



MARÍA CRISTINA TROYA MOGOLLÓN

**PHYLOGENY OF *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense STRAINS
AND MICROBIOME ASSOCIATED WITH BANANA
CULTIVARS**

**LAVRAS MG
2023**

MARÍA CRISTINA TROYA MOGOLLÓN

**PHYLOGENY OF *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense STRAINS AND MICROBIOME
ASSOCIATED WITH BANANA CULTIVARS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

Profa. Dra. Joyce Doria Rodrigues
Orientadora

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning
Co-orientador

LAVRAS MG

2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pela própria autora.**

Troya Mogollón, María Cristina.

**Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense strains
and microbiome associated with banana cultivars**

/ María Cristina Troya Mogollón. - 2023.

82 p. : il.

Orientadora: Joyce Doria Rodrigues.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Raças. 2. Espécies filogenéticas. 3. *Musa* sp.

I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MARÍA CRISTINA TROYA MOGOLLÓN

**PHYLOGENY OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* STRAINS AND MICROBIOME
ASSOCIATED WITH BANANA CULTIVARS**

**FILOGENIA DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* E MICROBIOMA
ASSOCIADO A CULTIVARES DE BANANEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 24 de abril de 2023.

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning	DFP - UFLA
Profa. Dra. Cristina Ferreira Silva	DBI - UFLA
Profa. Dra. Leila Aparecida Salles Pio	DAG - UFLA
Prof. Dr. Lucas William Mendes	CENA - USP

Prof. Dra. Joyce Doria Rodrigues
Orientadora

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning
Co-orientador

**LAVRAS MG
2023**

A Deus,

A meu amado esposo, Igor Alexei Castro Revelo, que sempre me acompanha, meu anjo

A minha filha Zoe Castro Troya, minha força

A meus pais que estão na presença de Deus Pedro Troya e Magdalena Mogollón

A Nancy Revelo de Castro, por seu apoio e carinho de mãe

A meus irmãos Jaime Troya, Rita Troya, Irina Troya, Vicente Troya e Jonathan Morales.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão à Universidade Federal de Lavras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola por me dar a oportunidade de fazer meu doutorado e desenvolver esta Tese.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro.

Gostaria de agradecer a todos os professores envolvidos em minha formação por suas valiosas lições durante o doutorado.

Agradeço aos membros da banca examinadora pela participação e sugestões oferecidas.

Meus agradecimentos pelo apoio a minha orientadora Profa. Joyce Doria Rodrigues.

Um agradecimento especial a meu coorientador Prof. Ludwig H. Pfenning, por sua supervisão, confiança, paciência, carinho e por compartilhar comigo seu amplo conhecimento.

Agradeço à minha amiga Dra. Marileide Moreira Costa por seu apoio neste trabalho e sua amizade.

Obrigado aos amigos da UFLA, do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, especialmente Arianna e Janaina.

Agradeço à minha amiga Yulimar Castro por seu apoio neste tempo.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Eu posso fazer tudo, através de Cristo, que me fortalece.

Filipenses 4:13

RESUMO GERAL

A murcha de *Fusarium* (FWB), também conhecida como Mal de Panamá, é a doença mais importante da bananeira na atualidade. Essa doença é causada por *Fusarium oxysporum* (Foc), fungo que se apresenta em três raças com base na suscetibilidade do hospedeiro. A raça 1 (Foc R1) causa doença em cultivares de banana como Gros Michel (Grupo AAA) e Maçã (Seda, AAB); raça 2 (Foc R2) afeta cultivares de banana como Bluggoe (grupo ABB), enquanto a raça 4 (Foc 4) afeta todas as cultivares, inclusive cultivares do tipo Cavendish (grupo AAA) resistentes a raça 1 e 2. O uso de cultivares resistentes é postulado como a única medida eficaz para controlar a doença. Este trabalho objetivou (i.) caracterizar isolados de Foc obtidos da rizosfera e raízes de cultivares diferentes por meio de análise de filogenia molecular e testes de patogenicidade em cultivares diferenciadoras; (ii.) realizar análise comparativa do microbioma bacteriano da rizósfera e endorizosfera de cultivares com diferentes níveis de resistência; (iii.) esclarecer se os perfis microbianos observados apresentam diferenças, que poderiam ser indicativas para a tolerância ou resistência à doença. Foram realizados isolamentos de Foc na rizosfera e raízes das plantas, obtendo nove isolados do morfo-tipo *Fusarium oxysporum*, que foram submetidos à análise filogenética molecular utilizando a região gênica *EF-1a*. Foram identificadas duas espécies filogenéticas, *Fusarium callistephi* e *F. triseptatum*. As cultivares Grande Naine e Maçã tradicional, respectivamente resistente e suscetível a Foc, foram inoculadas. Isolados representantes das duas espécies induziram sintomas na cultivar maçã, representando, portanto, raça 1. Para análise do microbioma, DNA metagenômico foi obtido das amostras da endosfera, rizosfera e *bulk soil*, de 4 cultivares com diferentes níveis de resistência a Foc, para amplificação da região 16S rDNA. Foram geradas em média 12.000 unidades taxonômicas operacionais (OUT's). Os principais grupos identificados foram Proteobacteria (50.4%), Actinobacteria (20.3%), e Firmicutes (7.9%). As cultivares abrigam comunidades distintas em cada nicho, evidenciando comunidades microbianas diferenciadoras. Na rizosfera, os generos *Burkholderia* e *Klebsiella* predominaram, enquanto na endosfera foram encontrados os gêneros *Mucilaginibacter*, *Sphingomonas*, *Fluviicola*, *Variovorax*, *Niastella* e *Ralstonia*. O estudo sustenta a hipótese que o microbioma pode representar uma fonte suplementar de defesa da planta. Embora obtidos de uma coleção restrita, os resultados possibilitaram identificar duas espécies filogenéticas e possíveis agentes de controle biológico. Este resultado contribui ao conhecimento sobre a diversidade de Foc no Brasil e no desenvolvimento de ferramentas de diagnoses e controle.

Palavras-chave: *Musa* sp.. Mal do Panamá. Bactéria. Diagnose. Manejo de doença de planta.

GENERAL ABSTRACT

Fusarium wilt (FWB), also known as Panama Disease, is the most important disease of banana. This disease is caused by *Fusarium oxysporum* (Foc), a fungus that occurs in three races based on host susceptibility. Race 1 (Foc R1) causes disease in banana cultivars such as Gros Michel (Group AAA) and Maçã (Seda, AAB); Race 2 (Foc R2) affects banana cultivars such as Bluggoe (ABB group), while race 4 (Foc 4) affects all cultivars, including Cavendish-type cultivars (AAA group), resistant to race 1 and 2. The use of resistant cultivars is considered as the only effective measure to control the disease. The aims of this study were (i.) to characterize Foc isolates obtained from the rhizosphere and roots of different cultivars by means of molecular phylogeny analysis and pathogenicity tests in differentiating cultivars; (ii.) to perform a comparative analysis of the bacterial microbiome of the rhizosphere and endorhizosphere of cultivars with different levels of resistance; (iii.) to clarify whether the observed microbial profiles present differences, which could be indicative of tolerance or resistance to the disease. Isolations of Foc were carried out in the rhizosphere and roots of the plants, obtaining nine isolates of the *Fusarium oxysporum* morphotype, which were submitted to molecular phylogenetic analysis using the EF-1 α gene region. Two phylogenetic species, *Fusarium callistephi* and *F. triseptatum*, were identified. Representative isolates of both species induced symptoms when inoculated in the cultivars Grande Naine and traditional Maçã, resistant and susceptible respectively, thus representing race 1. For microbiome analysis, metagenomic DNA was obtained from the endosphere, rhizosphere and bulk soil samples of 4 cultivars with different levels of resistance to Foc, for amplification of the 16S rDNA region. An average of 12,000 operational taxonomic units (OTU's) were generated. The main groups identified were *Proteobacteria* (50.4%), *Actinobacteria* (20.3%), and *Firmicutes* (7.9%). Cultivars harbor distinct communities in each niche, showing differentiated microbial communities. In the rhizosphere, the genera *Burkholderia* and *Klebsiella* predominated, while in the endosphere the genera *Mucilaginibacter*, *Sphingomonas*, *Fluviicola*, *Variovorax*, *Niastella* and *Ralstonia* were found. This study supports the hypothesis that the microbiome may represent a supplementary source of plant defense mechanisms. Although obtained from a restricted collection, the results made it possible to identify two phylogenetic species and possible biological control agents. This result contributes to knowledge about Foc diversity in Brazil and to the development of diagnostic and control tools.

Key Words: *Musa* sp.. Panama Disease. Bacteria. Diagnosis. Plant disease management.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 A cultura da bananeira	13
2.2 O Complexo de espécies de <i>Fusarium oxysporum</i> - FOSC	13
2.3 Murcha de <i>Fusarium</i> ou Mal do Panamá	15
2.4 Microbioma benéfico associado a plantas	17
2.5 Microbioma da bananeira	18
2.6 Bactérias da rizosfera	18
REFERÊNCIAS	21

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1	25
Murcha da bananeira causada por <i>Fusarium</i> no Brasil: sobre espécies filogenéticas e raças	

RESUMO	27
ABSTRACT	28
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Amostragem e isolamento do fungo	30
2.2 Obtenção e preservação de isolados	30
2.3 Sequenciamento e análises filogenéticas	31
2.4 Análise de primer específico para a raça TR4	32
2.5 Caracterização morfológica	32
2.6 Teste de patogenicidade em cultivares diferenciadoras	33
3. RESULTADOS	34
3.1 Identificação das espécies por análise filogenética	34
3.2 Caracterização morfológica	34
3.3 Análise de <i>primer</i> específico	34
3.4 Teste de patogenicidade em cultivares diferenciadoras	35
4. DISCUSSÃO	35
5. AGRADECIMENTOS	37
REFERÊNCIAS	38
7. ANEXOS	41

ARTIGO 2	55
Comparative study of the bacterial microbiome associated with four banana cultivars with distinct levels of resistance to <i>Fusarium</i> wilt	
ABSTRACT	57
1. INTRODUCTION	58
2. MATERIAL AND METHODS	59
2.1 Sampling and processing of plants and soil	59
2.2 DNA extraction and 16S RNA sequencing	60
2.3 Bioinformatics analyses	60
3. RESULTS	61
4. DISCUSSION	63
5. ACKNOWLEDGEMENTS	66
REFERENCES	67
7. ANEXOS	73

1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente a principal doença da bananeira é a murcha de *Fusarium* (FWB), também conhecida como mal de Panamá, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Esse fungo compreende três raças com base na suscetibilidade do hospedeiro. A raça 1 (R1) causa doença em cultivares de banana de sobremesa, como Gros Michel (*Musa* spp, Grupo AAA) e Maçã (Seda, AAB); raça 2 (R2) afeta cultivares de banana para cozimento como Bluggoe (*Musa* spp., Grupo ABB), e raça 4 (R4) afeta cultivares de banana Cavendish (*Musa* spp., Grupo AAA) e cultivares de banana suscetíveis a R1 e R2. O controle químico não é viável e pouco eficaz, mas o controle biológico em estágios iniciais mostrou resultados promissores. O uso de cultivares resistentes é postulado como a única medida eficaz para controlar a doença.

O primeiro Capítulo foi preparado para submissão à revista Journal of Phytopathology, com o título “Murcha da bananeira causada por *Fusarium* no Brasil: sobre espécies filogenéticas e raças”. Foi realizada a identificação das espécies filogenéticas e raças fisiológicas em uma coleção de 13 isolados de Foc obtidos de raiz e pseudocaule de plantas de banana com sintomas de fusariose. Foram realizadas análises filogenéticas da região gênica *EF-1 α* e teste de patogenicidade utilizando cultivares de banana diferenciadoras. Como resultado foram identificadas duas espécies filogenéticas, *Fusarium callistephi* e *F. trisseptatum*. Nos testes de patogenicidade, todos os isolados induziram sintomas de murcha na cultivar de banana Maçã e representam, portanto, a raça 1. Podemos inferir que as espécies filogenéticas que representam *Foc* não tem correlação direta com as raças fisiológicas, podendo uma raça fisiológica ser representada por diferentes espécies filogenéticas, ou isolados de uma mesma espécie filogenética representar diferentes raças.

O segundo Capítulo foi preparado como manuscrito para uma revista científica especializada e tem o título “Comparative study of the bacterial microbiome associated with four banana cultivars with distinct levels of resistance to *Fusarium* wilt”. Amostras coletadas DA endorizosfera, rizosfera e *bulk soil*, representando diferentes nichos, numa área com ocorrência da FWB em Aguaí SP foram submetidas à extração de DNA metagenômico e a amplificação da região 16S de bactérias. A análise gerou em média 12.954 unidades taxonômicas operacionais (OTU's) por amostra. As sequências mais abundantes foram Proteobacteria (50,4% de todas as sequências), Actinobacteria (20,3%), Firmicutes (7,9%) e Bacteroidetes (7,2%). O índice de Shannon mostrou que a cultivar Princesa apresentou comunidades diferenciadas em cada nicho em relação aos cultivares W, Maçã e Prata. Em análises de correspondência sem tendência (DCA), todas as cultivares mostraram

comunidades bacterianas diferenciadas, mas a cultivar suscetível W teve comunidades similares entre os nichos. Com a análise LEfSe e Random Forest foi possível identificar os grupos taxonômicos mais representativos para cada nicho e cultivar. Considerando os resultados e a literatura, se evidenciou o efeito da rizosfera ao recrutar comunidades microbianas diferenciais, que possivelmente contribuem na resposta de defesa da planta.

Uma outra abordagem ainda em andamento, consiste na identificação de possíveis agentes de controle biológico em uma coleção de 84 bactérias isoladas a partir de plantas de bananeira com diferentes níveis de resistência à murcha de *Fusarium*. Até o momento estão sendo realizadas as análises de filogenia molecular para identificação das espécies desta coleção, e posteriormente análises *in vitro* e *in vivo* para determinar sua importância sobre a resposta da planta ao desenvolvimento da murcha de *Fusarium*.

A identificação das espécies filogenéticas do FOOSC, que causam doença na bananeira, permitirá reavaliar os conceitos de *forma specialis* e raça. Em consequência, vai direcionar de forma assertiva a seleção de cultivares resistentes e o desenvolvimento de ferramentas para diagnose. Adicionalmente, será possível identificar bactérias benéficas e determinar sua importância sobre o desenvolvimento da murcha de *Fusarium*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da bananeira

A banana (*Musa* spp.) é a fruta mais comercializada no mundo, e é considerada a sexta cultura alimentar, mas importante (Drenth et al., 2021). O volume de produção e comércio tem aumentado nos últimos anos, sua produção é realizada principalmente de forma informal por pequenos agricultores, neste sentido não é possível obter números precisos sobre sua produção mundial. No entanto, as estimativas oficiais indicam que a produção mundial média passou de 69 milhões de toneladas em 2000-2002, para 116 milhões de toneladas em 2017-2019, num valor aproximado de 31.000 milhões de dólares. (FAO, 2020). Os cinco principais países produtores de banana são: Índia com 30.982.000 toneladas, China com 11.584.35

0 toneladas, Indonésia com 7.731.707, Brasil com 6.734.591 toneladas e Equador com 6.303.433 (FOASTAT, 2022). Os principais estados produtores de banana no Brasil são: São Paulo, Bahia, Minas Gerais, Santa Catarina e Pernambuco (EMBRAPA, 2020). Já as variedades mais difundidas no Brasil são: Prata, Pacovan, Prata Ana, Maçã, Terra D'Angola, do grupo AAB, utilizada apenas para o mercado nacional, Nanica, Nanicão, Grande Naine, do grupo AAA, utilizada principalmente para exportação (Borges, 2004). A murcha de *Fusarium* da banana, também conhecida como doença do Panamá, é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) é a doença mais importante da banana no Brasil e no mundo. Esta doença foi descoberta pela primeira vez em 1874 em plantações de banana na Austrália. No Brasil teve seu primeiro registro em 1930 na cidade de Piracicaba, no estado de São Paulo e hoje está presente em todas as regiões produtoras (Dias et al., 2014; Dita et al., 2018; Pegg et al., 2019).

2.2 O Complexo de espécies de *Fusarium oxysporum* - FOSC

Antes de 2012, fungos como *Fusarium* recebiam nomes diferentes tanto para o estado sexual (perfeito ou teleomórfico) quanto para o estado assexuado (imperfeito ou anamórfico), de seus ciclos de vida. A implementação do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (ICN), surgido do Congresso Botânico Internacional de Melbourne em 2011, estipulou que apenas um nome científico deveria ser usado para uma espécie de fungo, resultando na abolição da nomenclatura dual para fungos pleomórficos como *Fusarium*. (Barrie et al., 2012), mas foi proposto manter o nome *Fusarium* porque está bem integrado na literatura científica e é o quarto nome de fungo mais publicado. Esta proposta foi apoiada por uma grande parte dos cientistas que trabalham ativamente com *Fusarium* (Geiser,

et al., 2013). *Fusarium oxysporum* é um complexo de espécies (FOOSC) que inclui cepas fitopatogênicas e não patogênicas morfológicamente indistinguíveis, exibindo uma estrutura filogenética complicada, indicativa de várias espécies crípticas, comumente encontradas em solos cultivados e não cultivados em todo o mundo sob vários climas. Também ocupa o quinto lugar em uma lista dos 10 principais patógenos fúngicos de acordo com sua importância científica e econômica (Dean et al., 2012; Gordon, 1997).

Historicamente, o FOOSC tem sido definido pelo fenótipo assexuado, pois ainda não foi descoberta nenhuma morfologia sexual, razão pela qual é considerado um fungo anamórfico, embora vários estudos tenham indicado a possível presença de um ciclo sexual críptico (Edel-Hermann & Lecomte, 2019; Gordon, 2017; Yun et al., 2000). Esse patógeno possui uma ampla gama de hospedeiros com uma especificidade estreita, o que levou ao conceito de formas especiais. Cada forma especial agrupa as cepas com o mesmo intervalo de hospedeiros e até agora 150 formas especiais foram documentadas (Edel-Hermann & Lecomte, 2019; Jangir et al., 2021). Do mesmo jeito, algumas formas especiais são subdivididas em raças definidas pela especialização no nível de cultivar e, em alguns casos, por genes de resistência conhecidos nessas cultivares. (Czislowski et al., 2018; Gordon, 1997)

Recentemente, foi demonstrado que alguns genes chamados *SIX* (secretado em Xilema), presentes em cromossomos de patogenicidade móvel, estão envolvidos na definição da variação na especificidade do hospedeiro entre formas especiais. Esses genes *SIX* codificam pequenas proteínas efetoras no xilema, que contribuem para sua virulência. A maioria dessas proteínas contém resíduos de cisteína em números pares, 14 proteínas foram relatadas até agora (Jangir et al., 2021).

Por outro lado, para os membros do FOOSC que carecem de estágios sexuais em seu ciclo de vida, a transferência horizontal de genes (HGT) pode contribuir para a diversidade genética observada dentro do complexo; e, novas raças dentro de uma forma especial podem surgir como resultado de mutações em genes associados à patogenicidade. Devido à evolução de novos patógenos, as estratégias de manejo da murcha de *Fusarium* não têm sido muito bem-sucedidas. Por esse motivo, um conhecimento profundo da base molecular da virulência em *Fusarium oxysporum* é de suma importância, pois irá impulsionar o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle da doença. (Jangir et al., 2021).

Em relação às características morfológicas, as colônias crescem de 4 a 7 mm por dia em PDA a 24 °C, com abundante micélio aéreo branco a púrpura. Sporodochia é de cor marrom a laranja. Apresenta macro e microconídios como fonte de inóculo, os quais são produzidos em monofíalides ramificados e não ramificados. Os microconídios têm 5 a 16 x

2,4 a 3,5 um, uma a duas células, de formato oval a renal e nascem em cabeças falsas. Os macroconídios têm 27 a 55 x 3,3 a 5,5 um, quatro a oito células em forma de foice com células basais em forma de pé. Os clamidósporos terminais e intercalados têm diâmetros de 7 a 11 um, são geralmente globosos e se formam isoladamente ou em pares em hifas ou conídios. (Leslie & Summerell, 2006; Ploetz, 2006a).

As espécies patogênicas de *Fusarium oxysporum* são responsáveis por dois tipos de sintomas, sendo o mais comum o murchamento vascular e, em alguns casos, o apodrecimento. *F. oxysporum*, que causa murcha vascular, penetra nas raízes do hospedeiro para atingir os vasos do xilema, que coloniza para cima, resultando em amarelecimento e murcha progressivos da planta (Olivain & Alabouvette, 1999).

2.3 Murcha de *Fusarium* ou Mal do Panamá

A cultura da bananeira é atualmente ameaçada pela doença conhecida como Murcha de *Fusarium* ou Mal do Panamá, cujo agente etiológico é o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) considerado um dos principais fatores bióticos que afetam esta cultura (Pegg et al., 2019; Dita et al., 2018; Ploetz, 2006a). A epidemia de murcha de *Fusarium* causada pela raça 1 (R1), ocorrida em meados do século 20, na América Central, causou a devastação das plantações das cultivares suscetíveis Gros Michel e foi uma das mais graves da história do cultivo nas Américas. Por esta razão, Gros Michel teve que ser substituído por cultivares do subgrupo Cavendish que são resistentes ao Foc R1. (Ploetz, 2006b, 2015). No entanto, no final da década de 1980, uma cepa altamente virulenta de cultivares Cavendish infectadas com Foc se espalhou para a Ásia, África, Indonésia e, mais recentemente, América do Sul na Colômbia e no Peru (Acuña et al., 2021; Garcia Bastidas et al., 2020; Ploetz et al., 2015).

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* é um fungo de solo, inicialmente se estabelece em uma relação biotrófica que interage com as células vegetais vivas do hospedeiro e, posteriormente, em sua fase necrotrófica, nos tecidos mortos. (Dita et al., 2018). Frequentemente, o Foc persiste em áreas cultivadas por anos devido à sua fase de sobrevivência, onde interage como saprófita em vestígios culturais, produz estruturas conhecidas como clamidósporos, além de sobreviver e se multiplicar em hospedeiros alternativos (Dita et al., 2018; Pegg et al., 2019). Foc invade os tecidos do xilema das raízes e se espalha pelo sistema vascular dos pseudocauls, porém, é difícil controlar o processo de infecção e os primeiros sintomas, pois a descoloração e murcha das folhas aparecem várias semanas ou vários meses após a infecção. (Li et al., 2013).

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense*, compreende quatro raças com base na suscetibilidade do hospedeiro. Três raças causam a doença da banana. Raça 1 (Foc R1) causa doença em cultivares de banana de sobremesa, como Gros Michel (*Musa* spp., Grupo AAA) e Maçã / Latundan (Seda, AAB), raça 2 (Foc R2) afeta cultivares de banana para cozinhar, como Bluggoe (*Musa* spp. Grupo ABB) e raça 4 (Foc R4) afetam cultivares de banana Cavendish (*Musa* spp., Grupo AAA) e cultivares de banana suscetíveis a Foc R1 e Foc R2 (Ploetz, 2006b).

Em relação ao controle de Foc, o controle químico não é viável e minimamente eficaz e com relação ao controle biológico em estágios iniciais tem mostrado resultados promissores, porém a baixa eficiência do controle biológico e cultural em estágios mais avançados é atribuída a fatores inerentes à dinâmica do inóculo primário, principalmente devido à produção de clamidosporos, que persistem por muito tempo no campo, além de seu estágio de sobrevivência como saprofítico em restos culturais e como endofítico em hospedeiros alternativos. (Arinaitwe et al., 2019; Rocha et al., 2021). Por outro lado, a produção perene da cultura da banana e o caráter policíclico da doença impedem o desenvolvimento de estratégias de manejo eficientes. (García-Velasco et al., 2021).

O uso de cultivares resistentes é frequentemente considerado como a única medida eficaz para controlar a doença. (Ploetz et al., 2015), entretanto, cultivares resistentes podem não atender às demandas do mercado e a resistência pode ser superada por novas cepas do patógeno, como Cavendish e Foc R4. (Dita et al., 2018). Outra medida de controle é a adoção de estratégias de quarentena. No entanto, essas práticas são aplicadas principalmente em grandes plantações comerciais, mas não em ambientes de pequenos agricultores. O desenvolvimento de novas cultivares de banana resistentes seria a estratégia de controle mais eficaz a seguir, portanto, a pesquisa sobre a diversidade desse patógeno é essencial, especialmente porque ele se mostrou polifilético (O'Donnell et al., 1998).

Nesse sentido, e conforme mencionado acima, o FOOSC apresenta formas especiais, nas quais seus hospedeiros costumam estar intimamente relacionados, assumindo da mesma forma que os membros das formas especiais também podem ser intimamente relacionados e ter surgido de um ancestral comum (Martin & Inglês, 1997). No entanto, essas suposições foram questionadas, uma vez que estudos demonstraram relações polifiléticas dentro de várias formas especiais de *F. oxysporum* (Koenig et al., 1997; O'Donnell, 1998). Mostrando assim, que várias formas especiais de *F. oxysporum* podem infetar e causar doença em mais de uma planta às vezes não relacionadas, entanto outra podem estar altamente especializadas em uma planta específica anfitrião (Fourie et al., 2011).

2.4 Microbioma benéfico associado a plantas

As plantas, como outros eucariotos, formam interações próximas com microrganismos que são essenciais para o desempenho e a sobrevivência do hospedeiro. A coevolução resultou em relações íntimas entre planta e microrganismos que criam microbiomas específicos e estáveis. (Guttman et al., 2014). Na natureza, as plantas e as comunidades que as habitam podem ser consideradas coletivamente como meta-organismos ou holobiontes que interagem em uma associação do hospedeiro macroscópico e um microbioma diverso consistindo de bactérias, arqueias, fungos e protistas, dentro dos quais os microrganismos geralmente superam o número das células vegetais (Berg et al., 2016).

Tanto as raízes quanto a fina camada de solo aderida às raízes, chamada de rizosfera, abrigam diversas comunidades microbianas. (Kaushal et al., 2020), e foi demonstrado que a microbiota rizosférica e endofítica (no interior da raiz) melhora significativamente a saúde e o desenvolvimento das plantas (Mendes et al., 2011). Nesse sentido, muitos estudos nas últimas décadas têm mostrado que as interações planta-microbioma são fundamentais para o entendimento do crescimento e da saúde das plantas, mas também para a produção sustentável de culturas. (Berg et al., 2016). Assim, para o início da Resistência sistêmica induzida (ISR), são necessários microrganismos benéficos que colonizem de forma eficiente o sistema radicular das plantas hospedeiras (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Para o estabelecimento de uma associação mutualística bem-sucedida, as plantas e microrganismos hospedeiros devem responder a sinais recíprocos que fornecem benefícios mútuos, como as simbioses de micorrizas e rizóbios, estrigolactonas e flavonóides secretados pelo hospedeiro estimulam a produção de fatores simbióticos Sym e Nod por microrganismos, ativando uma via de sinalização simbiótica comum (Sym) nas raízes das plantas, necessária para o estabelecimento de uma relação simbiótica de sucesso (Oldroyd et al., 2009).

Quanto à forma como as rizobactérias não simbióticas estabelecem uma interação mutualística prolongada com as raízes das plantas, ainda não está bem caracterizada, mas infere-se que um “diálogo molecular” também é essencial para essas interações mutualísticas (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Assim, muitas rizobactérias de vida livre respondem ativamente aos exsudatos radiculares, ajustando seu programa de transcrição para genes envolvidos na quimiotaxia, colonização radicular e formação de biofilme (Mark et al., 2005).

Nesse sentido e de acordo com os estudos mais recentes, as plantas têm a capacidade de modular a composição de sua microbiota radicular, recrutando certos grupos específicos ou espécies bacterianas por meio de compostos que estimulam ou reprimem seletivamente o

crescimento microbiano (Berendsen et al., 2012). As plantas com seus sistemas de raízes fornecem nichos ecológicos únicos para a microbiota do solo que coloniza a rizosfera, as raízes e, em certa medida, as partes acima do solo (Hartmann et al., 2009).

2.5 Microbioma da bananeira

Existem estudos nos quais microorganismos benéficos foram investigados na rizosfera da banana para determinar os possíveis benefícios (Dita et al., 2018). Assim, estudos de solos supressivos para Foc em bananeira na China, encontrou índices de riqueza e diversidade mais elevados em solos supressivos com comunidades bacterianas únicas, que diferiam daqueles solos propícios à doença (Shen et al., 2015). Do mesmo modo, foi demonstrado que *Bacillus* era o grupo mais abundante em solos supressores de doenças na rizosfera da bananeira, e que o estado de saúde das plantas estava correlacionado com a composição da comunidade microbiana do solo (Xue et al., 2015).

Por outro lado, foram realizadas análises comparativas do microbioma do solo rizosférico de plantas de bananeira saudáveis e doentes com murcha de *Fusarium*, concluindo que existe uma distribuição única de bactérias e fungos e que esses gêneros específicos podem contribuir para a formação de uma estrutura comunitária microbiana benéfica para a saúde do solo. (Zhou et al., 2019). Da mesma forma, avaliaram a diversidade, estrutura e montagem de comunidades bacterianas e fúngicas associadas a três regiões (rizosfera, raiz e rizoma) de bananeiras com e sem sintomas da murcha de *Fusarium*, revelando que a planta da banana abriga ricas e diversas comunidades bacterianas e fúngicas que mudam em relação a rizosfera, à raiz e ao rizoma. Mostrando que os diferentes componentes afetam as comunidades bacterianas (Kaushal et al., 2020).

Estudos mostraram que a microbiota endofítica diferiu entre as bananeiras e seus brotos, sugerindo que o estágio fenológico determina o recrutamento e a organização do microbioma endofítico. (Gómez-Lama et al., 2021). Em estudos mais recentes, foi observado uma maior abundância de *Sphingomonas* em solos doentes, em quanto que Acidobacteriaceae, *Burkholderia*, *Actinospica*, *Bradyrhizobium elkani* e *Conexibacter* foram enriquecidas nos solos saudáveis, especialmente *Burkholderia* e *Streptomyces* se encontravam-se entre os gêneros mais abundantes na rizosfera de solos saudáveis (Jamil et al., 2022).

2.6 Bactérias da rizosfera

A área do solo que circunda o sistema radicular das plantas, conhecida como rizosfera, representa um ponto quente para a atividade microbiana do solo (de la Fuente Cantó et al.,

2020). A rizosfera é colonizada por uma ampla gama de táxons microbianos, dos quais bactérias e fungos constituem os grupos mais abundantes que exibem funções ecológicas fundamentais (Kalam et al., 2017). A concentração de bactérias na rizosfera é aproximadamente 10 a 1000 vezes maior do que no solo a granel, que é aquele que circunda as raízes. As bactérias do solo, que prosperam na rizosfera, colonizam as raízes das plantas e facilitam seu crescimento, são conhecidas como PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria), um termo introduzido por Kloeppe e Schroth em 1978. Para manter seu efeito benéfico no ambiente radicular, as bactérias devem competir bem com outros organismos na rizosfera em busca de nutrientes segregados pela raiz (Dutta & Podile, 2010).

PGPR é conhecido por influenciar positivamente a saúde geral das plantas, contribuindo para uma maior aquisição de nutrientes pelas plantas hospedeiras, proteção contra fitopatógenos e promovendo resistência a vários tipos de estresse (Backer et al., 2018). Os modos de ação pelos quais PGPR promovem o crescimento da planta foram classificados em mecanismos diretos e indiretos que ocorrem dentro e fora da planta, respectivamente (Goswami et al., 2016). Os modos diretos de ação incluem a melhoria da nutrição da planta, fornecendo nutrientes como nitrogênio ou minerais solubilizados do solo, como P, K, Zn, Fe, entre outros, e / ou estimulando o crescimento e o desenvolvimento da planta por meio da regulação dos níveis de fitohormônios, como auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (Gouda et al., 2018).

Os efeitos indiretos do PGPR consistem na supressão de fitopatógenos e outros microrganismos prejudiciais por meio de parasitismo, competição por nutrientes e nichos dentro da rizosfera, produzindo substâncias antagônicas (cianeto de hidrogênio, sideróforos antibióticos e metabólitos antimicrobianos) e enzimas líticas (quinases, glucanases e proteases) e induzir resistência sistêmica em plantas contra um amplo espectro de patógenos foliares e radiculares (Meena et al., 2020). O modo de ação varia de acordo com o tipo de planta hospedeira, podendo também ser influenciado por uma série de fatores bióticos (genótipo, estágio de desenvolvimento, mecanismos de defesa da planta e de outros membros da comunidade microbiana) e fatores abióticos (composição de o solo, e as condições climáticas) (Vacheron et al., 2013).

Por outro lado, a rizosfera é diretamente influenciada pelos exsudados das raízes das plantas (Hartmann et al., 2008). Esses exsudatos incluem uma variedade de ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares e outras pequenas moléculas que atuam como fortes quimo atraentes para a microbiota do solo. Assim, dependendo da espécie vegetal, ou mesmo da variedade, as raízes podem produzir distintos exsudatos, que atraem uma diversidade microbiana particular

(Olanrewaju et al., 2019) e a microbiota do solo pode detectar estes sinais químicas particulares que permitem uma colonização eficientemente da rizosfera e raízes de plantas específicas, um exemplo bem conhecido é o de rizóbios e leguminosas. (Raklami et al., 2019). Assim, a rizosfera de uma planta é uma área onde há uma alta pressão seletiva para atrair certas comunidades microbianas da massa do solo (Dawson et al., 2017).

No entanto, a planta não apenas exala compostos que atraem um microbioma específico, mas também existem mecanismos presentes nas PGPRs que lhes permitem reconhecer as moléculas da planta, adquirir nutrientes, ocupar espaços e inibir direta ou indiretamente outras espécies microbianas para sobreviver e colonizar a planta rizosfera. Alguns mecanismos exibidos por PGPR para colonizar a rizosfera incluem o reconhecimento de sinais químicas e nutrientes de exsudados de raízes, atividades antioxidantes, produção de bio-películas, motilidade bacteriana, assim como evasão e supressão eficiente do sistema imunológico da planta (Santoyo et al., 2021).

Por outro lado, a aquisição e solubilização de nutrientes é um mecanismo que, além de beneficiar a planta, beneficia os microrganismos que os executam, pois estes devem ser adquiridos pelo PGPR para proliferar, competir e colonizar espaços na raiz por este motivo, algumas espécies, incluindo Proteobacteria (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*), Firmicutes (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Neobacillus*) e Actinobacteria (*Arthrobacter*, *Actinomyces*, *Micrococcus* e *Streptomyces*) estão entre os habitantes mais comuns da rizosfera (Berendsen et al., 2012). Portanto, uma característica desses grupos bacterianos é a capacidade de adquirir e utilizar esses nutrientes por meio de diversos mecanismos, como produção de sideróforos para aquisição de ferro, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio (Santoyo et al., 2021).

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, R. *et al.* **First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4, causing Fusarium wilt in Cavendish bananas in Peru.** Plant disease, 2021.
- ARINAITWE, I. K. *et al.* **Evaluation of banana germplasm and genetic analysis of an F1 population for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1.** Euphytica, v. 215, n 10, p. 1-11, 2019.
- BACKER, R. *et al.* **Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture.** Frontiers in plant science, v. 9, n. 1473, 2018.
- BARRIE, F. R. *et al.* **International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants.** Melbourne Code, v. 154, p. 240, 2012. In: J. McNeill (Ed.). Königstein: Koeltz Scientific Books. 2021.
- BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. **The rhizosphere microbiome and plant health.** Trends Plant Sci, v. 17, p. 478-486, 2012.
- BERG, G.; RYBAKOVA, D.; GRUBE, M.; KÖBERL, M. **The plant microbiome explored: implications for experimental botany.** Journal of experimental botany, v. 67, n. 4, 995-1002, 2016.
- BORGES, A. L. **O cultivo da bananeira,** p. 132-145, 2004. In: L. da Silva Souza (Ed.). Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. Plant disease, v. 104, n.3, 994-994.
- CZISLOWSKI, E. *et al.* **Investigation of the diversity of effector genes in the banana pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, reveals evidence of horizontal gene transfer.** Molecular plant pathology, v. 19, n. 5, p. 1155-1171, 2018.
- DAWSON, W. *et al.* **A small number of low-abundance bacteria dominate plant species-specific responses during rhizosphere colonization.** Frontiers in microbiology, v. 8, n. 975, 2017.
- DEAN, R. *et al.* **The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology.** Molecular plant pathology, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.
- DE LA FUENTE CANTÓ, C. *et al.* **An extended root phenotype: the rhizosphere, its formation and impacts on plant fitness.** The Plant Journal, v. 103, n. 3, p. 951-964, 2020.
- DIAS, J.; DE ABREU, M. S.; DE RESENDE, M. L. V. **Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc) quanto à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade em cultivares de bananeira diferenciadoras de raça no Brasil.** Embrapa Amapá-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2014.
- DITA, M. *et al.* ***Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management.** Frontiers in plant science, v. 9, p. 1468, 2018.
- DRENTH, A.; KEMA, G. **La vulnerabilidad de los bananos a las amenazas de enfermedades emergentes a nivel mundial.** Fitopatología , PHYTO-07, 2021.
- DUTTA, S.; PODILE, A. R. **Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone.** Critical reviews in microbiology, v.36, n. 3, p. 232-244, 2010.
- EDEL-HERMANN, V.; LECOMTE, C. **Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races.** Phytopathology, v. 109, n. 4, p. 512-530, 2019.

EMBRAPA. **Produção brasileira de banana**, 2019 Disponível em <[http://www.cnpmf.embrapa.br/Base de Dados/index_pdf/dados/brasil/banana/b1_banana.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/banana/b1_banana.pdf)> Acesso em: dez. 2022.

FAO. **Análisis del mercado del banano Panorama general**, 2020. Disponível em <<https://www.fao.org/3/ca9212es/ca9212es.pdf>>. Acesso em: dez. 2022.

FAOSTAT. **Food and Agriculture organization of the United Nations. Crops**. 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: mar. 2022

FOURIE, G. *et al.* **Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis cubense within the *Fusarium oxysporum* complex**. Infection, Genetics and Evolution, v.11, n. 3, p. 533-542, 2011.

GARCÍA-BASTIDAS, F. A. *et al.* **First report of *Fusarium* wilt Tropical Race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia**. Plant disease, v. 104, n. 3, p. 994-994, 2020.

GARCÍA-VELASCO, R. *et al.* **Genetic improvement for resistance to *Fusarium* wilt in banana**. Revista mexicana de fitopatología, v. 39, n. 1, p.122-146, 2021.

GEISER, D. M. *et al.* **One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use**. Phytopathology, v. 103, n. 5, p. 400-408, 2013.

GÓMEZ-LAMA CABANÁS, C. *et al.* **The banana root endophytome: Differences between mother plants and suckers and evaluation of selected bacteria to control *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense**. Journal of Fungi, v. 7, n. 3, p. 194, 2021.

GORDON, T. R. ***Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome**. Annual Review of Phytopathology, v. 55, p. 23-39, 2017.

GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. **The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum***. Annual Review of Phytopathology, v. 35, n. 1, p. 111-128, 1997.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. **Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review**. Cogent Food & Agriculture, v. 2, n.1, 2016.

GOUDA, S. *et al.* **Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture**. Microbiological research, v. 206, p. 131-140, 2018.

GUTTMAN, D. S.; MCHARDY, A. C.; SCHULZE-LEFERT, P. **Microbial genome-enabled insights into plant–microorganism interactions**. Nature Reviews Genetics, v. 15, n. 12, p. 797-813, 2014.

HARTMANN, A. *et al.* **Plant-driven selection of microbes**. Plant and Soil, v. 321, n. 1, p. 235-257, 2009.

JAMIL, F. N. *et al.* **Analysis of soil bacterial communities and physicochemical properties associated with *Fusarium* wilt disease of banana in Malaysia**. Scientific reports, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2022.

JANGIR, P. *et al.* **Secreted in Xylem genes: drivers of host adaptation in *Fusarium oxysporum***. Frontiers in plant science, v. 12, 2021.

- KALAM, S. *et al.* **Population densities of indigenous Acidobacteria change in the presence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in rhizosphere.** Journal of basic microbiology, v. 57, n. 5, p. 376-385, 2017.
- KAUSHAL, M.; MAHUKU, G.; SWENNEN, R. **Metagenomic insights of the root colonizing microbiome associated with symptomatic and non-symptomatic bananas in Fusarium wilt infected fields.** Plants, v. 9, n. 2, p. 263, 2020.
- KOENIG, R. L.; PLOETZ, R. C.; KISTLER, H. C. ***Fusarium oxysporum* f. sp. cubense consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages.** Phytopathology, v. 87, n. 9, p. 915-923, 1997.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual.** John Wiley & Sons, 2006.
- LI, C. *et al.* **Analysis of banana transcriptome and global gene expression profiles in banana roots in response to infection by race 1 and tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.** BMC Genomics, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2013.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. **Plant-growth-promoting rhizobacteria.** Annual review of microbiology, v. 63, p. 541-556, 2009.
- MARK, G. L. *et al.* **Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 102, n. 48, p. 17454-17459, 2005.
- MARTIN, F. N.; ENGLISH, J. T. **Population genetics of soilborne fungal plant pathogens: Introduction,** 1997.
- MEENA, M. *et al.* **PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives.** Journal of Basic Microbiology, v. 60, n. 10, p. 828-861, 2020.
- MENDES, R. *et al.* **Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria.** Science, v. 332, n. 6033, p. 1097-1100, 2011.
- O'DONNELL, K. *et al.* **Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.
- OLANREWAJU, O. S. *et al.* **Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions.** Applied microbiology and biotechnology, v. 103, n. 3, p. 1155-1166, 2019.
- OLDROYD, G. E.; HARRISON, M. J.; PASZKOWSKI, U. **Reprogramming plant cells for endosymbiosis.** Science, v. 324, n. 5928, p. 753-754, 2009.
- OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. **Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici in comparison with a non-pathogenic strain.** New Phytologist, v. 141, n. 3, p. 497-510. 1999.
- PEGG, K. G. *et al.* **The epidemiology of Fusarium wilt of banana.** Frontiers in plant science, v. 10, n. 1395, 2019.
- PLOETZ, R. C. **Panama disease: An old nemesis rears its ugly: Head part 1. The Cavendish era and beyond.** Plant Health Progress, v. 7, n. 1, p. 36, 2006a.

PLOETZ, R. C. **Panama disease: An old nemesis rears its ugly: Head part 2. The Cavendish era and beyond.** Plant Health Progress, v. 7, n. 1, p. 36, 2006b.

PLOETZ, R. C. ***Fusarium* wilt of banana.** Phytopathology, v. 105, n. 12, p. 1512-1521, 2015a.

PLOETZ, R. C. **Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4.** Crop Protection, v. 73, p. 7-15, 2015b.

RAKLAMI, A. *et al.* **Use of rhizobacteria and mycorrhizae consortium in the open field as a strategy for improving crop nutrition, productivity and soil fertility.** Frontiers in microbiology, v. 10, n. 1106, 2019.

ROCHA, A. D. J. D. J. *et al.* **Improvements in the resistance of the banana species to *Fusarium* wilt: a systematic review of methods and perspectives.** Journal of Fungi, v. 7, n. 4, p. 249, 2021.

SANTOYO, G. *et al.* **Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR).** Biology, v. 10, n. 6, p. 475, 2021.

SHEN, Z. *et al.* **Soils naturally suppressive to banana *Fusarium* wilt disease harbor unique bacterial communities.** Plant and Soil, v. 393, n. 1, p. 21-33, 2015.

VACHERON, J. *et al.* **Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning.** Frontiers in plant science, v. 4, p. 356, 2013.

XUE, C. *et al.* **Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease.** Scientific reports, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015.

YUN, S. H. *et al.* **Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella*/*Fusarium* species.** Fungal Genetics and Biology, v. 31, n. 1, p. 7-20, 2000.

ZHOU, D. *et al.* **Deciphering microbial diversity associated with *Fusarium* wilt-diseased and disease-free banana rhizosphere soil.** BMC microbiology, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2019.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Murcha da bananeira causada por *Fusarium* no Brasil: sobre espécies filogenéticas e raças

**Cristina Troya Mogollón¹, Marileide M. Costa^{1,2}, Janaina M. de Sousa¹, Arianna S. Menezes¹,
Joyce Doria Rodrigues³, Ludwig H. Pfenning¹**

¹ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, Brazil

² Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands.

³ Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, Brazil

Manuscrito preparado para submissão a revista Journal of Phytopathology.

<https://acamh.onlinelibrary.wiley.com/journal/26929384>

ORCIDs

Cristina M. Troya, 0009-0005-5028-0770

Marileide M. Costa, 0000-0002-9410-6601

Janaina M. de Sousa, 0000-0002-3841-9478

Arianna S. Menezes, 0000-0002-9267-0997

Joyce Doria Rodrigues, 0000-0002-7727-5016

Ludwig H. Pfenning, 0000-0001-6034-8285

Lista de Tabelas e Figuras

Tabelas

Tabela 1. Isolados do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* FOOSC utilizados nesse estudo

Tabela 2. Isolados de referência incluídos nas análises filogenéticas

Tabela 3. Escala de notas de sintomas foliares e de rizoma da murcha de *Fusarium* em bananeira em condições de casa de vegetação (Dita et al. 2014)

Tabela 4. Sintomas observados no rizoma e na parte aérea de plantas das cultivares Maçã e Grande Naine, inoculadas com Foc.

Figuras

Figura 1. Árvore filogenética de Máxima Parcimônia (MP) de sequências parciais do gene EF-1 α de isolados obtidos neste estudo, de isolados de referência do complexo de espécies *Fusarium oxysporum*, e de representantes das diferentes raças de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. CAV: Sequências

de isolados provenientes de Fourie et al. 2009. Valores de suporte dos ramos iguais ou superiores a 70% são mostrados junto aos nós. T identifica isolados ex-tipo.

Figura 2. Características morfológicas de *Fusarium callistephi*. **a.-f.** Cor da colônia sobre MA2%; **g.-h.** esporodóquio; **i.** clamidósporos; **j.** macroconídios formados em esporodóquio; **k.-m.** fiálides produzidas no micélio aéreo; **n.-o.** macro e microconídios; **p.-r.** macroconídios formados no micélio aéreo. Características morfológicas de *Fusarium triseptatum*. **s.-t.** cor da colônia sobre MA2%; **u.-v.** fiálides produzidas no micélio aéreo; **w.-x.** micro- e macroconídios.

Figura 3. Sintomas induzidos por *Fusarium callistephi* CML 3489. Cultivar Maçã: **a.-b.** Sintomas foliares; **c.** sintomas no rizoma; **d.-e.** planta testemunha sem sintomas. Cultivar Grande Naine: **f.-g.** Sintomas foliares; **h.** sintomas no rizoma; **i.-j.** planta testemunha sem sintomas. Sintomas induzidos por *Fusarium triseptatum* CML 3487. Cultivar Grande Naine: **k.** Sintomas foliares; **l.** Sintomas no rizoma; **m.** Sintomas no pseudocaule. Cultivar Maçã: **s.** Sintomas foliares; **o.** Sintomas no rizoma.

Figura 4. Sintomas no rizoma de plantas da cultivar Maçã tradicional, induzidos após inoculação com o patógeno; **a.** Controle negativo. *Fusarium callistephi*: **b.** CML 3489, **c.** CML 4316, **d.** CML 4317, **e.** CML 4318, **f.** CML 4319, **g.** CML 4320, **h.** CML 4321, **i.** CML 4322, **j.** CML 4323, **k.** CML 4324. *Fusarium triseptatum*: **l.** CML 3487, **m.** CML 3490.

Figura 5. Sintomas no rizoma de plantas da cultivar Grande Naine, induzidos após inoculação com o patógeno; **a.** Controle negativo. *Fusarium callistephi*: **b.** CML 3489, **c.** CML 4316, **d.** CML 4317, **e.** CML 4318, **f.** CML 4319, **g.** CML 4320, **h.** CML 4321, **i.** CML 4322, **j.** CML 4323, **k.** CML 4324. *Fusarium triseptatum*: **l.** CML 3487, **m.** CML 3490.

Material Suplementar

Figura Suplementar 1. Alinhamento da sequência forward (FocTR4-F) do *primer* específico para TR4 com sequências de isolados do *F. oxysporum* species complex

Figura Suplementar 2. Alinhamento da sequência forward (FocTR4-R) do *primer* específico para TR4 com sequências de isolados do *F. oxysporum* species complex

RESUMO

A murcha de *Fusarium* da bananeira (*Musa* spp.), ou mal do Panamá, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), é a doença mais destrutiva e mais disseminada nas regiões produtoras de banana. Foc é representado por diferentes raças fisiológicas, e espécies crípticas, cujas linhagens estão sendo descritas por meio de análises de filogenia molecular. O objetivo deste estudo foi identificar as espécies filogenéticas e raças fisiológicas em uma coleção de 13 isolados de Foc obtidos de raiz e pseudocaule de plantas de banana com sintomas de fusariose, e avaliar congruências e conflitos entre espécies filogenéticas propostas no FOOSC e as raças fisiológicas de Foc. Foram realizadas análises filogenéticas da região gênica *fator de alongação-1α* (*EF-1α*), teste de patogenicidade utilizando cultivares de banana diferenciadoras para as diferentes raças de Foc e análises *in silico* e PCR com *primer* específico para raça 4. Na análise filogenética, os 13 isolados de Foc agruparam com isolados de referência das espécies *F. callistephi* (n=11) e *F. triseptatum* (n=2). Nos testes de patogenicidade, todos os isolados induziram sintomas de murcha na cultivar de banana Maçã e representam, portanto, a raça 1. Os sintomas induzidos variaram de amarelamento das folhas, a murcha e necrose vascular. Dois isolados, representantes de cada uma das espécies identificadas induziram sintomas internos e folhares na cultivar de banana Grande Naine, diferenciadora para a raça subtropical 4, contudo outros ensaios são necessários para confirmar e explicar esse resultado. Podemos inferir que as espécies filogenéticas que representam *Foc* não tem correlação direta com as raças fisiológicas, podendo uma raça fisiológica ser representada por diferentes espécies filogenéticas, ou isolados de uma mesma espécie filogenética representar diferentes raças. Esse estudo contribui com a identificação das espécies filogenéticas do FOOSC, que causam doenças na bananeira, e permite reavaliar os conceitos de *forma specialis* e raça. Em consequência, vai direcionar de forma assertiva a seleção de cultivares resistentes e o desenvolvimento de ferramentas para diagnose.

Palavras-chave: *Musa* sp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Mal do Panamá. Manejo integrado. Murcha da bananeira.

ABSTRACT

Fusarium wilt of banana (*Musa* spp.), or Panama disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), is the most destructive and widespread disease in banana producing regions. Foc is represented by different physiological races, and cryptic species, whose lineages are being described by molecular phylogenetic analyses. The aim of this study was to identify the phylogenetic species and physiological races in a collection of 13 Foc isolates obtained from the root and pseudostem of banana plants with symptoms of fusariosis, and to evaluate congruences and conflicts between the phylogenetic species proposed in FOOSC and the physiological races of Foc. Isolates were characterized by phylogenetic analyses using sequences of the elongation factor-1 α (EF-1 α) gene region and pathogenicity tests using differentiating banana cultivars. *In silico* analyses and PCR with race-specific primer 4 also were performed. In the phylogenetic analyses, the 13 Foc isolates grouped with reference strains of *Fusarium callistephi* (n=11) and *F. triseptatum* (n=2). In the pathogenicity tests, all isolates induced wilt symptoms in the Maçã banana cultivar and therefore represent race 1. The induced symptoms ranged from yellowing of the leaves, to wilting and vascular necrosis. Two isolates, representatives of each of the identified species, induced internal and leaf symptoms in the Grande Naine banana cultivar, differentiating for the subtropical race 4, however other tests are needed to confirm and explain this result. It is possible to infer that the phylogenetic species that represent Foc have no direct correlation with the physiological races, and a physiological race may be represented by different phylogenetic species, or isolates of the same phylogenetic species may represent different races. This study contributes to the identification of the phylogenetic species of the FOOSC, which cause diseases in banana, and allows the reassessment of the concepts of *forma specialis* and race. Consequently, it will assertively guide the selection of resistant cultivars and the development of diagnostic tools.

Key Words: *Musa* sp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Panama disease. *Fusarium* wilt of banana.

1. INTRODUÇÃO

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (Foc) é um dos principais fatores bióticos que afetam o cultivo da banana, causando a murcha de *Fusarium*, ou mal do Panamá. Esta doença é considerada a mais destrutiva e mais disseminada nas regiões produtoras de banana em todo o mundo. Foc é um fungo de solo que persiste em áreas cultivadas por anos devido à sua fase de sobrevivência, onde interage como saprófita em restos vegetais ou sobrevive e se multiplica em hospedeiros alternativos (Dita et al. 2018; Pegg et al. 2019). Os sintomas típicos desta doença são murcha, amarelamento das folhas, divisão do pseudocaule, e necrose vascular (Magdama et al. 2020). Com base na suscetibilidade do hospedeiro foram estabelecidas três raças, a raça 1 (R1) causa doença em cultivares de banana de sobremesa, como Gros Michel (*Musa* spp., Grupo AAA) e Maçã (Seda, AAB), raça 2 (R2) afeta cultivares de banana para cozimento como Bluggoe (*Musa* spp., Grupo ABB) e raça 4 (R4) afeta cultivares de banana Cavendish (*Musa* spp., Grupo AAA) e cultivares de banana suscetíveis a R1 e R2 (Ploetz 2015).

As piores epidemias da história, na década de 1950 foram causadas por populações da R1 e, como solução, as variedades do grupo Gros Michel foram substituídas por clones Cavendish resistentes, que agora são cultivados no mundo inteiro, recuperando assim a indústria bananeira. No entanto, muitas variedades de banana de importância regional ainda são suscetíveis a essas populações e sucumbem à doença (Ploetz 2006, 2015). A raça 4 foi disseminada desde a década dos 90 na Ásia, Meio Oriente, Índia, África e Europa, até alcançar América Latina, onde foi reportada na Colômbia no ano 2019 e relatada em 2021 no Peru (Garcia Bastidas et al. 2020; Zheng et al. 2018). Essa expansão é preocupante e a indústria mundial da bananeira encontra-se novamente diante da ameaça dessa doença.

Considerando a variação dentro das *formae speciales* de *F. oxysporum* existem os grupos de compatibilidade vegetativa VCGs. Esse conceito permite a identificação de possíveis subpopulações com algumas características genéticas distintas, como patogenicidade, ou origem geográfica. Dos 24 VCGs relatados em *F. oxysporum*, 8 foram identificados no Brasil a partir de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, e apresentam distribuição independente do genótipo de bananeira (Fourie et al. 2009; Batista et al. 2022).

Fusarium oxysporum é atualmente definido como um complexo de espécies filogenéticas (Lombard et al. 2019). Mediante análise dos genes EF-1 e mtSSU rDNA foram identificadas cinco linhagens filogenéticas independentes numa população global (O'Donnell et al. 1998). Recentemente, baseado na análise dos genes barcode EF-1, RPB1 e RPB2, utilizando isolados dos estudos anteriores e incluindo isolados da Indonésia, o centro de origem da bananeira, nove espécies filogenéticas foram propostas, entre elas *F. odoratissimum*, que supostamente representa a TR4 (Maryani et al. 2019a).

Estudos realizados no Brasil demonstraram que a maioria da população de Foc apresenta uma alta homogeneidade, indicando uma estrutura de população clonal. Entretanto, isolados locais poderiam

evoluir a partir de patógenos introduzidos, provavelmente por meio da transferência horizontal (Batista et al. 2022, Costa et al. 2015; Cunha et al. 2015; Deltour et al., 2018). Nesse contexto, pesquisas sobre a diversidade desse patógeno trazem conhecimento novo, explicando a polifilia, ou origens diversas das populações do patógeno.

Os objetivos deste estudo foram: (i.) Identificar isolados do morfotipo *F. oxysporum* obtidos de bananeiras com sintomas de murcha, utilizando o conceito de espécie filogenética; (ii.) Definir a quais raças fisiológicas pertencem os isolados obtidos, por meio da inoculação em cultivares diferenciadoras; e (iii.) Avaliar congruências e conflitos entre espécies filogenéticas propostas no FOOSC e as raças fisiológicas. Com a identificação das espécies do FOOSC, que causam doenças na bananeira, é possível reavaliar os conceitos de *forma specialis* e raça. Em consequência, direcionar estudos de seleção de cultivares resistentes e o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem e isolamento do fungo

Amostras de rizomas com sintomas de Fusariose (Mal-do-Panamá) foram obtidas de plantas de banana de quatro diferentes cultivares (Capixaba ou W, Prata anã, Princesa e Maçã tradicional). A amostragem foi realizada no município de Aguaí, estado de São Paulo, Brasil, na fazenda Pinierinho, onde foram coletados aleatoriamente rizomas de plantas de bananeira no estado vegetativo de até 50 cm de altura. Quatro amostras selecionadas para cada cultivar foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente rotulados, transportadas e armazenadas a -8°C, até o processamento. No laboratório, os rizomas coletados foram agitados suavemente para remover o solo aderido à superfície, após, as raízes presentes nos rizomas foram cortadas e o solo aderido firmemente à raiz (rizosfera) foi coletado. As raízes cortadas foram armazenadas em tubos falcon e o solo rizosférico armazenado em tubos eppendorf e mantidos a -20°C até o processamento.

2.2 Obtenção e preservação de isolados

Solo rizosférico. Para a obtenção dos isolados do solo rizosférico, diluições seriadas foram feitas com o solo de cada cultivar. Em seguida, 100 uL das diluições 10⁻⁴ foram transferidos para placas de Petri (três por cultivar) contendo meio de cultura extrato de Malte 2% + antibiótico e incubados a 25°C em câmara do tipo BOD, por cinco dias, com ciclo de 12h de luz fluorescente branca / 12h de escuridão. Após a observação da presença de estruturas de *F. oxysporum* foi realizado o isolamento direto, com a transferência dessas estruturas para placas de Petri contendo meio extrato de Malte 2% (MA2%), seguindo de incubação em temperatura ambiente. Quando observado o crescimento de colônias indicativas para *F. oxysporum*, estruturas do fungo foram transferidas para novas placas de Petri, contendo MA2%, para obtenção de culturas puras.

Raíz. Para a obtenção dos isolados, as raízes foram desinfestadas em cinco lavagens com MgSol estéril, mais uma lavagem com MgSol estéril contendo 0,01% (v / v) de Tween 20, seguida por duas lavagens com MgSol estéril por dois minutos cada. Em seguida, as raízes foram imersas em NaClO a 1% mais Tween 20 a 0,01% por dois minutos com agitação lenta, enxaguadas cinco vezes com MgSol estéril e finalmente secas em papel de filtro. Uma vez desinfetadas, o isolamento indireto foi realizado cortando as raízes em discos de aproximadamente três milímetros de diâmetro e os transferindo para placas de Petri contendo meio MA2%, o conjunto foi incubado em temperatura ambiente com ciclo de 12h de luz branca / 12h de no escuro. Quando observado o crescimento de colônias indicativas para *F. oxysporum*, estruturas do fungo foram transferidas para novas placas de Petri, contendo MA2%, para obtenção de culturas puras. Após a obtenção de culturas puras, foram preparadas culturas monospóricas, as quais foram preservadas em água destilada esterilizada, a 10°C, no escuro, e criopreservadas em suspensão de esporos em 15% glicerol a -80°C para depósito na Coleção Micológica de Lavras (CML).

2.3 Sequenciamento e análises filogenéticas

Os isolados foram cultivados em meio líquido com extrato malte 2% por três dias sob agitação de 100 rpm em agitador orbital em temperatura ambiente. A biomassa foi filtrada e macerada em nitrogênio líquido, e o DNA foi extraído utilizando o método CTAB. A concentração de DNA foi estimada usando NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) e visualmente em gel de agarose a 1%. A amplificação do fragmento do gene que codifica o *fator de alongação-1 α* (*EF-1 α*) dos isolados foi realizada utilizando os *primers* EF-1/EF-2 ou EF3/EF-22 (O'Donnell et al. 1998, 2008; Sung et al. 2007). As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cyclor TM (BIO-RAD). As condições de ciclo para *EF-1 α* foram as seguintes: 94°C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94°C, por 30 segundos, 62°C, por 45 segundos, 72°C, por 1 minuto; 72°C, por 5 minutos (O'Donnell et al. 1998).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em transluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e preparados para sequenciamento. Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático da empresa Macrogen EUA. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente no programa SeqAssem ver. 07/2008 (Hepperle 2004) e as sequências editadas foram comparadas na base de dados GenBank, National Center for Biotechnological Information - NCBI, por meio da ferramenta BLAST.

Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos dos isolados foram gerados utilizando a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al. 1994), implementada no programa MEGA X (Kumar et al. 2018). Sequências de referência de espécies do FOOSC, incluindo isolados identificados como *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, suas respectivas raças, e outras *formae speciales* (Fourie et al. 2009;

Lombard et al. 2019; Maryani et al. 2019a, b), previamente depositadas no GenBank, foram também adicionados às análises (Tabela 2). O alinhamento das sequências consistiu de 97 posições parcimônia informativas/450 bp. A análise filogenética foi realizada pelo método de máxima parcimônia utilizando o programa MEGA X, com 1000 replicações. Sequência de *F. foetens* foi utilizada para formar o grupo externo.

2.4 Análise de primer específico para a raça TR4

Análises *in silico* e por reação de PCR foram realizadas utilizando o primer específico FocTR4-F / FocTR4-R, proposto por Dita et al. (2010), para a detecção de isolados pertencentes a raça 4 de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Nas análises *in silico*, o fragmento amplificado por FocTR4-F foi comparado com sequências de isolados previamente identificados como raça 4, subtropical 4, raça 1, raça 2 e de isolados que representam diferentes espécies do FOOSC para identificação de locais únicos ou compartilhados entre as sequências (Tabela 2).

Inicialmente, no banco de dados do GenBank, com uso da ferramenta BLASTn, foi realizada uma busca por sequências com identidade de 100% em relação a região amplificada pelo primer. As identificadas foram utilizadas para construir alinhamentos múltiplos com a ferramenta ClustalW, implementada no MEGAX (Kumar et al., 2018). Foram incluídas aos alinhamentos sequências parciais de DNA da região espaçadora intergênica (IGS) de isolados que representam diferentes espécies do FOOSC, devido a sequência do fragmento amplificado pelo primer específico FocTR4 estar localizado na região IGS (Fourie et al. 2009; Lombard et al. 2019; Maryani et al. 2019 a, b) (Tabela 2).

No teste por reação de PCR, o *primer* específico FocTR4 foi utilizado para detecção de possíveis representantes da raça 4 de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* nos isolados obtidos nesse estudo. O DNA de isolados representantes de outras espécies do FOOSC foram adicionados às análises. A PCR foi realizada utilizando o kit GoTaq Colorless Master Mix (Promega) em 20 µL de misturas de reação contendo 10 pmol de cada *primer* específico em um termociclador MyCycler TM (Bio-Rad), utilizando as condições de amplificação descrita por Dita et al. (2010). Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corados com GelRed (Biotium) e visualizados com um transiluminador MiniBis Pro UV (Uniscience).

2.5 Caracterização morfológica

Os isolados foram caracterizados morfológicamente de acordo com (Leslie & Summerell, 2006). Os isolados obtidos foram cultivados em meio MA2% e incubados a 25°C no escuro por 4 dias para observação da taxa de crescimento e por 14 dias para a avaliação da coloração da colônia. Foram realizadas três repetições por isolado. Para avaliação das características micromorfológicas, os isolados foram cultivados em meio Synthetic Nutrient-poor Agar (SNA) + folha de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.), e incubados a 20°C sob fotoperíodo de 12 horas com luz branca fluorescente e após 7 dias de incubação foi feita a avaliação (Leslie & Summerell, 2006). Foram avaliadas características micromorfológicas como a presença ou não e cor de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e

origem de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides; presença ou não de clamidósporos
presença ou não de microconídios em falsas cabeças e presença ou não de hifa estéril espiralada.

2.6 Teste de patogenicidade em cultivares diferenciadoras

Para testar a patogenicidade e determinar as respectivas raças, 12 isolados foram inoculados nas cultivares Maçã (susceptível para raça 1, AAB) e Grande Naine (susceptível para a raça 4 e resistente para raça 1, AAA) (Tabela 1). Para a obtenção do inóculo, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio completo, e incubadas a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas com luz branca fluorescente por 15 dias (Leslie & Summerell, 2006). A suspensão de esporos foi preparada colocando 10 mL de água destilada estéril nas placas de Petri contendo o fungo, o micélio foi raspado com a ajuda de uma alça de Drigalsky e filtrado utilizando gaze estéril para remover o micélio. A concentração de conídios da suspensão obtida foi determinada e ajustada em câmara de Neubauer para 1×10^6 conídios mL⁻¹ (Dita et al. 2010).

Mudas de banana das respectivas cultivares com 30 cm de altura, provenientes do cultivo in vitro foram plantadas em vasos de 5 litros contendo uma combinação estéril de substrato (TROSTRAD) mais areia na proporção de 2: 1. As plantas foram adaptadas na casa de vegetação por 40 dias, após este período as plantas foram inoculadas pelo método de imersão utilizando suspensão de esporos de cada um dos isolados (Dita et al. 2010). Este método consistia na retirada das plantas dos vasos, seguido de lavagem das raízes e imersão por 30 minutos na suspensão de esporos (1×10^6 conídios mL⁻¹) de cada isolado, individualmente. A seguir, foram replantadas nos vasos e mantidas em casa de vegetação. A irrigação foi realizada de acordo com as necessidades hídricas.

Cada tratamento consistiu da inoculação de um isolado em cada uma das cultivares. Plantas inoculadas com água foram tratadas como controle negativo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com 4 repetições, sendo cada planta uma unidade experimental. Os ensaios foram realizados 2 vezes, em duas épocas diferentes, o primeiro no mês de agosto de 2021, e o segundo no mês de março de 2022. As plantas foram avaliadas com base na severidade da doença, onde os sintomas foliares e do rizoma foram analisados após nove semanas de inoculação, utilizando uma escala de notas variando de 1 a 5 (Dita et al. 2014). O ensaio foi repetido duas vezes. As análises estatísticas foram realizadas usando o software R versão 4.0.0 (R Core Team 2020). Após a verificação da normalidade e homogeneidade das variáveis por testes Shapiro Wilk e Bartlett, os dados foram submetidos à análise não paramétrica, por não atenderem aos pressupostos para análises de variância (ANOVA), e comparados pelos testes de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn.

3. RESULTADOS

3.1 Identificação das espécies por análise filogenética

Uma coleção de 13 isolados foi composta com nove isolados obtidos de solo rizosférico (n=6) e raiz (n=3), e mais quatro isolados obtidos de pseudocaule, anteriormente depositados na CML (Tabela 1). A análise filogenética realizada pelo método de Máxima parcimônia baseada nas sequências parciais do gene *EF-1α* mostraram que os 13 isolados analisados pertencem ao FOOSC (Figura 1). Dois isolados agruparam juntos a sequências de isolados de referência de *F. triseptatum* e 11 isolados foram identificados como *F. callistephi*, agrupando junto as sequências dos isolados tipo das espécies. Nos dois clados formados com os isolados obtidos no presente estudo, também agruparam sequências de isolados identificados previamente em outros trabalhos como *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

3.2 Caracterização morfológica

Isolados representantes da espécie *F. callistephi* apresentaram colônias em MA2% com média de crescimento de 3.75 cm em três dias, e coloração com diferentes tons de roxo, indo do claro ao escuro, e odor ausente. Em SNA os microconídios eram hialinos e ovais, 0 a 1 septo, principalmente sem septo, e tamanho variando entre $9-12 \times 2.5 \mu\text{m}$, produzidos em falsas cabeças, a partir de monofiálides simples ou ramificadas e polifiálides. Esporodóquios produzidos em SNA de cor laranja brilhante, formado após 10 dias sobre folha de cravo e na superfície do ágar. Macroconídios longos, relativamente delgados, células basais em forma de pé e células apicais em forma gancho e arredondado, com tamanho variando de $33-47 \times 3-5 \mu\text{m}$. Produção abundante de clamidósporo, formados após 10 dias, sendo lisos, solitários ou agrupados, terminais e intercalar (Figura 2).

Para *F. triseptatum* o tamanho das colônias em BDA tiveram média de crescimento de 3.88 cm em três dias. A cor da colônia em MA2% foi roxo, odor ausente, e micélio pouco abundante. Em SNA os microconídios eram ovais e sem septo, o tamanho variava entre $7-12 \times 2.5 \mu\text{m}$, produzidos em falsas cabeças, a partir de monofiálides simples e ramificadas, ausência de esporodóquio em SNA. Pouca produção de macroconídios, que apresentavam células basais em forma de pé longo e células apicais de forma arredondada, de 3 septos, e tamanho de $25-45 \times 2.5 \mu\text{m}$, não foi observado produção de clamidósporo (Figura 2).

3.3. Análise de *primer* específico

A sequência amplificada por FocTR4-F alinhou em 100% identidade com 15 sequências de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, raça 4, depositadas no GenBank. Nos alinhamentos gerados, os isolados da raça 4, pertencentes a espécie *F. odoratissimum*, compartilham os nucleotídeos únicos presentes nas sequências da região que o primer específico para raça 4 compreende na região IGS. Na comparação entre as raças, os isolados identificados como raça 4 subtropical se distinguiram dos da raça 4 em 2 pares de base, duas posições no alinhamento para a sequência *forward* (Figura S_1).

Sequências dos isolados CAV 632 e CAV 1051 identificados como raça 1 se diferenciam em apenas um nucleotídeo, quando comparado com a sequência *forward* do *primer* específico. Para a sequência *reverse* do *primer*, a diferença dos isolados da raça 4 para os isolados das demais raças está presente em 2 ou 3 pares de base (Figura S_2). Não houve amplificação da região alvo para nenhum dos isolados testados. Ocorreram amplificações de regiões inespecíficas, com tamanho de fragmento diferente do esperado para o que seria obtido com o *primer* específico.

3.4 Teste de patogenicidade em cultivares diferenciadoras

Todos os isolados utilizados no teste de patogenicidade induziram sintomas de Fusariose na cultivar de banana Maçã. Os isolados de *F. callistephi* (CML 4316 a 4324 e CML 3489) e *F. triseptatum* (CML 3490 e CML 3487) induziram sintomas foliares e internos atingindo notas entre 2 e 5 da escala diagramática, (Tabela 4; Figuras 3 e 4). Os isolados CML 4321, CML 3489, CML 3490, e CML 3487 também induziram sintomas foliares e internos na cultivar Grande Naine. As plantas da cultivar Grande Naine inoculadas com o isolado CML 3489 (*F. callistephi*), apresentaram notas 3 e 5 para os sintomas foliares e internos, respectivamente, enquanto os isolados CML 3490 e CML 3487 (*F. triseptatum*) induziram sintomas foliares e internos atingindo notas 2 e 5, respectivamente (Tabela 4; Figuras 3 e 5).

Quanto aos resultados da análise estatística dos sintomas induzidos no rizoma, os isolados CML 3489 e CML 4321 foram mais virulentos que os demais isolados por diferirem estatisticamente do controle negativo na cultivar Maçã (Tabela 4). Quanto aos sintomas do rizoma na cultivar Grande Naine, o isolado CML 3489 foi o mais virulento que os demais isolados por diferir estatisticamente do controle todos os demais tratamentos não diferiram (Tabela 4). Em relação aos sintomas induzidos na parte aérea, só o isolado CML 3489 apresentou diferença estatística em comparação ao tratamento controle tanto na cultivar maçã como em Grande Naine (Tabela 4).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, baseado na análise filogenética do gene *EF-1 α* , isolados do morfotipo *F. oxysporum* obtidos de bananeira com sintoma de murcha foram identificados como *F. callistephi* e *F. triseptatum*, espécies filogenéticas pertencentes ao FOOSC. No teste de patogenicidade em bananeira, representantes dessas espécies foram patogênicas a cultivar de banana Maçã e identificadas, portanto como pertencentes à raça 1. Em estudo de Araújo et al. (2017) foram identificadas duas linhagens distintas em uma coleção de isolados de FOOSC provenientes de plantas de bananeira com sintoma de fusariose. Esses isolados foram identificados aqui como *F. callistephi* e *F. triseptatum*.

Fusarium callistephi foi descrita a partir de isolado obtido da planta ornamental *Callistephus chinensis* (Lombard et al. 2019). De acordo com os resultados das análises de filogenia molecular, no clado que contém *F. callistephi* agruparam também isolados que pertencem às *formae speciales cubense*, *cucumerinum* e *vasinfectum*. Já no clado que representa a espécie *F. triseptatum*, no qual o

isolado tipo foi obtido da planta *Ipomoea batatas*, e identificado como *forma specialis batatas*, também agruparam isolados previamente identificados como *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Estudos tem demonstrado que os genes usados convencionalmente para inferir as relações filogenéticas de espécies do FOOSC, não tem relação com a patogenicidade específica do hospedeiro deste patógeno (O'Donnell et al. 1998; Fourie et al. 2009). Os nossos resultados evidenciam que não há correlação entre os dois diferentes conceitos e formas de identificação das espécies dentro do FOOSC. A raça 1 está distribuída em pelo menos sete diferentes clados do FOOSC, representados pelas espécies *F. duoseptatum*, *F. phialophorum*, *F. tardichlamydosporum*, *F. callistephi* e *F. triseptatum* (incluindo isolados do Brasil). Enquanto representantes da raça tropical e subtropical 4 estão distribuídos em três distintos clados, que se referem as espécies *F. odoratissimum*, *F. phialophorum* e linhagem III, definida por Fourie et al. (2009).

O alto grau de variação em Foc sugere que as linhagens são resultado de coevolução com seus hospedeiros. Outro fator que pode justificar a patogenicidade não se refletir na definição das espécies filogenéticas está associado aos genes envolvidos na patogenicidade presentes em cromossomos acessórios, que podem ser transmitidos por meio de transferência horizontal. Dessa forma, isolados pertencentes a uma única espécie podem representar diferentes *formae speciales* (O'Donnell et al. 1998; Summerell 2019; Fourie et al. 2009; Lombard et al. 2019).

Já a raça 4 parece ter uma distribuição mais restrita, sendo representados principalmente pela espécie *F. odoratissimum*. Alguns autores consideram a raça tropical 4 (TR4) como um sinónimo do grupo de compatibilidade vegetativa VCG1213 e da espécie filogenética *F. odoratissimum*, como um genótipo único, que causa doença nas bananeiras da cultivar Cavendish em condições tropicais (Dita et al. 2010; Maryani et al. 2019a). Nenhum dos isolados avaliados neste trabalho apresentou as regiões correspondentes ao *primer* específico para TR4, concordando que a raça TR4 é representada por *F. odoratissimum*, como a literatura propõe até o momento.

Isolados pertencentes a raça 4 (TR4) se distinguem das demais raças de FOC em relação aos genes de virulência (genes SIX) envolvidos na interação dos isolados com o hospedeiro. A raça 4 se diferencia da raça 1 no número de cópias e variabilidade das sequências do gene SIX1, apresentando três cópias e quatro variações de sequências nessa raça, em comparação com uma cópia e duas variações na raça 1 (Guo et al. 2014). Do mesmo modo, variações na sequência de nucleotídeos do gene SIX8 têm sido utilizadas para diferenciar a raça 4 tropical (TR4) da raça 4 subtropical (STR4), sendo que sequências de isolados da TR4 contem quatro variações e a STR4 possui dois (Fraser-Smith et al. 2014).

A raça 1 está amplamente distribuída nos países produtores de banana do mundo, incluindo o Brasil (Dita et al. 2018). O isolado CML 3489, *F. callistephi*, apresentou maior virulência que os demais isolados quando inoculado na cultivar Maçã, sendo, portanto, o isolado, mais virulento da raça 1, neste estudo. Apesar dos isolados analisados neste trabalho terem sido identificados como pertencentes a raça 1, os isolados CML 3487 e CML 3489, identificados respectivamente como *F.*

triseptatum e *F. callistephi* induziram sintomas foliares e internos na cultivar Grande Naine. Resultado semelhante foi observado por Cunha et al. (2015), no qual isolados coletados na região subtropical do Brasil (Santa Catarina) também induziram sintomas na cultivar Grande Naine em condições de casa de vegetação. Grupos de compatibilidade vegetativa encontrados no país (VCG 0120 e VCG 0129) indicam a presença de isolados da raça subtropical 4 (STR4). A STR4 se refere a populações de Foc que são capazes de afetar ‘Cavendish’ em regiões expostas a temperaturas amenas, enquanto TR4 pode afetar Cavendish tanto em condições tropicais quanto subtropicais (Cunha et al. 2015).

A morfologia dos isolados obtidos nesse estudo confirmam a grande variabilidade morfológica entre os isolados de espécies pertencentes ao FOOSC, já relatada em outros trabalhos (O’Donnell et al. 1998; Le Thi et al. 2022). Para *F. callistephi*, a descrição original relata a produção de microconídios apenas em monofiálides, e a ausência da produção de macroconídio no micélio aéreo, enquanto para isolados de *F. callistephi* avaliados no presente estudo, esses marcadores não foram observados. Já para *F. triseptatum*, não foi constatada a produção de macroconídio no micélio aéreo e clamidósporos (Figura 4), características mencionadas na descrição original da espécie (Lombard et al. 2019).

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que não há relação entre as duas formas de caracterização de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), raça e espécie filogenética. Uma raça fisiológica pode ser representada por isolados de diferentes espécies filogenéticas, ao passo que isolados de uma mesma espécie filogenética podem pertencer raças distintas. No entanto, a TR4 parece ter uma distribuição mais restrita e ser representada principalmente pela espécie *F. odoratissimum*. Mesmo com uma amostragem restrita analisada neste estudo, foi possível detectar a presença de duas espécies distintas. A inclusão de um universo maior de isolados deve proporcionar uma melhor perspectiva sobre a diversidade de espécies filogenéticas e raças fisiológicas de Foc causando fusariose em banana no Brasil.

5. AGRADECIMENTOS

A primeira autora agradece à CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de estudos (Código de Financiamento 001). Partes do estudo foram fomentadas pela bolsa concedida a LHP pelo CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Proc. 311888/2017-8) e pela FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Proc. APG 02345/17).

REFERÊNCIAS

- Araújo NAF, Pasqual M, Pio LAS, Alves E, Moura NM, Costa SDS. (2017) Identification and aggressiveness of four isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Latundan banana in Brazil. *J Phytopath* 165:257-264.
- Batista IC, Heck DW, Santos A, Alves G, Ferro CG, Dita M, Haddad F, Michereff SJ, Correia KC, da Silva CF, Mizubuti ES. (2022) The Brazilian population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* is not structured by VCG or by geographic origin. *Phytopathology* 112:2416-2425.
- Costa SN, Bragança CAD, Ribeiro LR, Amorim EP, Oliveira SAS, Dita MA, Laranjeira FF, Haddad F. (2015) Genetic structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in different regions from Brazil. *Plant Pathol* 64:137-146.
- Cunha CM, Hinz RH, Pereira A, Tcacenco FA, Stadnik MJ. (2015) Aggressiveness and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Santa Catarina, southern Brazil. *Trop Pl Pathol* 40:326-334.
- Deltour P, França SC, Heyman L, Pereira OL, Höfte M. (2018) Comparative analysis of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* populations associated with banana on a farm in Minas Gerais, Brazil. *Plant Pathol* 67:707-718.
- Dita MA, Waalwijk C, Buddenhagen IW, Souza Jr MT, Kema GHJ. (2010) A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. *Plant Pathol* 59: 348-357.
- Dita MA, Pérez-Vicente L, Martínez E. (2014) Technical Manual: prevention and diagnostic of *Fusarium* wilt (Panama Disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Tropical Race 4 TR4. FAO United Nations. Technical Manual, pp. 75.
- Dita MA, Barquero M, Heck D, Mizubuti ES, Staver CP (2018) *Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Front Pl Sci* 9: 1468.
- Fourie G, Steenkamp ET, Gordon TR, Viljoen A. (2009). Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* vegetative compatibility groups. *Appl Environm Microbiol* 75: 4770-4781.
- Fraser-Smith S, Czislowski E, Meldrum RA, Zander M, O'Neill W, Balali GR, Aitken EAB. (2014) Sequence variation in the putative effector gene SIX 8 facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Pathol* 63:1044-1052.
- García-Bastidas FA, Quintero-Vargas JC, Ayala-Vasquez M, Schermer T, Seidl MF, Santos-Paiva M, Noguera AM, Aguilera-Galvez C, Wittenberg A, Hofstede R, Sørensen A, Kema GHJ. (2020) First report of *Fusarium* wilt Tropical Race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *Plant Dis* 104:994.

- Guo L, Han L, Yang L, Zeng H, Fan D, Zhu Y, Feng Y, Wang G, Peng C, Jiang X, Zhou D. (2014) Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing banana vascular wilt disease. PLoS One 9:e95543.
- Hepperle D. (2004) SeqAssem©. Win32–Version. A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Available at: <http://www.sequentix.de>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35:1547–1549.
- Leslie JF, Summerell BA. (2006) *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons.
- Le Thi L, Mertens A, Vu DT, Vu TD, Anh Minh PL, Duc HN, de Backer S, Swennen R, Vandeloock F, Panis B, Amalfi M, Decock C, Gomes SIF, Merckx VSFT, Janssens SB. (2022) Diversity of *Fusarium* associated banana wilt in northern Viet Nam. MycoKeys 87:53–76.
- Lombard L, Sandoval-Denis M, Lamprecht SC, Crous PW. (2019) Epitypification of *Fusarium oxysporum*–clearing the taxonomic chaos. Persoonia 43:1-47.
- Magdama F, Monserrate-Maggi L, Serrano L, García Onofre J, Jiménez-Gasco MDM. (2020) Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the *Fusarium* wilt pathogen of banana in Ecuador. Plants 9:1133.
- Maryani, N, Lombard L, Poerba YS, Subandiyah S, Crous PW, Kema GHJ. (2019a) Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. Stud Mycol 92:155-194.
- Maryani N, Sandoval-Denis M, Lombard L, Crous PW, Kema GHJ. (2019b) New endemic *Fusarium* species hitch-hiking with pathogenic *Fusarium* strains causing Panama disease in small-holder banana plots in Indonesia. Pers.: Mol. Phylogeny Evol. Fungi 43:48-69.
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc Natl Acad Sci 95:2044-2049.
- O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, Zhang N, Geiser DM. (2008) Molecular phylogenetic diversity; multilocus haplotype nomenclature, and *in vitro* antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. J Clin Microbiol 46:2477–2490.
- Pegg KG, Coates LM, O'Neill WT, Turner DW. (2019) The epidemiology of *Fusarium* wilt of banana. Frontiers Pl Sci 10:1395.
- Ploetz RC. (2006) *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Phytopathology 96:653-656.
- Ploetz RC (2015) Management of *Fusarium* wilt of banana: a review with special reference to tropical race 4. Crop Prot 73:7-15.

Summerell BA. (2019) Resolving *Fusarium*: current status of the genus. *Ann Rev Phytopath* 57:323-339.

Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL, Spatafora JW. (2007) A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Mol Phylogen Evol* 44:1204-1223.

Team, R. Core. (2020) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria: Available at: <https://www.R-project.org/>

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673-4680.

Zheng S-J, García-Bastidas FA, Li X, Zeng L, Bai T, Xu S, Yin K, Li H, Fu G, Yu Y, Yang L, Nguyen HC, Douangboupha B, Khaing AA, Drenth A, Seidl MF, Meijer HJG, Kema GHJ. (2018) New geographical insights of the latest expansion of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* Tropical Race 4 into the greater Mekong subregion. *Front. Plant Sci.* 9:457.

ANEXOS

Tabela 1 Isolados do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* FOSC utilizados nesse estudo.

Espécie	CML ¹	Outro código	Substrato	Cultivar	Origem ²	GenBank
						<i>EF-1a</i>
<i>F. callistephi</i>	4316	CTM02	Solo rizosférico	W	Aguaí SP	x
<i>F. callistephi</i>	4317	CTM05	Raiz	W	Aguaí SP	x
<i>F. callistephi</i>	4318	CTM06	Solo rizosférico	Maçã	Aguaí SP	x
<i>F. callistephi</i>	4319	CTM08	Raiz	Maçã	Aguaí SP	x
<i>F. callistephi</i>	4320	CTM09	Solo rizosférico	Prata	Aguaí SP	x
<i>F. callistephi</i>	4321	CTM10	Solo rizosférico	Prata	Aguaí SP	x

Todos os isolados foram utilizados no teste de patogenicidade, exceto CML 3488.

<i>F. callistephi</i>	4322	CTM13	Solo rizosférico	Prata	Aguai SP	x
<i>F. callistephi</i>	4323	CTM15	Solo rizosférico	Princesa	Aguai SP	x
<i>F. callistephi</i>	4324	CTM19	Raiz	Princesa	Aguai SP	x
<i>F. callistephi</i>	3488	FocGO1	Pseudocaule	Maçã	Lavras MG	KY436228
<i>F. callistephi</i>	3489	FocGO2	Pseudocaule	Maçã	Itaguarú GO	KY436229
<i>F. triseptatum</i>	3487	Foc807	Pseudocaule	Maçã	Cruz das Almas BA	KY436227
<i>F. triseptatum</i>	3490	FocGO2A	Pseudocaule	W	Buriti Alegre GO	KY436230

¹CML: Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil;

²Estados do Brasil: SP = São Paulo, MG = Minas Gerais, GO = Goiás, BA = Bahia.

Tabela 2. Isolados de referência incluídos nas análises filogenéticas

Espécie	Código ^a	Hospedeiro/substrato	Forma <i>specialis</i>	Raça		Código GenBank
						<i>EF-1a</i>
<i>F. callistephi</i>	CBS 187.53 T	<i>Callistephus chinensis</i>	<i>callistephi</i>		The Netherlands	MH484966
<i>F. contaminatum</i>	CBS 117461	Embalagem de plástico contendo resíduo de leite			The Netherlands	MH485002
<i>F. cugenangense</i>	Indo 203 = InaCC F984 T	<i>Musa sp. var. Pisang Kepok</i>	<i>cubense</i>		Indonesia	LS479757
<i>F. curvatum</i>	NRRL 36373 = CBS 238.94 T	<i>Beaucarnea sp.</i>			The Netherlands	MH484984
<i>F. duoseptatum</i>	Indo 109 = InaCC F916 T	<i>Musa sp. var. Pisang Kepok</i>	<i>cubense</i>	R1	Indonesia	LS479688
<i>F. elaeidis</i>	NRRL 36358 = CBS 217.49 T	<i>Elaeis sp.</i>	<i>elaeidis</i>		Zaire	MH484961
<i>F. foetens</i>	CBS 120665	<i>Nicotiana tabacum</i>			Iran	MH485009
<i>F. glycines</i>	CBS 144745 = CPC 25804	<i>Glycine max</i>			South Africa	MH485032
<i>F. glycines</i>	CBS 176.33	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>lini</i>			MH484959
<i>F. gossypinum</i>	CBS 116611	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>vasinfectum</i>		Ivory Coast	MH484998
<i>F. grosnichelii</i>	Indo 19 = InaCC F833 T	<i>Musa sp. var. Pisang Awak</i>	<i>cubense</i>	R1	Indonesia	LS479744

<i>F. kalimantanense</i>	InaCC F917 = Indo 110	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Ambon	<i>cubense</i>		Indonesia	LS479690
<i>F. languescens</i>	NRRL 36531 = CBS 645.78 T	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>lycopersici</i>		Morocco	MH484971
<i>F. libertatis</i>	CBS 144749 = CPC 28465 T	Superfície de rocha			South Africa	MH485035
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 840.88 T	<i>Dianthus caryophyllus</i>	<i>dianthi</i>		The Netherlands	MH484978
<i>F. odoratissimum</i>	Indo8 = InaCC F822 T	<i>Musa</i> sp. var. Pisang Raja	<i>cubense</i>	TR4	Indonesia	LS479828
<i>F. odoratissimum</i>	InaCC F817 = Indo2	<i>Musa</i> sp. var. Pisang Kepok	<i>cubense</i>		Indonesia	LS479753
<i>F. oxysporum</i>	CBS 144134 T	<i>S. tuberosum</i>			Germany	MH485044
<i>F. oxysporum</i>	CAV189	<i>Musa</i> sp.	<i>cubense</i>		Malawi	FJ664956
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 25420	<i>Gossypium</i> sp.	<i>vasinfectum</i>	R1 - R2	USA	AF008512
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 25367	<i>M. acuminata</i> × <i>M. balbisiana</i>	<i>cubense</i>			AF008486
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 25356	Solo				AF008480
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 25609	Batata	<i>cubense</i>			AF008490
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 26022	<i>M. acuminata</i> x <i>M. balbisiana</i>	<i>cubense</i>			AF008491
<i>F. oxysporum</i>	CAV009	Cavendish	<i>cubense</i>	R4S	South Africa	FJ664940
<i>F. oxysporum</i>	CAV1051	Maça	<i>cubense</i>	R1 - R2	USA	FJ664923
<i>F. oxysporum</i>	CAV1100	Dedo humano	<i>cubense</i>	R4S	Australia	FJ664939

<i>F. oxysporum</i>	CAV1107	Chuoi xiem	<i>cubense</i>	R1	Vietnam	FJ664950
<i>F. oxysporum</i>	CAV194	<i>Musa</i> sp.	<i>cubense</i>	R4S	Indonesia	FJ664955
<i>F. oxysporum</i>	CAV293	Dwarf Cavendish	<i>cubense</i>	R4S	Canary Islands	FJ664941
<i>F. oxysporum</i>	CAV296	Highgate	<i>cubense</i>	R1	Honduras	FJ664943
<i>F. oxysporum</i>	CAV300	<i>Musa</i> sp.	<i>cubense</i>	R4T	Indonesia	FJ664932
<i>F. oxysporum</i>	CAV312	Pisang udang	<i>cubense</i>	R4T	Malaysia	FJ664936
<i>F. oxysporum</i>	CAV313	Pisang awak legor	<i>cubense</i>	R4T	Malaysia	FJ664937
<i>F. oxysporum</i>	CAV602	Dedo humano	<i>cubense</i>	R1 - R2	Australia	FJ664957
<i>F. oxysporum</i>	CAV604	Cavendish	<i>cubense</i>	R4T	Indonesia	FJ664935
<i>F. oxysporum</i>	CAV609	Dedo humano	<i>cubense</i>	R1-R2	Australia	FJ664958
<i>F. oxysporum</i>	CAV632	<i>Musa</i> sp.	<i>cubense</i>	R1	Honduras	FJ664924
<i>F. oxysporum</i>	CAV786	Dedo humano	<i>cubense</i>	R1 - R2	Australia	FJ664959
<i>F. oxysporum</i>	CAV794	Pisang Rubus	<i>cubense</i>	R1	Pisang Rubus	FJ664922
<i>F. oxysporum</i>	CAV810	Pisang Berangan	<i>cubense</i>	R4T	Indonesia	FJ664930
<i>F. oxysporum</i>	CAV811	Pisang Susu	<i>cubense</i>	RAT	Indonesia	FJ664934
<i>F. oxysporum</i>	CAV814	Cavendish	<i>cubense</i>	R4T	Indonesia	FJ664933

<i>F. oxysporum</i>	CAV815	Cavendish	<i>cubense</i>	R4T	Indonesia	FJ664934
<i>F. oxysporum</i>	CAV871	Pisang Rastali	<i>cubense</i>		Malaysia	FJ664954
<i>F. oxysporum</i>	CAV929	Latundan	<i>cubense</i>	R1	Philippines	FJ664951
<i>F. oxysporum</i>	CAV933	Kluai Namwa	<i>cubense</i>	R1	Thailand	FJ664953
<i>F. oxysporum</i>	CAV957	Kluai Namwa	<i>cubense</i>		Thailand	FJ664952
<i>F. oxysporum</i>	NRRR25607	<i>M. acuminata</i> x <i>M. balbisiana</i>	<i>cubense</i>			AF008489
<i>F. oxysporum</i>	InaCC F958 = Indo158	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Barangan				LS479729
<i>F. oxysporum</i>	BS 102030	<i>M. sapientum</i> cv. Pisang mas	<i>cubense</i>		Malaysia	MH484989
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 26038	<i>Musa acuminata</i> . M. bal	<i>cubense</i>			AF008494
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 38591	<i>Cucumis sativus</i> (cucumber) wilt	<i>cucumerinum</i>		New Zealand	FJ985379
<i>F. phialoporum</i>	InaCC F971= Indo 182T	<i>Musa</i> sp. var. Pisang Awak	<i>cubense</i>		Indonesia	LS479741
<i>F. purpurascens</i>	Indo79 = InaCC F886T	<i>Musa</i> sp. var. Pisang Kepok	<i>cubense</i>	R1	Indonesia	LS479827
<i>F. purpurascens</i>	InaCC F913 = Indo106	<i>Musa</i> sp. var. Pisang Kepok	<i>cubense</i>		Indonesia	LS479685
<i>F. tardichlamydosporum</i>	CBS 102028 = NRRL 36117	<i>M. sapientum</i> cv. Pisang awak	<i>cubense</i>		Malaysia	MH484988
<i>F. tardichlamydosporum</i>	InaCC F959 = Indo159	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Barangan	<i>cubense</i>		Indonesia	LS479730

<i>F. triseptatum</i> f. sp. <i>batatas</i>	NRRL 36389 = CBS 258.50T	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>batatas</i>		USA	MH484964
<i>F. triseptatum</i>	CBS 116619	<i>G. hirsutum</i>	<i>vasinfectum</i>		Ivory Coast	MH485001

^a CAV = Culture Collection at FABI, University of Pretoria, South Africa; CBS = Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands; CPC = Collection of P.W. Crous; InaCC = Indonesian Culture Collection, Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI) Cibinong, Indonesia; Indo = Collection of N. Maryani at Wageningen Plant Research, Wageningen University, The Netherlands; NRRL = Agricultural Research Service Culture Collection, USA; R1 = isolados identificados como raça 1; R2 = isolados identificados como raça 2; R4S = isolados identificados como subtropical raça 4; T = isolado ex-tipo; TR4 = isolados identificados como raça TR4.

Tabela 3. Escala de notas de sintomas foliares e de rizoma da murcha de *Fusarium* em bananeira em condições de casa de vegetação (Dita et al. 2014)

Nota	Descrição sintomas internos
1	Nenhum sintoma
2	Amarelamento inicial nas folhas mais velhas
3	Amarelamento em todas as folhas velhas com alguma descoloração nas folhas mais novas
4	Todas as folhas com intenso amarelamento
5	Planta morta

Nota	Descrição sintomas foliares
1	Nenhum sintoma
2	Descoloração inicial do rizoma
3	Leve descoloração do rizoma
4	Rizoma com a maioria dos tecidos internos necrosados
5	Rizoma totalmente necrosado

Tabela 4. Sintomas observados no rizoma e na parte aérea de plantas das cultivares Maçã e Grande Naine, inoculadas com Foc.

Tratamento	Espécie	² Rizoma				Parte aérea			
		Maçã		Grande Naine		Maçã		Grande Naine	
Controle negativo		⁴ 1	ns	1	ns	1	ns	1	ns
¹ CML3489	<i>F. callistephi</i>	0,005305702**		0,03186985*		0,00169071**		0,006022007**	
CML 4316	<i>F. callistephi</i>	1	ns	1	ns	0,90027258 ns		1	ns
CML 4317	<i>F. callistephi</i>	1	ns	1	ns	0,90027258 ns		0,578775402 ns	
CML 4318	<i>F. callistephi</i>	1	ns	1	ns	0,90027258 ns		1	ns
CML 4319	<i>F. callistephi</i>	0,21951514	ns	1	ns	0,90027258 ns		1	ns
CML 4320	<i>F. callistephi</i>	1	ns	1	ns	0,90027258 ns		0,578775402 ns	
CML 4321	<i>F. callistephi</i>	0,02782131*		1	ns	1	ns	1	ns
CML 4322	<i>F. callistephi</i>	1	ns	1	ns	2	ns	1	ns
CML 4323	<i>F. callistephi</i>	1	ns	1	ns	3	ns	1	ns
CML 4324	<i>F. callistephi</i>	1	ns	1	ns	4	ns	1	ns
CML 3487	<i>F. triseptatum</i>	1	ns	1	ns	1	ns	0,020469473*	
CML 3490	<i>F. triseptatum</i>	0,472771222	ns	0,19376076	ns	1	ns	1	ns
³ CV (%)		38,09		80,529		43,84		40,81	

¹CML: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, Brasil.

²Asterísco em notas de rizoma e parte aérea significa diferença estatística ao 5%, teste de Dunn;

³CV: Coeficiente de variação.

⁴NS: Não significativo

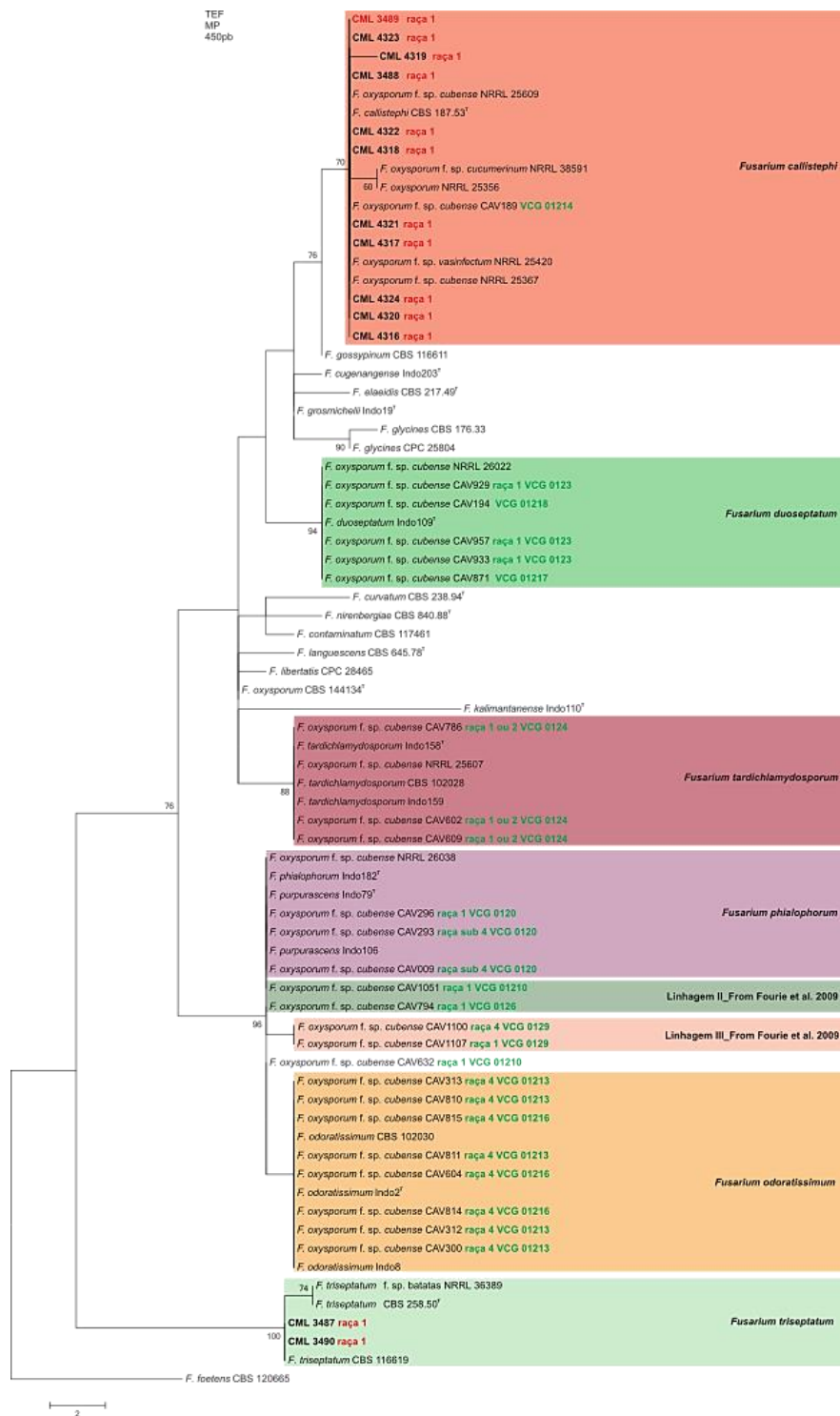


Figura 1. Árvore filogenética de Máxima Parcimônia (MP) de seqüências parciais do gene EF-1 α de isolados obtidos neste estudo, de isolados de referência do complexo de espécies *Fusarium oxysporum*, e de representantes das diferentes raças de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. CAV: Seqüências de isolados provenientes de Fourie et al. 2009. Valores de suporte dos ramos iguais ou superiores a 70% são mostrados junto aos nós. T identifica isolados ex-tipo.



Figura 2. Características morfológicas de *F. callistephi*. **a.-f.** Cor da colônia sobre MA2%; **g.-h.** esporodóquio; **i.** clamidósporos; **j.** macroconídios formados em esporodóquio; **k.-m.** fiálides produzidas no micélio aéreo; **n.-o.** macro e micronídios; **p.-r.** macroconídios formados no micélio aéreo. Características morfológicas de *F. triseptatum*. **s.-t.** cor da colônia sobre MA2%; **u.-v.** fiálides produzidas no micélio aéreo; **w.-x.** micro e macronídios.



Figura 3. Sintomas induzidos por *Fusarium callistephi* CML 3489. Cultivar Maçã: **a.-b.** Sintomas foliares; **c.** sintomas no rizoma; **d.-e.** planta testemunha sem sintomas. Cultivar Grande Naine: **f.-g.** Sintomas foliares; **h.** sintomas no rizoma; **i.-j.** planta testemunha sem sintomas. Sintomas induzidos por *Fusarium triseptatum* CML 3487. Cultivar Grande Naine: **k.** Sintomas foliares; **l.** Sintomas no rizoma; **m.** Sintomas no pseudocaule. Cultivar Maçã: **n.** Sintomas foliares; **o.** Sintomas no rizoma.

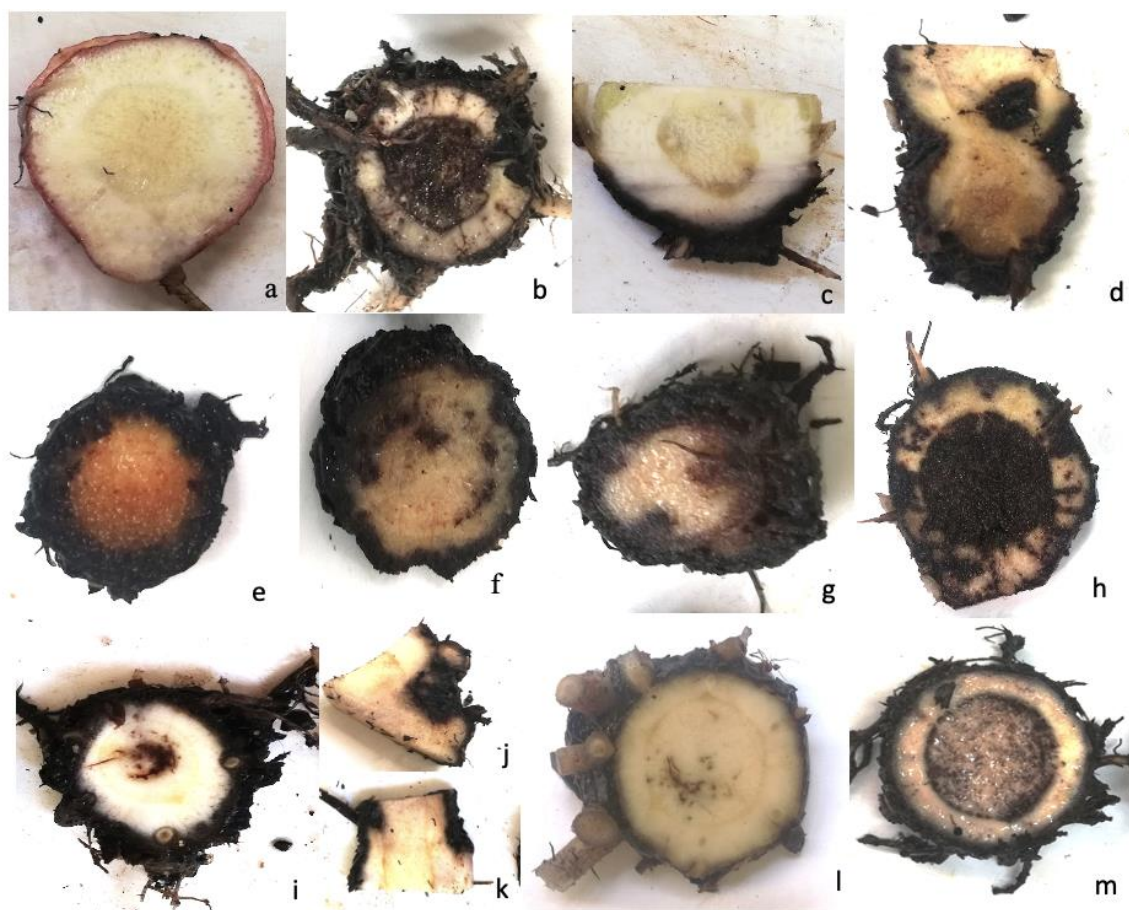


Figura 4. Sintomas no rizoma de plantas da cultivar Maça tradicional, induzidos após inoculação com o patógeno; **a.** Controle negativo. *Fusarium callistephi*: **b.** CML 3489, **c.** CML 4316, **d.** CML 4317, **e.** CML 4318, **f.** CML 4319, **g.** CML 4320, **h.** CML 4321, **i.** CML 4322, **j.** CML 4323, **k.** CML 4324. *Fusarium triseptatum*: **l.** CML 3487, **m.** CML 3490.

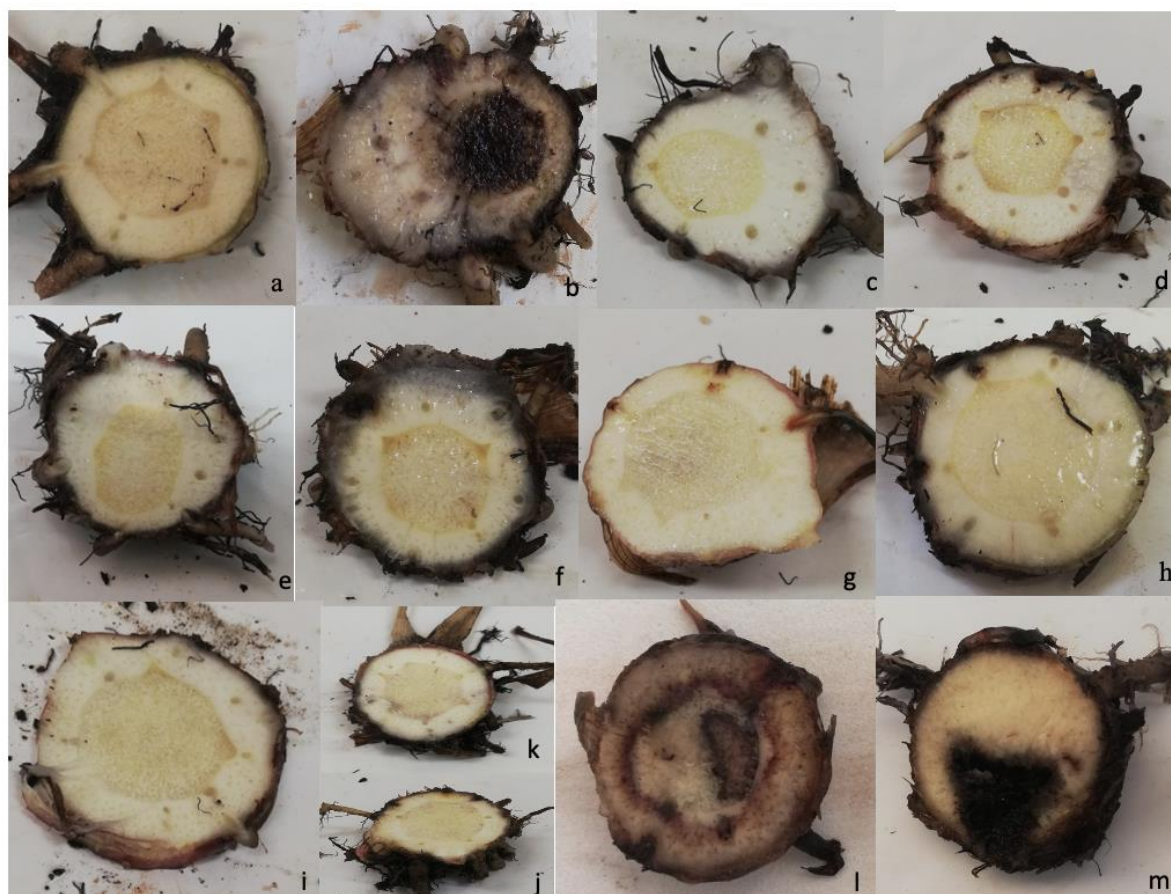


Figura 5. Sintomas no rizoma de plantas da cultivar Grande Naine, induzidos após inoculação com o patógeno; **a.** Controle negativo. *Fusarium callistephi*: **b.** CML 3489, **c.** CML 4316, **d.** CML 4317, **e.** CML 4318, **f.** CML 4319, **g.** CML 4320, **h.** CML 4321, **i.** CML 4322, **j.** CML 4323, **k.** CML 4324. *Fusarium triseptatum*: **l.** CML 3487, **m.** CML 3490.

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv			
1. FocTR4-F			
2. FJ664981.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV814_F_odoratissimum_TR4	A	G	A
3. FJ664980.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV300_F_odoratissimum_TR4	A	G	A
4. FJ664985.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV313_F_odoratissimum_TR4	A	G	A
5. FJ664978.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV810_F_odoratissimum_TR4	A	G	A
6. FJ664982.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV815_F_odoratissimum_TR4	A	G	A
7. FJ664983.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV604_F_odoratissimum_TR4	A	G	A
8. FJ664979.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV811_F_odoratissimum_TR4	A	G	A
9. LT571434.1_TPA_inf_F_oxysporum_f_sp_cubense_race_4_B2	A	G	A
10. MN830362.1_F_oxysporum_f_sp_cubense_B2-5			
11. MN830363.1_F_oxysporum_f_sp_cubense_B2-2			
12. MN830364.1_F_oxysporum_f_sp_cubense_B2-4			
13. MK754141.1_F_oxysporum_f_sp_cubense_O-2052_TR4	A	G	A
14. KP893342.1_F_oxysporum_f_cubense_isolate_P.TH2			
15. KX101211.1_F_oxysporum_f_cubense_voucher_BRIP_62353a	A	G	A
16. KX101210.1_F_oxysporum_f_cubense_voucher_BRIP_62347a	A	G	A
17. FJ664988.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV009_STR4	A	G	A
18. FJ664989.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV293_STR4	A	G	A
19. FJ664970.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV794_R1	A	G	A
20. FJ664991.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV296_R1	A	G	A
21. FJ664998.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV1107_R1	A	G	A
22. FJ665000.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV957_R1	A	G	A
23. FJ665005.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV602_R1_ou_R2	A	G	A
24. FJ665006.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV609_R1_ou_R2	A	G	A
25. FJ665007.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV786_R1_ou_R2	A	G	A
26. FJ664971.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV1051_R1	A	G	A
27. FJ664972.1_F_oxysporum_f_cubense_CAV632_R1	A	G	A
28. MH484784.1_F_callistephi_CBS_187_53	A	G	A
29. MH484819.1_F_triseptatum_CBS_116619	A	G	A

Figura S_1. Alinhamento da sequência *forward* (FocTR4-F) do *primer* específico para TR4 com sequências de isolados do *Fusarium oxysporum* species complex

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv			
1. FocTR4-R			
2. FJ664981.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV814_F_odoratissimum_TR4	G	G	C
3. FJ664980.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV300_F_odoratissimum_TR4	G	G	C
4. FJ664985.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV313_F_odoratissimum_TR4	G	G	C
5. FJ664978.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV810_F_odoratissimum_TR4	G	G	C
6. FJ664982.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV815_F_odoratissimum_TR4	G	G	C
7. FJ664983.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV604_F_odoratissimum_TR4	G	G	C
8. FJ664979.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV811_F_odoratissimum_TR4	G	G	C
9. LT571434.1_TPA_inf_F_oxysporum_f_sp_cubense_race_4_strain_B2	G	G	C
10. MN830362.1_F_oxysporum_f_sp_cubense_B2-5			
11. MN830363.1_F_oxysporum_f_sp_cubense_strain_B2-2			
12. MN830364.1_F_oxysporum_f_sp_cubense_strain_B2-4			
13. MK754141.1_F_oxysporum_f_sp_cubense_strain_O-2052_TR4	G	G	C
14. KP893342.1_F_oxysporum_f_cubense_isolate_P.TH2			
15. KX101211.1_F_oxysporum_f_cubense_voucher_BRIP_62353a	G	G	C
16. KX101210.1_F_oxysporum_f_cubense_voucher_BRIP_62347a	G	G	C
17. FJ664988.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV009_STR4	G	G	C
18. FJ664989.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV293_STR4	G	G	C
19. FJ664970.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV794_R1	G	G	C
20. FJ664991.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV296_R1	G	G	C
21. FJ664998.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV1107_R1	G	G	C
22. FJ665000.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV957_R1	G	G	C
23. FJ665005.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV602_R1_ou_R2	G	G	C
24. FJ665006.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV609_R1_ou_R2	G	G	C
25. FJ665007.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV786_R1_ou_R2	G	G	C
26. FJ664971.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV1051_R1	G	G	C
27. FJ664972.1_F_oxysporum_f_cubense_strain_CAV632_R1	G	G	C
28. MH484784.1_F_callistephi_strain_CBS_187_53	G	G	C

Figura S_2. Alinhamento da sequência *forward* (FocTR4-R) do *primer* específico para TR4 com sequências de isolados do *Fusarium oxysporum* species complex

ARTIGO 2

Comparative study of the bacterial microbiome associated with four banana cultivars with distinct levels of resistance to *Fusarium* wilt

Cristina M. Troya¹, Lucas W. Mendes², Marileide M. Costa^{3,4}, Everlon Cid Rigobelo⁵, Ludwig H. Pfenning³, Joyce Doria Rodrigues¹

¹ Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, Brazil

² Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba SP, Brazil

³ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, Brazil

⁴ Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

⁵ Departamento de Produção de Plantas, Universidade Estadual de São Paulo UNESP, Jaboticabal SP, Brazil

Manuscript prepared for submission to the journal N.N.

ORCIDs

Cristina M. Troya, 0009-0005-5028-0770

Lucas W. Mendes, 0000-0003-0980-7006

Marileide M. Costa, 0000-0002-9410-6601

Everlon Cid Rigobelo, 0000-0002-9734-3338

Joyce Doria Rodrigues, 0000-0002-7727-5016

Ludwig H. Pfenning, 0000-0001-6034-8285

List of Tables and Figures

Tables

Table 1. Treatments established in this study considering the cultivar and niche variables

Table 2. Most abundant OTUS in cultivars and niches according to the analysis LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size)

Figures

Figure 1 Taxonomic affiliation 16S rRNA sequences at Phylum level, for four cultivars and distinct niches

Figure 2. Detrended correspondence analysis (DCA) considering all samples of niches and cultivars

Figure 3. Detrended correspondence analysis (DCA) a. Cv. Capixaba W, b. Cv. Macã, c. Cv. Prata, d. Cv. Princesa.

Figure 4. LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) LDA analysis of indicator OTUs for niches within each cultivar, based on most frequent OTUs.

Figure 5. Random Forest Analysis for comparison of variation in the bacterial microbiome of susceptible (W and M cultivars), tolerant (PT cultivar), and resistant (P cultivar) banana cultivars.

Supplementary Material

Table S_1. Banana cultivars used in this study and its genetic resistance levels to the *Fusarium* wilt pathogen

Table S_2. Number of reads per sample

Table S_3. Most abundant OTUS in cultivars and niches according to the analysis

ABSTRACT

The plant microbiome is an extremely important resource for the development of healthy plants. It is considered an expanded genome of the plant, as the set of genes of the microorganisms associated with it promotes its growth, assisting in obtaining nutrients and defending against pathogens. Knowledge and engineering of the microbiome constitute a sustainable approach based on antagonistic relationships between the microbial community and pathogens. For example, bananas are one of the most consumed fruits in the world, and one of its main diseases that limits its production is caused by the fungus *Fusarium oxysporum*. Therefore, the objective of this study was to perform a comparative analysis on the influence of the microbiome of banana cultivars against *F. oxysporum*, where we hypothesized that the microbiome of the rhizosphere and endosphere plays a fundamental role in controlling the severity of the pathogen. Seedlings of four varieties with different levels of resistance were studied, grown in soils with *F. oxysporum* incidence, namely Maçã (M), Capixaba (W), Prata (Pt), and Princesa (P). Three niches were analyzed: bulk soil, rhizospheric soils, and plant roots (endosphere), from which total DNA was extracted, amplified, and quantified by qPCR. From the resulting OTU sequences, the structure, diversity, and composition of the community were studied, and potential bioindicators of resistance to the pathogen were traced. The main phyla identified were Proteobacteria (50.4%), Actinobacteria (20.3%), and Firmicutes (7.9%). All cultivars displayed a distinct community for each niche, but the susceptible cultivar W grouped the samples more closely, indicating that the three niches present more similar bacterial communities. In the rhizosphere, *Burkholderia* and *Klebsiella* were the main microbial taxa related to fungal resistance, while in the endosphere, *Mucilaginibacter*, *Sphingomonas*, *Fluviicola*, *Variovorax*, *Niastella*, and *Ralstonia* were the groups identified. Cultivars that presented a certain level of resistance (Pt and P) shared a higher number of OTUs in the rhizosphere when compared to susceptible cultivars (W and M). This study demonstrates the relevance of the microbiome as a supplementary resource for defense against pathogens, being an ally of the plant's intrinsic resistance. The results strengthen the importance of maintaining soil diversity for the better establishment of ecological interactions. Finally, in the future, new studies could be conducted aiming at engineering the soil microbial community for precise and sustainable agriculture.

Key Words: Bacterial diversity. *Musa* sp.. *Fusarium* wilt. Panama disease. Rhizosphere. 16S rDNA.

1. INTRODUCTION

Plants harbor distinct microbial communities on the surface and inside their tissues, constituting the microbial biome. Considering the microbiome, we do not only refer to the diversity of organisms but also to the sites where they exert their functions, constituting specific ecological niches (Berg et al., 2020). The microbiome plays an essential role in the development and health of plants, providing groups of genes, which are nowadays known as the "second genome" of plants, or the "extended genome." The microbiome associated with the root system is considered the first defense line of plant roots against soil-borne plant pathogens (Thomas et al., 2022). For this reason, crop plants with low levels of genetic resistance against most necrotrophic pathogens can compensate this disadvantage by recruiting antagonistic elements of the soil microbiome to defend themselves from pathogen infection (Cha et al., 2016). In addition, another relevant function of the plant root-associated microbiome is the cycling of nutrients, where specific microbial groups solubilize and make available some nutrients that can be readily absorbed by plant roots (Philippot et al., 2013).

In the last decade, considerable progress has been made in studying microbiomes, giving evidence to building highly complex structures associated with plants. The functional capability of the microbiota is recognized as an intrinsic component of plant physiology (Santos & Olivares 2021). Significant studies have been conducted in Brazil emphasizing the effect of the rhizosphere microbiome on the suppression of plant diseases (Mendes et al., 2013). More recent studies have focused on the common bean crop, showing that breeding for resistance to the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* has modulated the rhizosphere microbiome with traits that help the plant to fend off the fungal infection, such as a higher microbial diversity and higher abundance of antagonistic groups, namely *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Paenibacillus* (Mendes et al., 2018a).

Several investigations focusing on the rhizosphere microbiome of banana plants could bring evidence about how this bacterial diversity can positively influence the health and resistance of plants against diseases such as *Fusarium* wilt (Zhou et al., 2019; Kaushal et al., 2020). Banana is one of the most important tropical fruit crops and the sixth most important crop for human food (Drenth et al., 2021). Indeed, diseases like *Fusarium* wilt (or Panama disease) are a severe threat to the sustainability of this crop in several parts of the world. The etiological agent, the ascomycetous fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), present in distinct populations, is the most relevant biological factor that reduces the productivity of this crop (Dita et al., 2018). Therefore, resistant cultivars are proposed as the only effective management practice to avoid disease (Ploetz 2015). Nevertheless, resistant cultivars may not meet the demand of the market and final consumers. Resistance against *Fusarium* wilt is also constantly threatened by the appearance of tropical race 4 (TR4) in plantations of Cavendish in Asian and African countries (Acuña et al., 2022; Dita et al., 2018).

In this context, a higher resistance of banana cultivars against FOC could not only have a genetic background but also be a result of specific functions of the selected soil and rhizosphere microbiome. For this reason, a microbiome-based study can provide information for the development of

management strategies based on the use of antagonistic elements of the microbiome to this soil-borne plant pathogen (Compant et al., 2019) or even the development of plant varieties considering the selection of beneficial elements of the plant-associated microbiome (Schlatter et al., 2017). Thus, in the present study, we tested the hypothesis that the rhizosphere and endosphere microbiome may play an essential role in protecting the plant against the infection of roots by the pathogen, even considering that the primary cause is the plant's genetic and physiology. To test this hypothesis, the aims of this study were (i.) to perform a comparative analysis of the bacterial microbiome of the rhizosphere and endosphere of cultivars with distinct levels of resistance; and (ii.) to verify if the observed profiles show functional differences that could explain or assist the tolerance towards the disease. Consequently, the selection of resistant germplasm and the development of management practices to control the disease could take a different focus based on the microbiome.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Sampling and processing of plants and soil

In this study, we considered four distinct banana cultivars, namely: Maçã (M), Capixaba (W), Prata Anã (Pt), e Princesa (P). These cultivars display distinct resistance levels against *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) (Table S_1), collected in February 2021 at Fazenda Pinheirinho, municipality de Aguaí, São Paulo State. In areas with an incidence of *Fusarium* wilt, suckers were randomly selected in their vegetative stage of development, with a height of up to 50 cm. The soil was removed in a radius and depth of about 30 cm around the mother plant, enabling the rhizome extraction. Without the influence of plant roots, this soil sample was maintained in plastic bags as a sample named bulk soil, and parts of rhizomes were collected and stored in plastic bags separately. All samples were transported immediately to the laboratory in a cooling box and stored at -20 °C for further processing.

To separate the rhizosphere soil and the root endosphere, we collected roots with adhering soil and transferred them into 50 mL Falcon tubes containing 35 mL of sterilized phosphate buffer (6,33 g / L NaH₂PO₄; 8,5 g / L Na₂HPO₄ anhydrous; pH = 6,5; Tween 20 0.01%) (McPherson et al., 2018). We then centrifuged the tubes at 3000 rpm for 5 min at room temperature to separate the rhizosphere soil from the roots. After discarding the supernatant, we removed the roots using tweezers and dried them on filter paper before returning them to the Falcon tubes. We followed the protocol of Carrion et al. (2019) to sterilize the roots. Finally, we stored the tubes containing roots and rhizosphere soil at -20 °C for further processing.

To select the sampling sites, we considered the presence of the different cultivars in the same area, developing in identical soil, climate, and management conditions. The resulting number of 12 treatments is based on using young productive plants of four cultivars and three ecological niches, i.e., bulk soil, rhizosphere, and endosphere (Table 1), with four replicates (plants) each.

2.2 DNA extraction and 16S rRNA sequencing

Total DNA was extracted from soil samples using DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen®), following the manufacturer's instructions. For the DNA extraction of the endosphere, the roots were macerated in liquid nitrogen, and the DNA was extracted using a CTAB method (O'Donnell, 1992). Quality and quantity of the DNA were assessed in an agarose gel 1% and by NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) (260/280 nm). For the taxonomic profiling of bacterial communities, PCR reactions were performed on 48 samples (4 banana cultivars x 4 replicates x 3 niches) targeting the V3-V4 region of the 16S rRNA gene. Amplification was performed with primers S-D-Bact-0341-b-17 (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and -D-Bact-0785-a-A-21 (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), resulting in an amplicon size of 464 bp (Klindworth et al., 2013). The reaction mixture for amplification of the target genes consisted of 2 µL of the DNA, 2 µL of PNAclamp mt at 10 µM, 2 µL of PNAclamp p at 10 µM, 2 µL of the forward and reverse primers at 10 µM, 12.5 µL of 2X PCR Bio Ultra Mix, and 2.5 µL of PCR Grade water. Amplification was performed with the following amplification cycles: 95 °C for 5 minutes, 25 cycles of 95 °C for 30 seconds, 78 °C for 10 seconds, 50 °C for 60 seconds, 68 °C for 60 seconds, 68 °C for 10 minutes, and 4°C hold.

The products of this amplification were visualized on a 1.5% agarose gel and purified with Agencourt AMPure XP reagents (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The purified amplicons were used to insert barcode indexes in a PCR reaction. The reaction mixture for the amplification consisted of 2.5 µL of purified 1st PCR product, 2.5 µL of Nextera XT Index Primer 1 (N7xx), 2.5 µL of Nextera XT Index Primer 2 (S5xx), 12.5 µL of 2x PCR Bio Ultra Mix, and 5 µL of PCR Grade Water; PCR cycles were 95°C for 3 minutes, 8 cycles of 95 °C for 30 seconds, 55 °C for 30 seconds, 72 °C for 30 seconds, 72 °C for 5 minutes, and hold at 4 °C. The adapter-ligated products were quantified and normalized to the same concentration. After normalization, an equimolar pool of each sample was made and quantified by qPCR to validate and determine the final concentration of the pool in nM. The KAPA Library Quantification kit (Illumina) was used in this process. Sequencing was performed on an Illumina® MiSeq platform (NGS-Brasil Company) using paired-end (2x250bp) sequencing.

2.3 Bioinformatics analyses

Sequencing data processing.

The sequences were processed using QIIME 2 version 2021.4. Initially, the sequences were demultiplexed, and quality control was performed using DADA2 (Callahan et al., 2017), using the consensus method to eliminate remaining low-quality and chimeric sequences. After filtering, approximately 3,864,240 high-quality sequences were obtained, with an average of approximately 80,500 sequences per sample. Next, singletons and doubletons were removed, and the samples were rarefied to 38,150 sequences, following the sample with the lowest number (Tab. S_2). Finally,

taxonomic affiliation was performed with 97% similarity using the Silva database version 132 (Quast et al., 2013), and the generated matrix was subsequently used for statistical analysis. Finally, the sequences were submitted to the NCBI Sequence Read Archive under the identification PRJNAXXXXX.

Data analysis.

First, we checked the data for normal distribution and variance homogeneity using Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Then, we evaluated the microbial community structure through Detrended Correspondence Analysis (DCA), constructed in Canoco 5 (Biometrics, Wageningen, The Netherlands). To test whether each plant genotype harbored a significantly different microbial community, we used PERMANOVA (Anderson 2001). Next, the Shannon diversity index was calculated based on the taxonomic matrix at the OTU level and compared using Tukey's HSD test in PAST 4.01 software (Hammer et al., 2001). Next, the microbial composition was compared through the LDA Effect Size (LEfSe) analysis, according to Segata et al. (2011). Next, the OTU table at the genus level was used to compare the community composition between treatments. Finally, the samples were compared using the random forest approach in R to identify potential bioindicators for *Fusarium* wilt resistance.

3. RESULTS

The most abundant phyla found in our samples were Proteobacteria (50,4% of the total sequences), followed by Actinobacteria (20,3%), Firmicutes (7,9%), Bacteroidetes (7,2%), Acidobacteria (4,7%), Gemmatimonadetes (2,5%), among others (Fig. 1). The proportion of sequences of specific phyla differed between the three distinct niches. Proteobacteria increase from the bulk soil to the endosphere ($P < 0.05$). Gemmatimonadetes, Chloroflexi, and Planctomycetes were more abundant in bulk soil ($P < 0.05$), while Firmicutes and Cyanobacteria were more abundant in the rhizosphere and endosphere, respectively ($P < 0.05$). About, the community structure was compared among all niches and cultivars. DCA analyses showed that the three niches harbor a distinct community (PERMANOVA $F = 1.664$, $P = 0.001$) (Fig. 2). When comparing species richness and the Shannon diversity Index, the resistant cv. Princesa showed significative differences among the three evaluated niches (Fig. 3_d). In the other cultivars, the difference was observed among bulk soil, rhizosphere, and endosphere but not among bulk soil and rhizosphere, as for the cv. Princesa, differences among niches were observed (Fig. 3). The endosphere community is distinct from that associated with rhizosphere or bulk soil. Then, we compared the microbial communities of each distinct niche for all four cultivars. All cultivars displayed a distinct community for each niche, but the susceptible cultivar W grouped the samples more closely, indicating that the three niches present more similar bacterial communities (Fig. 3_a). A decrease in diversity was also observed along the

gradient of Bulk soil > rhizosphere > endosphere. The analysis results for each cultivar reinforce our findings, showing that each niche harbors a different microbial community.

To identify distinct taxa in each niche for every cultivar, we utilized LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size). In Figure 4, we present the top ten differentially abundant OTUs for each niche, which account for the observed differences between treatments. The results revealed several patterns, such as the higher abundance of *Sphingomonas*, Gaiellales, *Gemmatimonas*, and Chitiniphagaceae in the bulk soil of susceptible cultivars (W and M), compared to the higher abundance of Gemmatimonadaceae, *Solirubrobacter*, and Betaproteobacteriales in the bulk soil of tolerant and resistant plants (P.T. and P). Moreover, in the rhizosphere, susceptible plants exhibited a higher abundance of *Sporosarcina*, whereas tolerant and resistant plants had a higher abundance of Gaiellales and Micrococcaceae. In the endosphere, the susceptible plants presented a higher abundance of *Ochrobactrum*, while the tolerant and resistant ones presented a higher abundance of *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, and *Amycolatopsis*.

In the same analysis, it is possible to observe the OTUs identified as more abundant only in each niche of a specific cultivar. The genera *Reyranella*, *Candidatus Udaeobacter*, and *Gemmatirosa* were found more abundant in the rhizosphere niche for the cultivar W. In contrast, the genera *Promicromonospora*, *Niastella*, *Verrucomicrobium*, and *Starkeya* were more abundant in the endosphere niche. For cultivar M, the genus *Mucilaginibacter* was found only in the rhizosphere niche, and no abundant taxa were observed only in this cultivar's endosphere. In cultivar P.T., the order Tepidisphaerales and the genus *Arthrobacter* were found in the rhizosphere niche, while in the endosphere niche, the genera *Variavorax* and *Terrimicrobium* were more abundant. In the resistant cultivar P, the genera *Burkholderia*, *Leifsonia*, and *Marmoricola* were found in the rhizosphere niche, while in the endosphere niche, the genus *Staphylococcus* was more abundant. Among the top ten most abundant OTUs in susceptible cultivars (W and M), the genus *Mesorhizobium* and the family Micrococcaceae were identified. No shared OTUs were observed in the endosphere niche. As for the moderately susceptible cultivar P.T. and resistant cultivar P, shared OTUs in the rhizosphere niche were identified as belonging to the genus *Sporosarcina*, the family Micrococcaceae, and the order Solirubrobacteriales. In the endosphere niche, the genera *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Amycolatopsis*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, and an OTU classified to the class Alphaproteobacteria were observed (Table 2, Fig.4).

Finally, to further identify potential bioindicators for *Fusarium* wilt resistance, we categorized the samples into three groups: susceptible (W and M cultivars), tolerant (P.T. cultivar), and resistant (P cultivar), and compared them using random forest analysis (Figure 5). This machine-learning technique can be applied to microbial ecology data to identify the factors contributing most to microbial community variation. Therefore, we applied this analysis to identify possible microbial taxa correlated with *Fusarium* wilt disease in each niche, including bulk soil, rhizosphere, and endosphere. Our analysis revealed that in bulk soil, microbial groups belonging to families Desulfarculaceae and

Nitrosomonadaceae and the order Chitinophagales were the main groups related to resistance against the pathogen. In addition, *Labrys* and *Kribbella* were identified as potential groups related to fungal resistance at the genus level. In the rhizosphere, *Burkholderia* and *Klebsiella* were the main microbial taxa related to fungal resistance, while in the endosphere, *Mucilaginibacter*, *Sphingomonas*, *Fluviicola*, *Variovorax*, *Niastella*, and *Ralstonia* were the groups identified.

The genus *Mesorhizobium*, Family Micrococcaceae, was identified under the ten most abundant OTUs in the susceptible cultivars (W and Maçã). In the endosphere, no OTUs were observed, which were also present in the other niches concerning cv. Prata and Princesa, OTUs in both rhizosphere, are of the Genus *Sporosarcina*, Family Micrococcaceae, and Order Solirubrobacterales. In the endosphere, we found the Genera *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Amycolatopsis*, *Stenogrophomonas*, and *Achromobacter*, besides representatives of Class Alphaproteobacteria.

3. DISCUSSION

This study investigated changes in bacterial communities in the bulk soil, rhizosphere, and endosphere niches of banana plants at the cultivar level in plots affected by *Fusarium* wilt. Cultivars were selected based on their level of resistance to *Fusarium*, with W and M cultivars being susceptible to the disease, the P.T. cultivar being moderately susceptible, and the P cultivar being resistant. It has been reported that cultivars lacking genetic resistance to most necrotrophic pathogens can compensate for this disadvantage by recruiting antagonistic members from the soil microbiome to defend themselves (Cha et al., 2016). On the other hand, plants have a subset of microbial lineages called the core microbiome, which is reproducibly associated with a specific host in a wide range of environments. These associated microorganisms can affect plant physiology by supplying nutrients and enhancing plant resistance against biotic and abiotic stress (Xu et al., 2018; Mendes et al., 2013). Numerous studies in the last three decades have shown that plant genotype and soil type are major factors shaping the rhizosphere microbiome (Bakker et al., 2012).

In this sense, sequencing based on the 16S rDNA gene was performed on samples from the three niches of the four banana cultivars previously described to determine differences in bacterial community structure. Firstly, our results revealed that the bacterial community structures in the three niches of the four cultivars differed. Next, DCA analysis of the taxonomic composition showed that the samples grouped by niche type, confirmed by the PERMANOVA analysis ($F=1.664$; $P=0.001$), which showed significant statistical differences, once again demonstrating that the bacterial communities in each niche were separated from each other in all cultivars, with the endosphere community being the furthest from the other niches. Meanwhile, the structure of the rhizosphere and bulk soil communities were shown to be more similar, as these two niches had more similar bacterial communities despite having different structures. This similarity may be because bulk soil is the primary source of microbial species that colonize the rhizosphere (Fig. 2). Finally, in the individual analysis by cultivar, the differences in bacterial community structure were more evident in the

resistant P cultivar ($F=1.733$; $P=0.001$) (Fig. 3_d) since this cultivar had statistical differences in the three niches, observing three levels of significance. These differences between niches can be attributed to the effect of the rhizosphere since, in this root zone, a wide range of specific compounds known as rhizo-deposits or root exudates are secreted, through which plants can drive microbial selection (Mendes et al., 2013) by recruiting specific members from the soil. In this sense, it was evident that the rhizosphere bacterial communities of resistant cultivars differed from susceptible cultivars, showing that plant species, cultivars, and soil type are critical drivers of the composition and functioning of the rhizosphere microbiome (Bulgarelli et al., 2015).

On the other hand, endophytes mobilize nutrients for their host plants, modulating and promoting their growth. In banana crops, the leading bacterial endomicrobiomes that induce resistance belong to *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, and *Firmicutes* (Nakkeeran et al., 2021). As for the differentiating OTUs corresponded to the phyla *Proteobacteria*, *Actinomycota* and *Firmicutes*, characterized in terms of class, order, family, and genus in each of the cultivars and niches. In addition, part of the differentiating OTUs of all niches of all cultivars were taxa that were present as more abundant only in a niche of a given cultivar. (Table S_3. Fig. 4). Thus, the genera *Reyranella*, *Candidatus Udaeobacter* and *Gemmatirosa* were present in the susceptible cultivar W in the rhizosphere niche. Studies have shown that one of the most abundant genera in soils that suppress *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense was *Reyranella* (Out et al., 2019).

Regarding the genus *Gemmatirosa*, belonging to the Phylum Gematimonadetes, which is one of the 9 largest phyla found in the soil (DeBruyn et al., 2011), it was shown in the tomato crop that the bacterial genera that were enriched in the rhizosphere with the application of organic fertilizer were the genera *Gemmatirosa*, *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Terrabacter*, *Chujaibacter*, *Bacillus*, *Ochrobactrum* and that this genus decreased *Ralstonia*, *Candidatus Udaeobacter*. This management resulted in better growth of tomato plants and control of bacterial wilt. Similarly, the banana crop controlled *Fusarium* wilt disease and improved yield under field conditions (Zheng et al., 2020).

The genus *Promicromonospora* was observed in the endosphere, which has been reported as a potential antagonist against fungal pathogens (Kang et al., 2013). Additionally, studies have shown that the genus *Niastella* benefited from the exudates of tomato plants sick with bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) (Elsayed et al., 2020). *Verrucomicrobium*, a genus belonging to the Phylum Verrucomicrobia, is considered one of the most abundant phyla in the rhizosphere of banana plants with *Fusarium* wilt (Xue et al., 2015). *Starkeya* (Xanthobacteraceae) was reported as one of the most abundant in soils free of *Fusarium* and soils with the presence of *Fusarium* (Zhou et al., 2019).

In the susceptible cultivar Maçã, in the rhizosphere niche, the genus *Mucilaginbacter* belonging to the Phylum Bacteroidetes was detected, but its relationship with *Fusarium* wilt disease has not been evaluated (Fun et al., 2017). This genus produces large quantities of extracellular polysaccharides that protect the roots of crops, in addition to improving the microenvironment of the rhizosphere and promoting the absorption of trace elements (Madhaiyan et al., 2010).

In the moderately susceptible cultivar Prata, the order Tepidisphaerales and the genus *Arthrobacter* were found in the rhizosphere niche. Although Tepidisphaerales is a moderate thermophilic microorganism (Kovaleva et al., 2015), it was found as one of the most dominant orders in the leaves of cocoa culture (*Theobroma cacao*) that had agroforestry management (Wemheuer et al., 2020). The genus *Arthrobacter*, belonging to Actinobacteria, is considered one of the main phyla associated with growth promotion, nutrient mobilization, and the induction of systemic resistance in banana cv. Great Naine (Shekar et al., 2015).

In the endosphere, the genus *Variovorax* belongs to the Phylum Proteobacteria. *Variovorax guangxiensis*, a producer of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC), was isolated from the banana rhizosphere (Gao et al., 2015). It has been reported that some ACC deaminase-producing bacteria promote plant growth under various biotic and abiotic stress conditions by reducing plant ethylene levels (Onofre-Lemus et al., 2009). *Terrimicrobium*, a genus that belongs to the Phylum Verrucromicrobia, and as previously described, is considered one of the most abundant phyla in the rhizosphere of banana plants with *Fusarium* wilt (Xue et al., 2015).

In the resistant cultivar Princesa, the genus Burkholderia was observed in the rhizosphere niche, which forms part of the Phylum Proteobacteria and belongs to one of the five groups classified as antagonistic to *Fusarium* wilt (Rossmann et al., 2012). Additionally, studies where *Burkholderia cenocepacia* co-cultivated with in vitro banana seedlings, were effective against Foc isolates and reduced the incidence of Foc TR4 up to 86% under field conditions (Ho et al., 2015). Regarding the genera *Leifsonia* and *Marmoricola*, these were observed among the most abundant in the rhizosphere of healthy banana plants in contrast to plants sick with *Fusarium* wilt. In the endosphere, the genus *Staphylococcus* was observed, the same that is found within the main antagonistic endophytic bacterial genera of Foc, along with *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Virgibacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Kocuria* spp., *Paracoccus* sp, *Acinetobacter* spp., *Agrobacterium*, *Aneurinibacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Rhizobium*, *Sporolactobacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Luteimonas*, *Dokdonella*, *Rhodanobacter*, *Luteibacter*, *Steroidobacter*, *Nevskia*, *Aquicella*, *Rickettsiella*, *Legionella*, *Tatlockia* and *Streptomyces*.

In this context, the most abundant OTUs were shared among resistant cultivars compared to susceptible and moderately susceptible ones. Cultivars that presented a certain level of resistance (Prata and Princesa) shared a higher number of OTUs in the rhizosphere when compared to susceptible cultivars (W and Maçã). In the endosphere niche, in the susceptible cultivars, common OTUs were observed. In addition, the Maçã cultivar had only two OTUs as the most abundant, in contrast to the Prata and Princesa cultivars, which presented more shared OTUs.

Regarding the rhizosphere, the OTUs shared between susceptible cultivars were the *Mesorhizobium* genus and the Micrococcaceae family. Studies have shown that the genus *Mesorhizobium* belongs to the Phylum Proteobacteria and presents antagonistic activity against

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* (Nagpal et al., 2020). The same was present in the rhizosphere and endosphere of banana plants with and without symptoms of *Fusarium* wilt; it is considered a growth-promoting bacteria (Kaushal, Swennen & Mahuku, 2020). The Micrococcaceae family belongs to the Phylum Actinobacteria; it is one of the most dominant families in the banana root endophytobiome, especially in plants infected with Foc (Wu et al., 2020). Among the moderately susceptible and resistant cultivars were *Sporosarcina*, the Micrococcaceae family, and the order Gaiellales and Solirubrobacterales. *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Amycolatopsis*, *Stenotrophomonas* and *Achromobacter*, and the order Alphaproteobacteria were in the endosphere niche.

Sporosarcina belongs to the Phylum Firmicutes. Members of this genus have attributes that promote plant growth, such as siderophore production, phosphate solubilization, AIA production, and nitrogen fixation. Banana studies have shown that this genus can be present in conventional and organic management crops (Chou et al., 2017). The orders Gaiellales and Solirubrobacterales belong to the Phylum Actinobacteria and are considered one of the important phyla in soil due to their ability to produce antibiotics. As for the endophytic actinomycetes, they are not subject to competition from soil bacteria. Thus, they can be considered potential bio-control agents. Biological control studies in banana plants with Actinomycetes have focused mainly on the genus *Streptomyces* due to its antagonistic capacity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Duan et al., 2020).

Klebsiella is found within the main antagonist bacterial genera in the banana endosphere (Nakkeeran et al., 2021). Reports mention that bacterial endophytes colonize tissues and remain inside plant cells without showing apparent symptoms of disease, indicating a possible modulation of resistance of banana plants to pathogen attack from growth inhibition. These endophytes in the banana crop were identified as *Bacillus subtilis*, *Ochromobactrum daejeonense*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Achromobacter xylosoxidans* (Regavi et al., 2019). Additionally, *Achromobacter* is a genus that belongs to the Phylum Proteobacteria. Studies directed at community analyses of bacteria associated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* hyphae indicated that *Rhizobium* and *Achromobacter*, combined in different ratios, showed a significant variation in the ability to suppress *Cucumber Fusarium* wilt disease (Sun et al., 2021). *Amycolatopsis* and *Stenotrofomonas* were among the most abundant genera in *Fusarium* wilt-suppressing soils (Siegel-Hertz et al., 2018).

4. ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Finance Code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq and Foundation for Supporting Research in the States of Minas Gerais - Fapemig. The authors also thank colleagues from EMBRAPA for facilitating collections of plant material.

5. REFERENCES

- Acuña, R., Rouard, M., Leiva, A. M., Marques, C., Olortegui, A., Ureta, C., Cabrera-Pintado RM, Rojas C, Lopez-Alvarez, D., Cenci, A., Cuellar, W. J. & Dita, M. (2022). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Tropical Race 4, causing *Fusarium* wilt in Cavendish bananas in Peru. *Plant Disease* 106: 2268.
- Anderson, M. J. (2001) A new method for non parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 26: 32–46
- Bakker, M. G., Manter, D. K., Sheflin, A. M., Weir, T. L., & Vivanco, J. M. (2012). Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant and Soil*, 360(1), 1-13.
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., ... & Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 1-22.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, 64, 807-838.
- Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., ... & Schulze-Lefert, P. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell host & microbe*, 17(3), 392-403.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Carrión, V. J., Perez-Jaramillo, J., Cordovez, V., Tracanna, V., De Hollander, M., Ruiz-Buck, D., ... & Raaijmakers, J. M. (2019). Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. *Science*, 366(6465), 606-612.
- Cha, J. Y., Han, S., Hong, H. J., Cho, H., Kim, D., Kwon, Y., ... & Kwak, Y. S. (2016). Microbial and biochemical basis of a *Fusarium* wilt-suppressive soil. *The ISME journal*, 10(1), 119-129
- Chou, Y. M., Shen, F. T., Chiang, S. C., & Chang, C. M. (2017). Functional diversity and dominant populations of bacteria in banana plantation soils as influenced by long-term organic and conventional farming. *Applied Soil Ecology*, 110, 21-33.
- Comeau, D., Balthazar, C., Novinscak, A., Bouhamdani, N., Joly, D. L., & Filion, M. (2021). Interactions Between *Bacillus* Spp., *Pseudomonas* Spp. and *Cannabis sativa* Promote Plant Growth. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*, 19, 29-37.

DeBruyn, J. M., Nixon, L. T., Fawaz, M. N., Johnson, A. M., & Radosovich, M. (2011). Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. *Applied and environmental microbiology*, 77(17), 6295-6300.

de la Torre-Hernández, M. E., Salinas-Virgen, L. I., Aguirre-Garrido, J. F., Fernández-González, A. J., Martínez-Abarca, F., Montiel-Lugo, D., & Ramírez-Saad, H. C. (2020). Composition, structure, and PGPR traits of the rhizospheric bacterial communities associated with wild and cultivated *Echinocactus platyacanthus* and *Neobuxbaumia polylopha*. *Frontiers in microbiology*, 1424.

Ding, Y., Chen, Y., Lin, Z., Tuo, Y., Li, H., & Wang, Y. (2021). Differences in soil microbial community composition between suppressive and root rot-conducive in tobacco fields. *Current Microbiology*, 78(2), 624-633.

Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S., & Staver, C. P. (2018). *Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in plant science*, 9, 1468.

Drenth, A. & Kema, G. (2021). The vulnerability of bananas to globally emerging disease threats. *Phytopathology*®, PHYTO-07.

Duan, Y., Chen, J., He, W., Chen, J., Pang, Z., Hu, H., & Xie, J. (2020). Fermentation optimization and disease suppression ability of a *Streptomyces* sp. FS-4 from banana rhizosphere soil. *BMC microbiology*, 20(1), 1-12.

Elsayed, T. R., Jacquiod, S., Nour, E. H., Sørensen, S. J. & Smalla, K. (2020). Biocontrol of bacterial wilt disease through complex interaction between tomato plant, antagonists, the indigenous rhizosphere microbiota, and *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology* 10: 2835.

Fan, P., Lai, C., Yang, J., Hong, S., Yang, Y., Wang, Q., ... & Ruan, Y. (2022). Crop rotation suppresses soil-borne *Fusarium* wilt of banana and alters microbial communities. *Archives of Agronomy and Soil Science* 68: 447-459.

Fu, L., Penton, C. R., Ruan, Y., Shen, Z., Xue, C., Li, R., & Shen, Q. (2017). Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana *Fusarium* wilt disease. *Soil Biology and Biochemistry* 104: 39-48.

Gao, J. L., Yuan, M., Wang, X. M., Qiu, T. L., Li, J. W., Liu, H. C., ... & Sun, J. G. (2015). *Variovorax guangxiensis* sp. nov., an aerobic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producing bacterium isolated from banana rhizosphere. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107: 65-72.

Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4:1-9

Ho, Y. N., Chiang, H. M., Chao, C. P., Su, C. C., Hsu, H. F., Guo, C. T., ... & Huang, C. C. (2015). In planta biocontrol of soilborne *Fusarium* wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. *Plant and Soil* 387: 295-306.

Kang, HJ, Ahn, KS, Han, CW, Jeong, KH, Park, SJ, Song, IG, ... y Min, KB (2013). Patente de EE.UU. N° 8.591.911 . Washington, DC: Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos.

Kaushal, M., Mahuku, G., & Swennen, R. (2020). Metagenomic insights of the root colonizing microbiome associated with symptomatic and non-symptomatic bananas in *Fusarium* wilt infected fields. *Plants*, 9(2), 263.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41, e1-e1.

Köberl, M., Dita, M., Martinuz, A., Staver, C. & Berg, G. (2017). Members of Gammaproteobacteria as indicator species of healthy banana plants on *Fusarium* wilt-infested fields in Central America. *Scientific Reports* 7: 1-9.

Kovaleva, O. L., Merkel, A. Y., Novikov, A. A., Baslerov, R. V., Toshchakov, S. V. & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2015). *Tepidisphaera mucosa* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic member of the class Phycisphaerae in the phylum Planctomycetes, and proposal of a new family, Tepidisphaeraceae fam. nov., and a new order, Tepidisphaerales ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 549-555.

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J.S., Senthilkumar, M., Lee, K.C. & Sundaram, S. (2010). *Mucilaginibacter gossypii* sp. nov. and *Mucilaginibacter gossypicola* sp. nov., plant-growth-promoting bacteria isolated from cotton rhizosphere soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 2451-2457.

Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., García Onofre, J., & Jiménez-Gasco, M. D. M. (2020). Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the Fusarium Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants* 9: 1133.

Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 634-663.

Mendes, L. W., Mendes, R., Raaijmakers, J. M., & Tsai, S. M. (2018). Breeding for soil-borne pathogen resistance impacts active rhizosphere microbiome of common bean. *The ISME journal*, 12(12), 3038-3042.

McPherson, M. R., Wang, P., Marsh, E. L., Mitchell, R. B., & Schachtman, D. P. (2018). Isolation and analysis of microbial communities in soil, rhizosphere, and roots in perennial grass experiments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (137), e57932.

Nagpal, S., Sharma, P., Sirari, A., & Gupta, R. K. (2020). Coordination of *Mesorhizobium* sp. and endophytic bacteria as elicitor of biocontrol against *Fusarium* wilt in chickpea. *European Journal of Plant Pathology*, 158(1), 143-161.

- Nakkeeran, S., Rajamanickam, S., Saravanan, R., Vanthana, M., & Soorianathasundaram, K. (2021). Bacterial endophytome-mediated resistance in banana for the management of *Fusarium* wilt. *3 Biotech*, 11(6), 1-13.
- O'Donnell, K. (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current genetics* 22(3), 213-220.
- Onofre-Lemus, J., Hernández-Lucas, I., Girard, L., & Caballero-Mellado, J. (2009). ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in Burkholderia species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology* 75(20), 6581-6590.
- Ordonez, N., Seidl, M. F., Waalwijk, C., Drenth, A., Kilian, A., Thomma, B. P., ... & Kema, G. H. (2015). Worse comes to worst: bananas and Panama disease—when plant and pathogen clones meet. *PLoS pathogens*, 11(11), e1005197.
- Ou, Y., Penton, C. R., Geisen, S., Shen, Z., Sun, Y., Lv, N., ... & Shen, Q. (2019). Deciphering underlying drivers of disease suppressiveness against pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in microbiology*, 2535.
- Pegg, K. G., Coates, L. M., O'Neill, W. T., & Turner, D. W. (2019). The epidemiology of *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in plant science*, 10, 1395.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789-799.
- Ploetz, R. C. (2015a). *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology*, 105(12), 1512-1521.
- Ploetz, R. C. (2015b). Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Protection*, 73, 7-15.
- Ragavi, G., Muthamilan, M., Nakkeeran, S., Kumaravadivel, N., Sivakumar, U., & Suganthi, A. (2019). Phenotypic and molecular characterization of endophytic bacteria isolated from banana. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 38(6), 1-10.
- Rossmann, B., Müller, H., Smalla, K., Mpiira, S., Tumuhairwe, J. B., Staver, C., & Berg, G. (2012). Banana-associated microbial communities in Uganda are highly diverse but dominated by Enterobacteriaceae. *Applied and environmental microbiology*, 78(14), 4933-4941.
- Rossmann, M., Perez-Jaramillo, J.E., Kavamura, V.N., Chiaramonte, J.B., Dumack, K., Fiore-Donno, A.M., Mendes, L.W., Ferreira, M.M., Bonkowski, M., Raaijmakers, J.M., Mauchline, T.H., and Mendes R. (2020). Multitrophic interactions in the rhizosphere microbiome of wheat: from bacteria and fungi to protists. *FEMS microbiology ecology*, 96(4), fiae032.
- Santos, L. F. & Olivares, F. L. (2021). Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. *Current Plant Biology* 26: 100198.

- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., et al. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 12, R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60.
- Sekhar, A. C., & Thomas, P. (2015). Isolation and identification of shoot-tip associated endophytic bacteria from banana cv. Grand Naine and testing for antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *American Journal of Plant Sciences*, 6(07), 943.
- Shen, Z., Wang, D., Ruan, Y., Xue, C., Zhang, J., Li, R., & Shen, Q. (2014). Deep 16S rRNA pyrosequencing reveals a bacterial community associated with banana *Fusarium* wilt disease suppression induced by bio-organic fertilizer application. *PLoS One*, 9(5), e98420.
- Shen, Z., Thomashow, L.S., Ou, Y., Tao, C., Wang, J., Xiong, W., Liu, H., Li, R., Shen, Q. & Kowalchuk, G.A. (2022). Shared core microbiome and functionality of key taxa suppressive to banana *Fusarium* wilt. *Research*, DOI 10.34133/2022/9818073
- Siegel-Hertz, K., Edel-Hermann, V., Chapelle, E., Terrat, S., Raaijmakers, J. M., & Steinberg, C. (2018). Comparative microbiome analysis of a *Fusarium* wilt suppressive soil and a *Fusarium* wilt conducive soil from the Châteaurenard region. *Frontiers in Microbiology*, 9, 568.
- Schlatter, D., Kinkel, L., Thomashow, L., Weller, D., & Paulitz, T. (2017). Disease suppressive soils: new insights from the soil microbiome. *Phytopathology*, 107(11), 1284-1297.
- Sun, R. L., Jing, Y. L., de Boer, W., Guo, R. J., & Li, S. D. (2021). Dominant hyphae-associated bacteria of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in different cropping systems and insight into their functions. *Applied Soil Ecology*, 165, 103977.
- Thomas, A. S. S., Pongprayoon, W., Cheenkachorn, K., & Sriariyanun, M. (2022). Plant-Microbe interactions-insights and views for applications in sustainable agriculture. *Applied Science and Engineering Progress*, 15(1).
- Wemheuer, F., Berkelmann, D., Wemheuer, B., Daniel, R., Vidal, S., & Bisseleua Daghela, H. B. (2020). Agroforestry management systems drive the composition, diversity, and function of fungal and bacterial endophyte communities in *Theobroma cacao* leaves. *Microorganisms*, 8(3), 405.
- Wu, X., Shan, Y., Li, Y., Li, Q., & Wu, C. (2020). The soil nutrient environment determines the strategy by which *Bacillus velezensis* HN03 suppresses *Fusarium* wilt in banana plants. *Frontiers in plant science*, 1801.
- Xu, J., Zhang, Y., Zhang, P., Trivedi, P., Riera, N., Wang, Y., ... & Wang, N. (2018). The structure and function of the global citrus rhizosphere microbiome. *Nature communications*, 9(1), 1-10.
- Xue, C., Ryan Penton, C., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q., Li, R., ... & Shen, Q. (2015). Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Scientific Reports* 5: 1-11.

Yang, J., Duan, Y., Liu, X., Sun, M., Wang, Y., Liu, M., Zhu, Z., Shen, Z., Gao, W., Wang, B. & Chang, C. (2022). Reduction of banana *Fusarium* wilt associated with soil microbiome reconstruction through green manure intercropping. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 337, p.108065. DOI 10.1016/j.agee.2022.108065

Zhang, X., Xue C., Xiaohui He, D. F., Wei, M., Zhuo, C., Jin, J., Shen, B., Li, R., Ling, N. & Shen, Q. (2021). Manipulating the soil microbiomes during a community recovery process with plant beneficial species for the suppression of *Fusarium* wilt of watermelon. *AMB Express* 11: 87. DOI 10.1186/s13568-021-01225-5

Zheng, S. J., García-Bastidas, F. A., Li, X., Zeng, L., Bai, T., Xu, S., ... & Kema, G. H. (2018). New geographical insights of the latest expansion of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 into the greater Mekong subregion. *Frontiers in plant science*, 9, 457.

Zheng, X., Zhu, Y., Wang, Z., Zhang, H., Chen, M., Chen, Y., ... & Liu, B. (2020). Effects of a novel bio-organic fertilizer on the composition of rhizobacterial communities and bacterial wilt outbreak in a continuously mono-cropped tomato field. *Applied Soil Ecology*, 156, 103717.

Zhou, D., Jing, T., Chen, Y., Wang, F., Qi, D., Feng, R., ... & Li, H. (2019). Deciphering microbial diversity associated with *Fusarium* wilt-diseased and disease-free banana rhizosphere soil. *BMC microbiology*, 19(1), 1-13.

List of Tables

Table 1. Treatments established in this study considering the cultivar and niche variables

Table 2. Most abundant OTUS in cultivars and niches according to the analysis LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size)

Tables - Supplementary Material

Table S_1 Banana cultivars used in this study and its genetic resistance levels to the *Fusarium* wilt pathogen

Table S_2. Number of reads per sample

Table S_3. Most abundant OTUS in cultivars and niches according to the analysis

6. ANNEXES

Table 1. Treatments established in this study considering the cultivar and niche variables

CULTIVAR	NICHES		
	RHIZOSPHERE	ENDOSPHERE	BULK SOIL
	(R)	(E)	(BS)
PRINCESA (P)	4	3	4
W	4	4	4
MAÇÃ (M)	4	4	4
PRATA ANÃ (Pt)	4	3	4
Total of samples/niche	16	14	16
Total of samples		46	
Total treatments		12	

Table 2. Most abundant OTUS in cultivars and niches according to the analysis LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size)

OTU's	W	M	Pt	P	Phylum
Achromobacter	¹ E		E	E	Protobacteria
Acidibacter				² B	Acidobacteri
Acidobacteria Subg.6	B	³ R		B	Acidobacteria
Acidobacteriales		B	R		Acidobacteria
Alphaproteobacteria	E		E	E	Protobacteria
Amycolatopsis			E	E	Actinomycetota
Arthrobacter			R		Actinomycetota
Bacillus		R		R	Firmicute
Betaproteobacteriales	R	B	B	B	Proteobacteria
Burkholderia				R	Proteobacteria
Burkholderiaceae	R				Proteobacteria
Candidatus Solibacter	B				Acidobacteria
Candidatus Udaeobacter	R				Acidobacteria
Chitinophagaceae	B	B	B		Bacteroidete
Chujaibacter		B	B		Proteobacteria
Conexibacter		R	R		Actinomycetota
Enterobacteriaceae				R	Proteobacteria
Frankiales			B		Actinomycetota
Gaiellales	B	B	RR	RR	Actinomycetota
Gemmatimonadaceae		B	BB	B	Gemmatimonadetes
Gemmatimonas		B	B	B	Gemmatimonadetes
Gemmatinomadaceae	B				Gemmatimonadetes
Gemmatiomonas	B				Gemmatimonadetes

Gemmatirosa	R				Gemmatimonadetes
Intrasporangiaceae		R	B	R	Actinomycetota
Klebsiella	E		E	E	Proteobacteria
Leifsonia				R	Actinomycetota
Marmoricola				R	Actinomycetota
Micrococcaceae	R	R	R	R	Actinomycetota
Micromonosporaceae				B	Actinomycetota
Mucilaginibacter		R			Bacteroidete
Niastella	E				Bacteroidete
Nitrosomonadaeae	B	B	B		Proteobacteria
Nocardioides		R	R	B	Actinomycetota
Ochrobactrum	E	E	E	E	Proteobacteria
Promicromonospora	E				Actinomycetota
Pyronomonadaceae	B				?
Reyranella	R				Proteobacteria
Rhizobium	E		E		Proteobacteria
Solirubrobacter	B	B		B	Actinomycetota
Solirubrobacterales			BR	BR	Actinomycetota
Sphingomonadaceae	R				Proteobacteria
Sphingomonas	B	B			Proteobacteria
Sporosarcina	R	R	R	R	Firmicute
Staphylococcus				E	Firmicute
Starkeya	E				Proteobacteria
Stenotrophomonas	E		E	E	Proteobacteria
Streptomyces		E	E		Actinomycetota

Tepidisphaerales			R		Planctomicetes
Terrimicrobium			E		Verrucomicrobia
unc Bacteria				E	
Variovorax			E		Proteobacteria
Verrucomicrobium	E				Verrucomicrobia
Xanthobacteraceae	R	R		B	Proteobacteria

¹ E: Endosphere

² R: Rhizosphere

³ B: Bulk soil

Table S_1 Banana cultivars used in this study and its genetic resistance levels to the *Fusarium* wilt pathogen

Cultivar	Genome	Level of resistance	Reference
Maçã	AAB	Susceptible	Lichtemberg et al. 2008
W (Capixaba)	AAB	Susceptible	Gasparotto et al. 2020
Prata Anã	AAB	Moderately Susceptible	Lichtemberg et al. 2008
Princesa	AAAB	Resistant	Lichtemberg et al. 2008

Table S_2. Number of reads per sample

Nichos	W		Maçã		Prata		Princesa	
	Total	Media	Total	Media	Total	Media	Total	Media
Rhizosphere	152486	38121	152495	38123	152507	38126	152507	38126
Endosphere	152543	38135	114440	38146	152540	38135	152540	38135
Bulk soil	152405	38101	152476	38119	152459	38114	152459	38114,

Table S_3. Most abundant OTUS in cultivars and niches according to the analysis

Cultivar / niche	Phylum	Class	Order	Family	Genus
W/soil bulk					Sphigomonas
W/rizosfera	Proteobacteria Proteobacteria Proteobacteria Proteobacteria	Betaproteobacteriales		Burkholderiaceae Xanthobacteraceae	Klebsiella
W/endosfera	Proteobacteria Actinomycetota Proteobacteria	Alphaproteobacteria			Rhizobium Promicromonospora
Maçã/soil bulk	Proteobacteria Proteobacteria				Sphigomonas Chujaibacte
Maçã/rizosfera	Actinomycetota Firmicute		Gaiellales		Bacillus,
Maçã/endósfera	Actinomycetota				Streptomyces
Prata/bulk soil	Proteobacteria				Chujaibacter
Prata/rizosfera	Actinomycetota Plantomicetes Actinomycetota		Galiellales	Micrococcaceae	Tepidisphaerales
Prata/endosfera	Proteobacteria Actinomycetota Proteobacteria Proteobacteria				Klebsiella, Streptomyces Rhizobium Ochrobactrum
Princesa/soil bulk	Acidobacteria subg 6 Actinomycetota Gemmatimonadetes			Gemmatimonadaceae	Solirubrobacter
Princesa/rizosfera	Proteobacteria Firmicutes Actinomycetota Firmicutes Actinomycetota		Gaiellales	Micrococcaceae	Burkholderia Bacillus Sporosarcina
Princesa/endosfera	Proteobacteria Proteobacteria Proteobacteria Actinomycetota			Enterobacteriaceae	Klebsiella Achromobacter Amycolaptosis

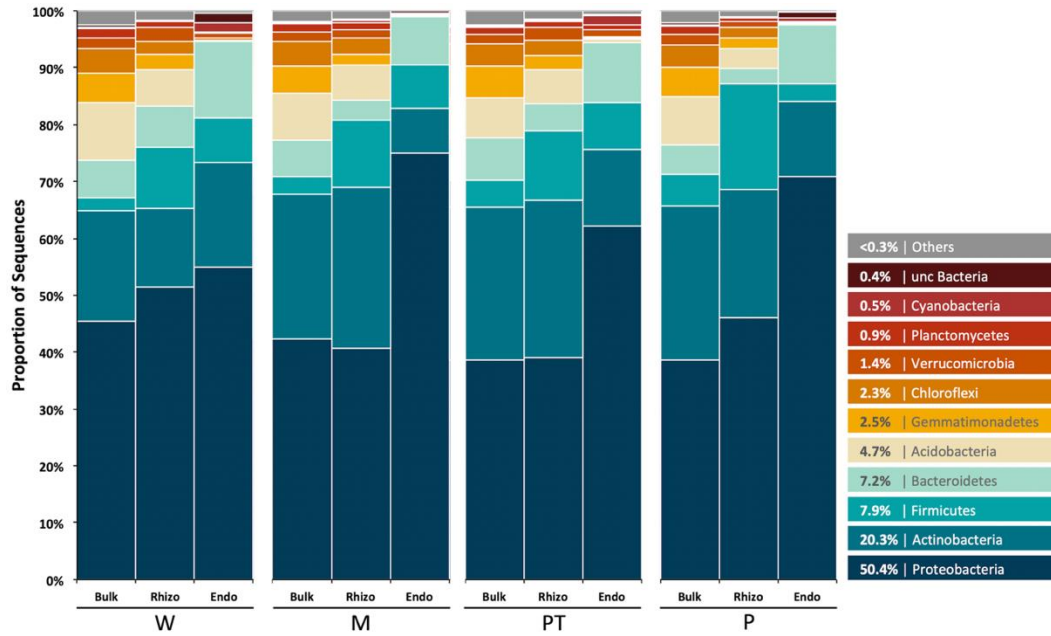


Figure 1 Taxonomic affiliation 16S rRNA sequences at Phylum level, for four cultivars and distinct niches

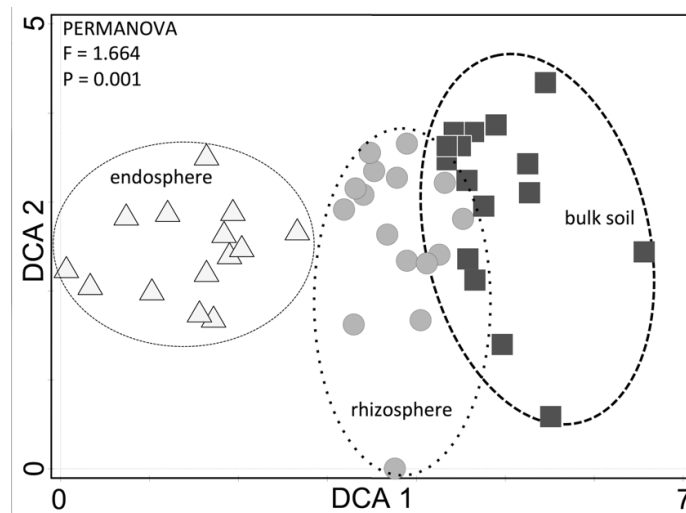


Figure 2 Detrended correspondence analysis (DCA) considering all samples of niches and cultivars

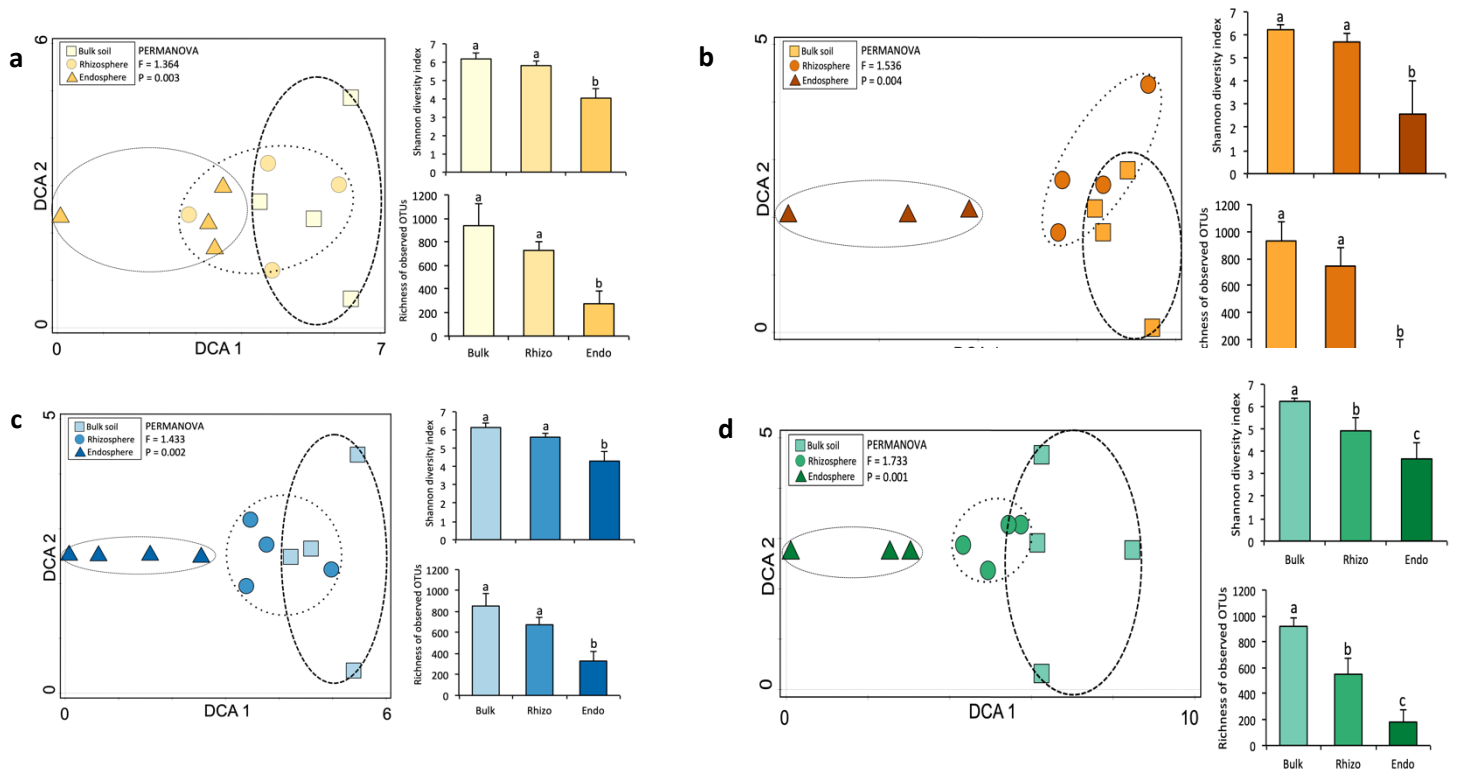


Figure 3. Detrended correspondence analysis (DCA) a. Cv. Capixaba W, b. Cv. Macã, c. Cv. Prata, d. Cv. Princesa.

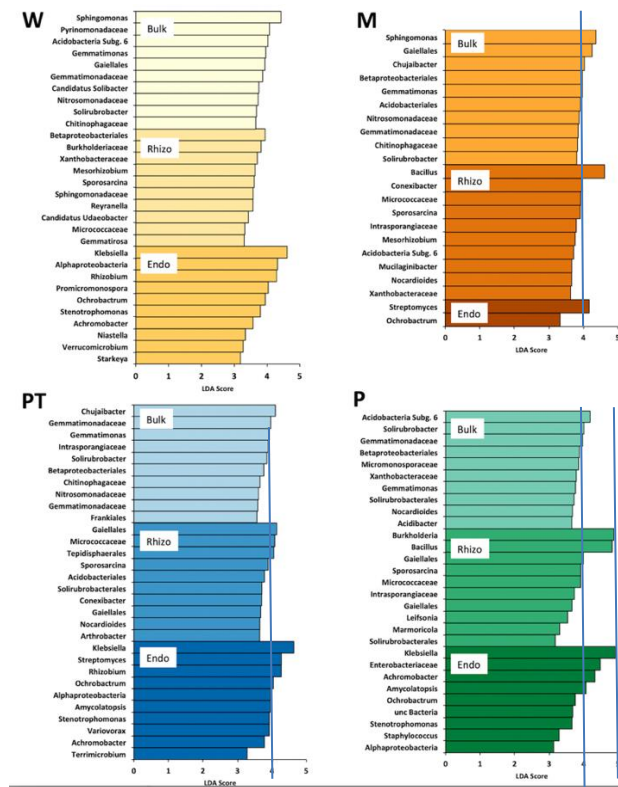


Figure 4. LefSe (Linear discriminant analysis Effect Size) LDA analysis of indicator OTUs for niches within each cultivar, based on most frequent OTUs.

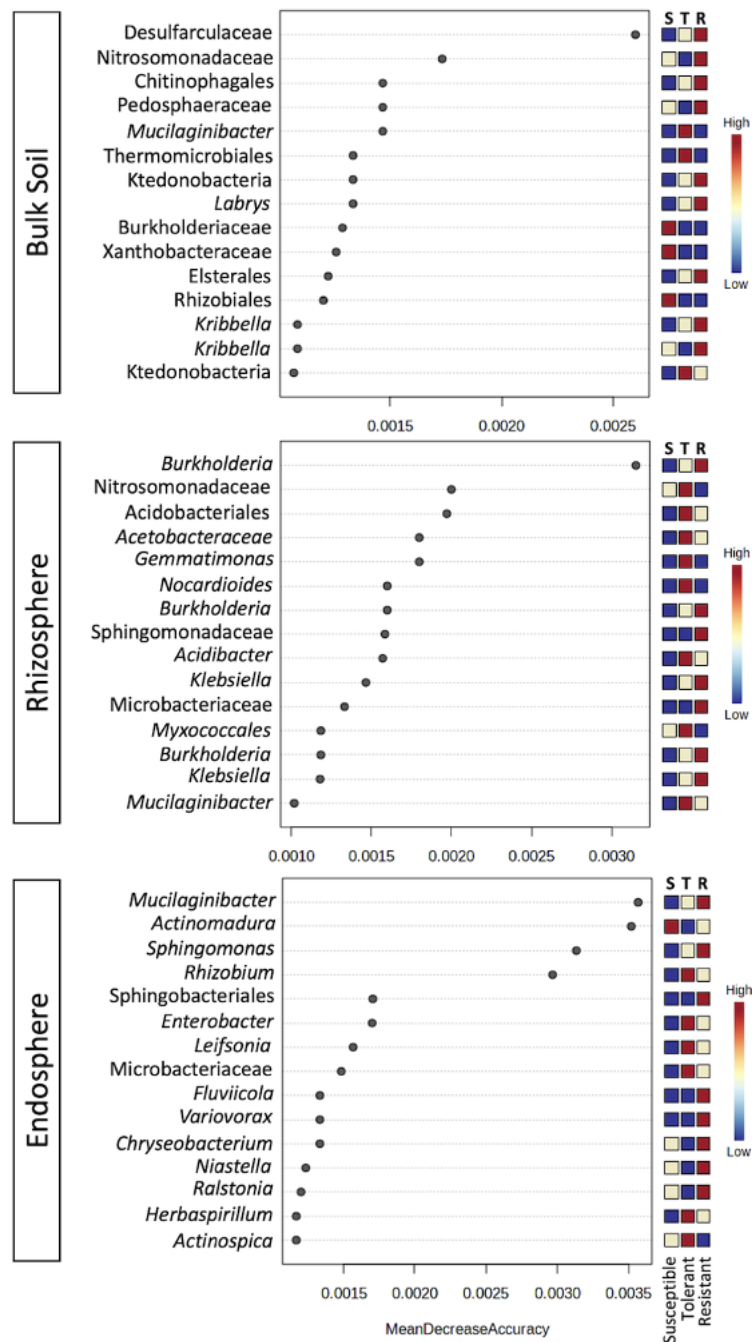


Figure 5. Random Forest Analysis for comparison of variation in the bacterial microbiome of susceptible (W and M cultivars), tolerant (PT cultivar), and resistant (P cultivar) banana cultivars.