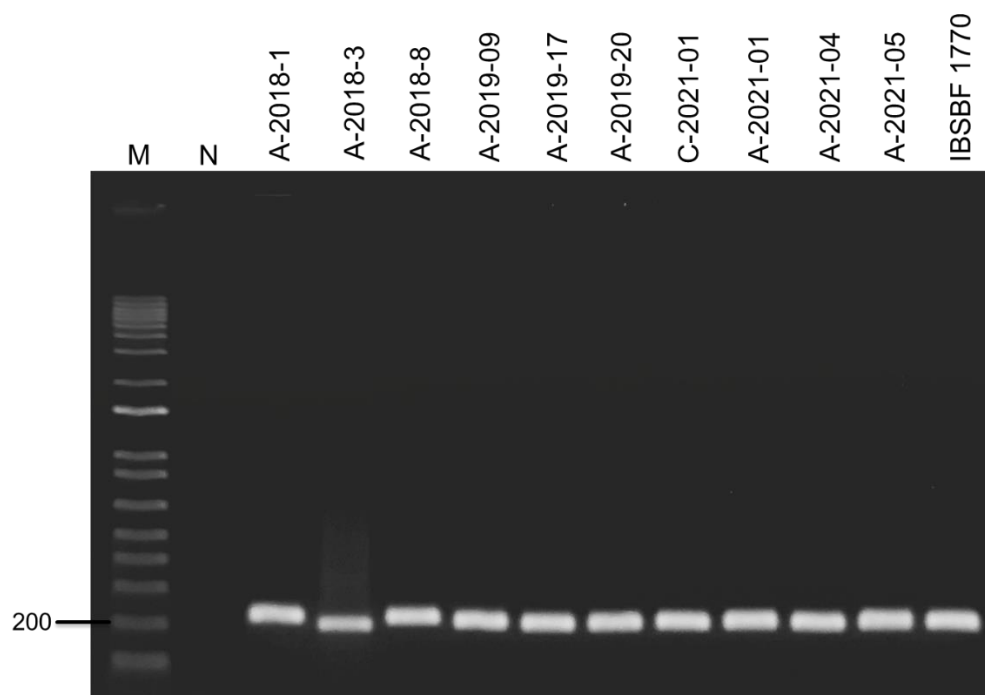


Figura 18. Eletroforese a 1% com amplificação a 69 °C, utilizando o par de *primers* 5038_ID9 F/R com todos os haplótipos e ajuste da reação e configuração do termociclador para PCR convencional. M: Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N: Controle Negativo.

Sensibilidade dos *primer* desenhados

O limite de detecção para *X. euvesicatoria* pv. *allii* com DNA purificado utilizando o conjunto de *primers* 5038_ID9 F/R foi de 50 pg μL^{-1} (Figura 19). Foi possível identificar uma alteração no tamanho dos fragmentos amplificados de acordo com a mudança na quantidade de DNA utilizada para uma reação final de 10 μL . O teste foi realizado em triplicata.

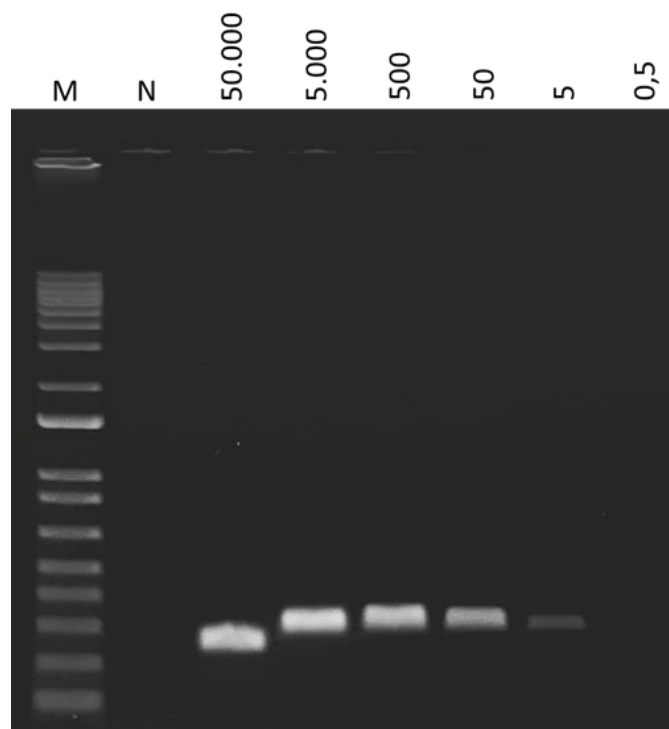


Figura 19. Eletroforese do teste de sensibilidade do par de *primers* 5038_ID9 utilizando entre 50.000, 5.000, 500, 50, 5 e 0,5 pg de DNA extraído do isolado A-2018-1 de *X. euvesicatoria* pv. *allii*. M: Marcador 1 Kb plus Invitrogen®. N – Controle Negativo.

4. DISCUSSÃO

Todos os isolados coletados em 2021 de plantas de cebola com sintomas de queima foliar apresentaram amplificação positiva para o gene *gumD*, uma região conservada para a maioria das espécies de *Xanthomonas* (Lu et al. 2008; Ryan et al. 2011). Descrita por Adriko et al. (2014), foi utilizada por outros autores para identificação preliminar de espécies deste gênero (Mbega et al. 2012; Abdulai et al. 2018; Ferreira, 2021), exceto para as espécies pertencentes ao grupo I de *Xanthomonas*, tais com *X. hyacinthi*, *X. sacchari*, *X. theicola* e *X. translucens* (Adriko et al. 2014).

O marcador BOX-PCR apresentou alta eficiência em identificar a variabilidade dos novos isolados, confirmando os dados de Ferreira (2021) que trabalhou com o mesmo patógenos, mas uma coleção de isolados de anos anteriores. No presente estudo, quatro novos haplótipos foram identificados, confirmando sua robustez para caracterização de isolados do

gênero *Xanthomonas* (Rademaker et al. 2000) e corroborando com estudos anteriormente utilizando marcadores ERIC, REP e BOX-PCR para estudo da diversidade de *Xanthomonas* (Louws et al. 1994; Restrepo et al. 2000; Stöger et al. 2008; Arshiya et al. 2014; Asgarani et al. 2015). O marcador BOX-PCR se mostrou mais eficiente em identificar a diversidade presente em espécies de *Xanthomonas* comparado as demais técnicas de REP-PCR (Louws et al. 1994; Lema et al. 2012).

A elevada variabilidade entre isolados de *X. euvesicatoria* pv. *allii* foi descrito anteriormente por Gent et al. (2004) utilizando três marcadores, ERIC, REP e BOX-PCR, que revelaram a presença de cinco haplótipos entre 49 isolados de regiões geográficas distintas. Picard et al. (2008) usando marcadores AFLP e RFLP identificou a presença de diversidade entre isolados do arquipélago Mascarenhas, com a formação de dois grupos de isolados geneticamente relacionados distinguíveis por AFLP. Recentemente, Ferreira (2021) por meio dos *fingerprints* gerados por BOX-PCR com 34 isolados do Cerrado no Centro-Oeste brasileiro dos anos 2018/2019 identificou a presença de oito haplótipos, evidenciando a alta variabilidade presente em *X. euvesicatoria* pv. *allii* nessa região produtora de cebola do Brasil.

Por meio de MLSA os isolados foram agrupados com *Xanthomonas euvesicatoria*. A MLSA baseada no uso dos quatro genes *housekeeping dnaK, fyuA, gyrB e rpoD*, havia sido utilizada anteriormente por Young et al. (2008) e Young et al. (2010), evidenciando a diversidade presente entre diferentes espécies de *Xanthomonas*. Para a patovar *allii*, Ferreira (2021) constatou elevada variabilidade genética entre isolados coletados entre 2018 e 2019 de algumas localidades no Cerrado da região Centro-Oeste, utilizando estes mesmos genes *housekeeping*. comparável grau de variabilidade foi encontrada entre os isolados de *X. euvesicatoria* pv. *allii* coletados em 2021.

A variação entre o número de haplótipos encontrados no BOX-PCR e na análise de MLSA indica que o primeiro apresenta maior resolução para estudos de diversidade genética.

Os oito haplótipos BOX encontrados por Ferreira (2021) e os quatro do presente trabalho, resultaram em somente cinco cladogramas distintos na árvore filogenética com quatro regiões gênicas.

Como genes *housekeeping* selecionados para MLSA são, por conceito, cópias únicas, genes ortólogos e altamente conservados, podem não estar representando toda a variabilidade genética presente nessa patovar (Rong e Huang, 2014). A distribuição variável dos isolados da patovar *allii* na árvore filogenética indica sua natureza polifilética, assim como descrito por Hajri et al. (2009), podendo essa capacidade de infectar aliáceas ser o resultado de convergência evolutiva.

Avanços na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de métodos de detecção com maior rapidez, eficiência, especificidade e sem necessidade de análise pós-PCR como LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) desenvolvido por Notomi et al. (2000). Larrea-Sarmiento et al. (2018) desenvolveram e validaram LAMP para detecção de *Xanthomonas euvesicatoria*. A avaliação deste método mostrou detecção variável dos haplótipos brasileiros de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, não sendo indicado para utilização na detecção deste patógeno da cebola. Isso se justifica pela alta variabilidade presente em *X. euvesicatoria* pv. *allii* como demonstrado em estudos realizados anteriormente por Gent et al. (2004) com marcadores REP-PCR, Picard et al. (2008) com o uso de marcadores AFLP e RFLP e Ferreira (2021) por meio dos *fingerprints* gerados por BOX-PCR e MLSA. A especificidade do ensaio LAMP foi confirmada por Larrea-Sarmiento et al. (2018), utilizando diversas espécies de *Xanthomonas*, incluindo um isolado do Havaí de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, o qual não apresentou amplificação, demonstrando que este ensaio não apresenta potencial para identificação de todas as patovares de *X. euvesicatoria*.

Para avaliar a capacidade de detectar a variabilidade brasileira de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, um protocolo de Multiplex Nested PCR desenvolvido por Robène-Soustrade et al. (2010) para detecção em sementes, foi avaliado. Foi possível constatar a eficiência deste método para

detecção de todos isolados haplótipos de *X. euvesicatoria* pv. *allii* utilizados neste estudo. Esses dados corroboram com resultados obtidos por Robène-Soustrade et al. (2010) em que obteve amplificação para todas as 86 cepas de *X. euvesicatoria* pv. *allii* testadas, proveniente de diferentes regiões do mundo, inclusive do Brasil. No entanto, a utilização do Multiplex Nested PCR implica em alto custo de reagentes, materiais, demanda de maior tempo para realização do teste, devido as duas rodadas de PCR exigidas e também maior risco de contaminações (Weidmann et al. 2003; Bass et al. 2008).

A análise por subtração *in silico* em que foram utilizadas sequencias de genomas completos disponíveis no banco de dados GenBank, possibilitou na descoberta de regiões comuns a todos genomas da patovar *allii*. Porém, não foram encontradas regiões exclusivas quando comparadas com outras patovares, provavelmente devido à variabilidade genética dentro desta patovar, como visto por Gent et al. (2004), Picard et al. (2008) e Ferreira (2021). Outro fator que pode ter interferido com o não encontro de regiões exclusivas é a técnica utilizada, de busca e comparação unicamente de regiões codantes, em que parte da variabilidade do genoma não é analisada. Outros estudos utilizaram também a subtração *in silico*, porém comparando a sequência completa de nucleotídeos, independente de genes, como Paudel et al. (2022) que desenvolveram *primers* específicos para espécies do gênero *Ralstonia*, um complexo de espécies com elevada variabilidade genética.

As regiões genômicas empregadas no presente estudo, mesmo compartilhadas com outras patovares, como pv. *perforans* e *citrumelonis*, tiveram o potencial para desenho de *primers* inclusivos e com maior exclusividade do que os desenhados por Robène-Soustrade et al. (2010) e Robène et al. (2015), que resultaram na amplificação de *X. euvesicatoria* pv. *citrumelonis*, *X. euvesicatoria* pv. *vesicatoria*, *X. cassavae*, *X. vasicola* pv. *musacearum*, *X. axonopodis* pv. *begoniae* e outras cinco espécies de *Xanthomonas* patogênicas a espécies hospedeiras de menor importância.

Os *primers* usados na PCR foram inclusivos, amplificando toda a diversidade brasileira de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, confirmando que é uma região uniforme e presente em todos os isolados, com elevado potencial na detecção da queima foliar em cebola. Além de ser uma técnica de detecção menos onerosa e laboriosa do que métodos anteriormente descritos para detecção de *X. euvesicatoria* pv. *allii*, como a Multiplex Nested PCR (Robène-Soustrade et al. 2010) que utiliza 8 *primers* e exige duas rodadas de PCR, ou a qPCR (Robène et al. 2015), que depende de corantes e equipamentos mais caros (Pečenka et al. 2020). A PCR com os *primers* desenvolvidos no presente trabalho também foi superior ao protocolo LAMP desenvolvido por Larrea-Sarmiento et al. (2018), que mesmo sendo muito sensível e de simples aplicação, não abrangeu toda a diversidade de isolados avaliados de *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

Os *primers* desenhados se mostraram sensíveis, apresentando um limiar de detecção de até 50 pg μl^{-1} , similar a outros protocolos descritos para espécies de *Xanthomonas* (Araújo et al. 2012; Pečenka et al. 2020). O par de *primers* 5038_ID9 foi superior a outros pares desenvolvidos para outras bactérias fitopatogênicas, como os três pares de *primers* utilizados para detecção de espécies de *Ralstonia* (Paudel et al. 2022) que detecta até 100 pg μl^{-1} para e menos sensível que outros, que demonstraram maior sensibilidade ao amplificar 10 pg μl^{-1} (Trindade et al. 2007), 6 pg μl^{-1} (Rubel et al. 2019) e 55 fg μl^{-1} (Sakthivel et al. 2001) de DNA de algumas *Xanthomonas*.

Alguns representantes da microbiota de folha de cebola foram amplificados pelos *primers* 5038_ID11 e 5054_ID62, indicando que outras espécies apresentam regiões homólogas com as regiões usadas no desenho desses pares de *primers* (Wu et al. 1991). No entanto, o par de *primers* 5038_ID9 se mostrou específico ao não amplificar o DNA de nenhum isolado bacteriano pertencente à microbiota, evidenciando seu potencial de utilização para amplificar apenas seu alvo (Hwang et al. 2003). A especificidade vista nos testes com microbiota não excluí a possibilidade da ocorrência de falsos positivos para cebolas cultivadas em outros solos,

locais, biomas, períodos do ano, já que as populações de filosfera e rizosfera podem ser altamente variáveis (Bailey, 1995).

A maioria dos *primers* desenhados, quando testados em temperaturas mais baixas, apresentaram ampliações inespecíficas, o que foi extinguido com o aumento da temperatura de anelamento. Um par de *primers* pode se ligar a outro que não o seu alvo, levando a ampliações inespecíficas, devido a presença de regiões homólogas (Ye et al. 2012). Com o intuito de reduzir ampliações de produtos não específicos, diversas vezes as reações são conduzidas em temperatura de anelamento mais elevadas (Wu et al. 1991), em razão da sua importância em determinar que os *primers* se liguem somente com sua sequência alvo (Wu et al. 1991; Hwang et al. 2003).

Outro fator que pode afetar a especificidade da reação de PCR é a formação de dímeros, como observado nos testes. Segundo Saiki (1989), a redução na concentração de *primers* na reação pode oferecer melhorias. Estudo realizado por Das et al. (1999) avaliando a relação entre o número de ciclos da PCR e a formação de dímero de *primers*, constatou que havia uma relação positiva entre a redução do número de ciclos e da formação de dímeros. No presente estudo, a otimização da configuração do termociclador com redução na duração das etapas de anelamento e extensão, mantendo o número de ciclos, associado a redução na concentração dos *primers*, se mostrou eficiente para eliminação da formação de dímeros, conduzindo a um método de amplificação otimizado para amplificação específica de *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

5. CONCLUSÃO

- Os isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* coletados em 2021 de campos de cebola de localidades do cerrado na região centro-oeste e sudeste do Brasil, apresentam ampla variabilidade quando analisados por BOX-PCR e MLSA,
- O protocolo LAMP descrito para *X. euvesicatoria* não foi capaz de detectar toda a variabilidade brasileira da patovar *allii*;
- O protocolo de detecção por Multiplex Nested PCR foi capaz de detectar todos os haplótipos de *X. euvesicatoria* pv. *allii*;
- A abordagem de subtração *in silico* se mostrou eficiente na análise de genômica comparativa, porém a diversidade genética da patovar *allii* impossibilitou o desenho de *primers* exclusivos para esta patovar;
- Dos 13 pares de *primers* desenhados, somente um par apresentou elevada sensibilidade e não amplificação de isolados não alvos de microbiota de folhas de cebola.

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.

Adriko J, Mbega ER, Mortensen CN, Wulff EG, Tushemereirwe WK, Kubiriba J, Lund OS (2014) Improved PCR for identification of members of the genus *Xanthomonas*. European Journal of Plant Pathology 138(2):293-306.

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, Costa JR, Ferreira MASV, Quezado-Duval AM (2012) Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. Journal of Applied Microbiology 113(6):1479-1490.

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):30.

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.

Arya M, Baranwal VK, Ahlawat YS, Singh L (2006) Detecção por RT-PCR e caracterização molecular do Onion yellow dwarf virus associado a alho e cebola. Ciência atual 1230-1234.

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.

Bahadoran Z, Mirmiran P, Momenan AA, Azizi F (2017) *Allium* vegetable intakes and the incidence of cardiovascular disease, hypertension, chronic kidney disease, and type 2 diabetes in adults: a longitudinal follow-up study. Journal of hypertension 35(9):1909-1916.

Bailey, M. J. (1995). Extraction of DNA from the phyllosphere. In: Trevors, J.T., van Elsas, J.D. (eds) Nucleic Acids in the Environment. Springer Lab Manuals. Springer, Berlin, p. 89-109.

Bass C, Nikou D, Blagborough AM, Vontas J, Sinden RE, Williamson MS, Field LM (2008) PCR-based detection of *Plasmodium* in *Anopheles mosquitoes*: a comparison of a new high-throughput assay with existing methods. Malaria journal 7(1):1-9.

CABI (2022) Centre for Agriculture and Biosciences International. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/56899#toDistributionMaps>

Catara V, Cubero J, Pothier JF, Bosis E, Bragard C, Đermić E, Holeva MC, Jacques MA, Petter F, Pruvost O, Robène I, Studholme DJ, Tavares F, Vicente JG, Koebnik R Costa J (2021) Trends in molecular diagnosis and diversity studies for phytosanitary regulated *Xanthomonas*. *Microorganisms* 9(4):862.

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.

Das S, Mohapatra SC, Hsu JT (1999) Studies on primer-dimer formation in polymerase chain reaction (PCR). *Biotechnology Techniques* 13(10):643-646.

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.

Dye DW, Bradbury J, Goto M, Hayward AC, Lelliott RA, Schroth MN (1980) International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology* 59(4):153-168.

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>

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (2021) Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina. https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/Sintese_2020_21.pdf

EPPO. PM 7/128 (1) *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (2016). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epp.12329>

FAOSTAT (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION STATISTICS) (2022) Food and agriculture organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QI>

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.

Faure D, Joly D (2015) Next-generation sequencing as a powerful motor for advances in the biological and environmental sciences. *Genetica* 143(2):129-32.

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.

Ferreira LDC (2021) Diversidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, agente causal da queima bacteriana em cebola no cerrado brasileiro. Universidade de Brasília, Dissertação 85p.

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):e00727-14.

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 (2004) Polyphasic Characterization of *Xanthomonas* Strains from Onion. *Phytopathology* 94(2):184-195.

Gent DH, Toit LJ, Fichtner SF, Mohan SK, Pappu HR, Schwartz HF (2006) Iris yellow spot virus: an emerging threat to onion bulb and seed production. *Plant Disease* 90(12):1468-1480.

Gill HK, Garg H, Gill AK, Gillett-Kaufman JL, Nault BA (2015) Onion thrips (Thysanoptera: Thripidae) biology, ecology, and management in onion production systems. *Journal of Integrated Pest Management* 6(1):1-9.

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 tripses e míldio em cebola. *Global Science and Technology* 11(1):58-66.

Hajri A, Brin C, Hunault G, Lardeux F, Lemaire C, Manceau C, Poussier S (2009) A «repertoire for repertoire» hypothesis: Repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One* 4(8):e6632.

Huelsenbeck JP, Ronquist FJB (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8):754-755.

Hwang IT, Kim YJ, Kim SH, Kwak CI, Gu YY, Chun JY (2003) Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *Biotechniques* 35(6):1180-1184.

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 2020. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/14/0?ano=2020&localidade1=41&localidade2=35>

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):1-11.

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.

Kavhiza NJ, Zargar M, Prikhodko SI, Pakina EN (2022) Comparison of three commercial DNA extraction kits for the enhancement of PCR assay sensitivity for *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. *Journal of Applied Microbiology* 132(2):1221-1226.

Kazimierczak R, Średnicka-Tober D, Barański M, Hallmann E, Góralska-Walczak R, Kopczyńska K, Rembalkowska E, Górski J, Leifert C, Rempelos L e Kaniszewski S (2021) The effect of different fertilization regimes on yield, selected nutrients, and bioactive compounds profiles of onion. *Agronomy* 11(5):883.

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. *Bioinformatics* 28(12):1647-1649.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution* 35(6):1547.

Lamson DW, Brignall MS (2000) Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic* 5(3):196-208.

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.

Larrea-Sarmiento A, Dhakal U, Boluk G, Fatdal L, Alvarez A, Strayer-Scherer A, Paret M, Jones J, Jenkis D, Arif M (2018) Development of a genome-informed loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and specific detection of *Xanthomonas euvesicatoria*. *Scientific Reports*, 8(1):1-11.

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* 133:105123.

Leach A, Hay F, Harding R, Damann KC, Nault B (2020) Relationship between onion thrips (*Thrips tabaci*) and *Stemphylium vesicarium* in the development of *Stemphylium* leaf blight in onion. *Annals of Applied Biology* 176(1):55-64.

Lema M, Cartea ME, Sotelo T, Velasco P, Soengas P (2012) Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by *Brassica* spp. genotypes and rep-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 133(1):159-169.

Lipps SM, Samac DA (2021) *Pseudomonas viridiflava*: An internal outsider of the *Pseudomonas syringae* species complex. *Molecular Plant Pathology* 23(1):3-15.

Lopes LHR, Boiteux LS, Rossato M, Aguiar FM, Fonseca ME, Oliveira VR, Reis A (2021) Diversity of *Colletotrichum* species causing onion anthracnose in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 159(2):339-357.

Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, De Bruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and environmental microbiology* 60(7):2286-2295.

Lu H, Patil P, Van Sluys MA, White FF, Ryan RP, Dow JM, Rabinowicz P, Salzberg SL, Leach JE, Sonti R, Brendel V, Bogdanove AJ (2008) Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. *PLoS one* 3(11):e3828.

Mahuku, GS (2004). A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:71-81.

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.

Mangli 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.

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

Marrelli M, Amodeo V, Statti G, Conforti F (2018) Biological Properties and Bioactive Components of *Allium cepa* L.: Focus on Potential Benefits in the Treatment of Obesity and Related Comorbidities. *Molecules* 24:119.

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.

Mbega ER, Mabagala RB, Adriko J, Lund OS, Wulff EG, Mortensen CN (2012) Five species of xanthomonads associated with bacterial leaf spot symptoms in tomato from Tanzania. *Plant Disease* 96(5):760-760.

Menezes FOGD, Resende RS, Araújo ERD (2021) Severidade do míldio da cebola em sistema superadensado para as condições do Alto Vale do Itajaí-SC. *Summa Phytopathologica* 47:116-121.

Michereff Filho M, Guimarães JA, Moura AP, Oliveira VR, LIZ RS (2012) Reconhecimento e controle de pragas da cebola. Embrapa, Circular Técnica n.110, 11p.

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.

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.

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.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2022) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2508?genome_assembly_id=315650

- 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.
- Nemeth K, Piskula MK (2007) Food content, processing, absorption and metabolism of onion flavonoids. *Critical reviews in food science and nutrition* 47(4):397-409.
- 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.
- Nicastro HL, Ross SA, Milner JA (2015) Garlic and Onions: Their Cancer Prevention Properties. *Cancer prevention research* 8(3):181-189.
- Nielsen K, Yohalem DS (2001) Origin of a polyploid *Botrytis* pathogen through interspecific hybridization between *Botrytis aclada* and *B. byssoidea*. *Mycologia* 93:1064–1071.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research* 28(12):e63-e63.
- 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. *Plant Pathology* 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.
- 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.

- Paudel S, Dobhal S, Lowe-Power T, Schlub RL, Hu J, Allen C, Alvarez AM, Arif M (2022) “RSSC-Lineage Multiplex PCR” assay detects and differentiates *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, *R. syzygii* and the R3bv2 subgroup. Preprint at <https://assets.researchsquare.com/files/rs-1693987/v1/e821e8ad-0b6f-4256-8211-3c4a266c131f.pdf?c=1653578710>
- Paulraj L, O’Garro, LW (1993) Leaf blight of onions in Barbados caused by *Xanthomonas campestris*. *Plant Disease* 77:198-201.
- Pečenka J, Kocanová M, Baránek M, Gazdík F, Ragasová L, Peňázová E, Čechová J, Beran P, Eichmeier A (2020) Species-specific PCR primers for the detection of poorly distinguishable *Xanthomonas euvesicatoria*. *Crop protection* 127:104978.
- 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.
- Poirier S, Dauphinais N, Van der Heyden hervé, Véronneau P-Y, Bélair G, Gravel V, Mimee B (2019) Host range and genetic characterization of *Ditylenchus dipsaci* populations from eastern Canada. *Plant Disease* 103(3).
- 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.
- Ren F e Zhou S (2021) Phenolic Components and Health Beneficial Properties of Onions. *Agriculture* 11(9):872.
- Resende RS, Araújo ER, Klabunde GHF, Rossato M (2022) First report of *Pantoea ananatis* causing a foliar and bulb disease on onion in Brazil. *Journal of Plant Pathology* 104(1):463-464.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 MH, Natarajan S, Hossain MR, Nath UK, Afrin KS, Lee JH, Kim HT, Jong-In P, Nou IS (2019) Pathovar specific molecular detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the causal agent of black rot disease in cabbage. *Canadian Journal of Plant Pathology* 41(3):318-328.
- 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.
- Saiki RK (1989) The design and optimization of the PCR. In *PCR technology* (pp. 7-16). Palgrave Macmillan, London.
- 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.
- Sakthivel N, Mortensen C, Mathur S (2001) Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(3), 435-441.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy GH, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK, Vidaver AK (2005) Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 28(6), 494-518.

Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Sechler A, Agarkova IV, Stromberg PE, Stromberg VK, Vidaver AK (2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Papers in Plant Pathology*, 96.

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.

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.

Small LW (1973) A Preliminary Report on Onion Blast Disease in Barbados (No. 2023-2017-4736).

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.

Steentjes MB, Scholten OE, van Kan JA (2021) Peeling the onion: Towards a better understanding of *Botrytis* diseases of onion. *Phytopathology*, 111(3), 464-473.

Stöger A, Barionovi D, Calzolari A, Gozzi R, Ruppitsch W, Scortichini M (2008) Genetic variability of *Xanthomonas fragariae* strains obtained from field outbreaks and culture collections as revealed by repetitive-sequence PCR and AFLP. *Journal of Plant Pathology*, 469-473.

Suleria HAR, Butt MS, Anjum FM, Saeed F, Khalid N (2013) Onion: Nature protection against physiological threats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–17.

Sutherland IW (1993) Xanthan. In: Swings JG, Civerolo EL. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p. 363-388.

Taglienti A, Araniti F, Piscopo A, Tiberini A (2021) Characterization of Volatile Organic Compounds in ‘Rossa di Tropea’ Onion by Means of Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography–Mass Spectrometry (HS/SPME GC–MS) and Sensory Analysis. *Agronomy*, 11(5), 874.

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.

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.

Tomaz IL, Lima A (1986) An important disease of onion caused by *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) Simmons in Portugal. An important disease of onion caused by *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) Simmons in Portugal., (48).

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

Trindade LCD, Marques E, Lopes DB, Ferreira MÁDSV (2007) Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Summa Phytopathologica*, 33, 16-23.

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.

Vilela NJ, Makishima N, Oliveira VR, Costa ND, Madail JCM, Camargo Filho WP, Boeing G, Melo PCTD (2005) Desafios e oportunidades para o agronegócio da cebola no Brasil. *Horticultura Brasileira*, 23, 1029-1033.

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.

Weidmann M, Meyer-König U, Hufert FT (2003) Rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 41(4), 1565-1568.

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.

Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Qian JIN, Wallace RB (1991) The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and cell biology*, 10(3), 233-238.

Rong X, Huang Y (2014) Multi-locus Sequence Analysis: Taking Prokaryotic Systematics to the Next Level. In: Goodfellow M, Sutcliffe I, Chun J. New approaches to prokaryotic systematics. Academic Press, p. 221-251.

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.

Yanti Y, Hamid H, Nurbailis N, Tanjung MP (2022) Potensi Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) UNTUK Meningkatkan Ketahanan Bawang Merah Terhadap *Xanthomonas axonopodis* pv. *alii*. National Multidisciplinary Sciences, 1(2), 204-210.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC bioinformatics, 13(1), 1-11.

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.

Zhao XX, Lin FJ, Li H, Li HB, Wu DT, Geng F, Gan RY (2021) Recent advances in bioactive compounds, health functions, and safety concerns of onion (*Allium cepa* L.). Frontiers in Nutrition, 8.